

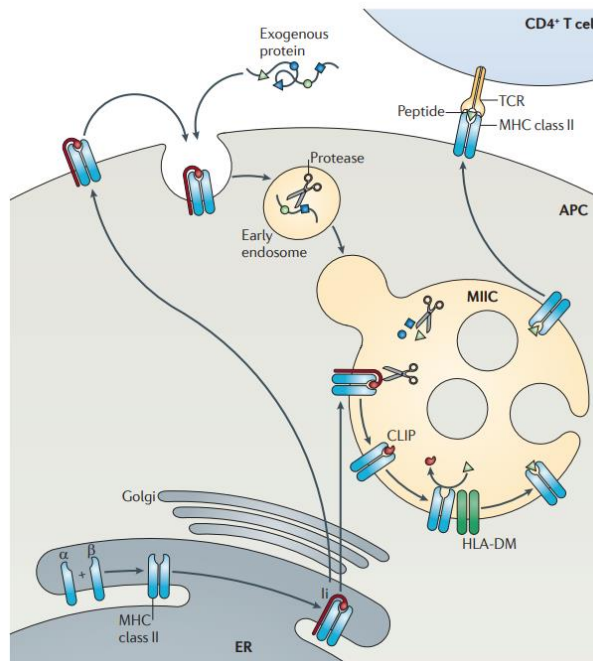


**«Ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των
μακροφάγων, MIF, ως ανταγωνιστής του μονοπατιού της
αντιγονοπαρουσίασης στην επέκταση της μυελογενούς
λευχαιμίας»**

Βιτσιώτη Αγνή

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα: Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία

A.M.: 941



Εργαστήριο Ανοσολογίας

Τμήμα Βιολογίας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ειρήνη Αθανασάκη

Ηράκλειο, 2021

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1) Εισαγωγή	
1.1) Το ανοσοποιητικό σύστημα.....	8
1.2) Η διαδικασία της αιμοποίησης.....	8
1.3) Τα κύτταρα του αίματος.....	11
1.3.1) Κοκκιοκύτταρα.....	11
1.31α) Βασεόφιλα.....	11
1.3.1β) Ηωσινόφιλα.....	12
1.3.1γ) Ουδετερόφιλα.....	12
1.3.2) Ακοκκιοκύτταρα.....	13
1.3.2α) Μονοπύρηνα-Μακροφάγα.....	13
1.3.2β) Λεμφοκύτταρα.....	13
1.4) Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας-Major Histocompatibility Complex (MHC).....	15
1.4.1) Τα MHC I μόρια ιστοσυμβατότητας.....	15
1.4.2) Τα MHC II μόρια ιστοσυμβατότητας.....	17
1.4.3) Τα MHC III μόρια ιστοσυμβατότητας.....	19
1.5) Η κλασική περιορισμένη από τα HLA-τάξης II αντιγονοπαρουσίαση-Το ενδοκυτταρικό μονοπάτι.....	19
1.5.1) Η λειτουργία του CD74 ή σταθερής αλυσίδας (Ii) ως μοριακός συνοδός των MHC II.....	21
1.5.2) Ο ρόλος των μη κλασσικών HLA-DM και HLA-DO.....	22
1.5.2α) HLA-DM: Ένας θετικός ρυθμιστής της αντιγονοπαρουσίασης.....	22
1.5.2β) HLA-DO: Ένας αρνητικός ρυθμιστής της αντιγονοπαρουσίασης.....	24

1.6) Η μεταγραφική ρύθμιση των MHC II γονιδίων.....	26
1.7) Ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF, macrophage migration inhibitory factor).....	28
1.7.1) Η μεσολαβούμενη από τον MIF ενδοκυττάρια σηματοδότηση.....	29
1.7.2) Οι βιολογικές δράσεις του MIF.....	30
1.7.2α) Φλεγμονώδεις Δραστηριότητες.....	30
1.7.2β) Ενζυμική Δράση.....	31
1.7.2.γ) Ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων.....	31
1.7.3) Η εμπλοκή του MIF στον καρκίνο.....	32
1.7.3α) Η παρεμβολή του MIF στον κυτταρικό κύκλο.....	32
1.7.3β) Η καταστολή της ανοσολογικής επαγρύπνησης.....	33
1.7.3γ) Η εμπλοκή του MIF στη μετάσταση και στην αγγειογένεση.....	34
1.8) Οι MIF υποδοχείς- CD74 και CXCR4.....	36
1.8.1) Ο διττός ρόλος του CD74 ή σταθερής αλυσίδας (Ii)-Ο CD74 αποτελεί έναν συγγενικό MIF υποδοχέα.....	36
1.8.2) Ο χημειοκινικός υποδοχέας CXCR4 αποτελεί ένα μη συγγενικό MIF υποδοχέα.....	38
1.8.3) Το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που διαμεσολαβείται από την πρόσδεση του MIF στο σύμπλοκο CD74/CXCR4 και πιθανόν προωθεί τον καρκινικό φαινότυπο.....	41
1.9) Οι λευχαιμίες.....	42
1.9.1) Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ,CML, chronic myeloid leukemia).....	42
1.9.1α) Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης που μεσολαβούνται από την BCR/ABL.....	46

1.9.1β) Η θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας.....	48
1.9.2) Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ,AML acute myeloid leukemia).....	49
1.9.3) Πιθανοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα λευχαιμικά κύτταρα και καταστέλλουν την ανοσολογική απόκριση.....	51
1.10) Οι σταθερές κυτταρικές σειρές των λευχαιμιών.....	51
1.10.1) K-562.....	51
1.10.2) HL-60.....	52
Σκοπός της Εργασίας.....	54
2) Υλικά και Μέθοδοι.....	55
2.1) Κυτταροκαλλιέργειες.....	55
2.2) Επώαση των κυτταρικών σειρών με Πεπστατίνη-A.....	55
2.3) Ανοσοφθορισμός.....	56
2.4) Κυτταρομετρία Ροής (FACs)	58
2.5) Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA).....	61
2.7) Στατιστική ανάλυση.....	62
3) Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	63
3.1) Η μεμβρανική και ενδοκυττάρια έκφραση του MIF και των υποδοχέων του, CD74 Και CXCR4 στις σταθερές κυτταρικές σειρές K562 και HL-60.....	63
3.2) Η εμπλοκή του μεταγραφικού συνενεργοποιητή των MHC II στα επίπεδα έκφρασης του MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4.....	65
3.3) Η επίδραση των καθεσπινών στα ενδοκυττάρια, μεμβρανικά και εκκρινόμενα επίπεδα του MIF και των υποδοχέων του CD74 και CXCR4 στις κυτταρικές σειρές K562 και HL-60.....	70
4) Συμπεράσματα.....	81
5) Ευχαριστίες.....	84
Βιβλιογραφία.....	86

Περίληψη

Η έκφραση των μεμβρανικών ΜHC II μορίων ενεργοποιεί την αντιγονοπαρουσίαση μέσω του ενδοκυτταρικού μονοπατιού και τη συνεπακόλουθη ανοσολογική απόκριση. Η απουσία μεμβρανικών ΜHC II μορίων αποτελεί ένα μηχανισμό καταστολής της ανοσολογικής επαγρύπνησης, που χρησιμοποιείται από πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των λευχαιμιών. Η σταθερή αλυσίδα, Ii ή CD74 αποτελεί μόριο κλειδί για τα ΜHC II και το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, λόγω του διττού της ρόλου, ως μοριακός συνοδός των ΜHC II και ως υποδοχέας του παράγοντα αναστολής μετανάστευσης των μακροφάγων, MIF. Η πυροδότηση, όμως, της ενδοκυττάριας MIF σηματοδότησης που προωθεί τον καρκινικό φαινότυπο, απαιτεί ένα συνυποδοχέα του CD74, τον CXCR4. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν οι σταθερές λευχαιμικές σειρές, K562 και HL-60 για να εξακριβωθεί μέσω ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής, η επίδραση του MIF και των υποδοχέων του CD74 και CXCR4, στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης, αποδεικνύοντας τη διαφορετική χρήση του CD74 στην κάθε κυτταρική σειρά και άρα τη διαφορετική δυνατότητα αντιγονοπαρουσίασης. Η απουσία έκφρασης ΜHC II μορίων στα K562 κύτταρα έχει συνδυαστεί με την απουσία του μεταγραφικού παράγοντα C/PTA. Έτσι, χρησιμοποιώντας μια σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά K562-C/PTA-K9 ελέγχθηκε το προφίλ των παραγόντων ενδιαφέροντος και φάνηκε ότι ο C/PTA ρυθμίζει θετικά την παραμονή του CD74 στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα και την ενδοκυττάρωση του CXCR4. Η εναλλαγή των επιπέδων έκφρασης των μεμβρανικών και ενδοκυττάρια πρωτεϊνών του ενδιαφέροντος, έθεσε το ερώτημα του κατά πόσο η ενζυμική υποβάθμιση των παραγόντων MIF, CD74 και CXCR4 μπορεί να ελέγξει την παθογένεια των λευχαιμικών κυττάρων. Εστιαζόμενοι στην καταβολική δραστηριότητα των καθεψινών, που έχει δειχθεί να σχετίζεται με την επέκταση καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας ασπαρτυλοπρωτεασών, πεπστατίνη-A, και ελέγχθηκε η αναστροφή του φαινοτύπου στα K562 και HL-60 κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πεπστατίνη-A αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα του CD74 και των ΜHC II αλλά όχι του MIF στα K562 δίνοντας τους μια δυναμική αντιγονοπαρουσίασης, αλλά και αναδεικνύοντας την πεπστατίνη-A ως έναν πιθανό αντικαρκινικό παράγοντα.

Abstract

Surface MHC II antigen expression fires-up the antigen presentation process through the endocytic pathway and the consequent development of immune response. The absence of surface MHC II antigens is used by a variety of cancers, including leukemias, to escape immune surveillance. The invariant chain, Ii or CD74 is a key protein for the endocytic pathway and MHC II molecules, which apart from its role as a chaperone for MHC II molecules, is known to be a cognate receptor for macrophage migration inhibitory factor, MIF. Though, the triggering of a MIF signal transduction, which can promote cancer, requires a CD74 co-receptor, such as, CXCR4. In the present study, K562 and HL-60 leukemic cell lines were used, to determine by immunofluorescence and flow cytometry analysis, the effect of MIF and its receptors, CD74 and CXCR4 on the antigen presentation process, demonstrating a different behavior of CD74 in the two cell lines and consequently a differential antigen presentation potential. The absence of MHC II molecule expression from K562 cells has been correlated with the deficiency of the transcription factor CIITA. Using the stable transfectants K562-CIITA-K9, the profile of the molecules of interest was determined, and it was shown that CIITA positively affected the intracellular levels of CD74 and CXCR4. The interchange of membrane and intracellular expression levels of the proteins of interest, posed the question of whether the enzymatic catabolism of MIF, CD74 and CXCR4 could control pathogenesis of leukemic cells. Focusing on the catabolic action of cathepsins, which has been shown to relate with cancer cell propagation, the aspartyl-protease inhibitor, pepstatin-A, was used to evaluate the phenotypic reversion of K562 and HL-60 cells. The results showed that pepstatin-A increased CD74 and MHC II intracellular levels in K562 cells, providing K562 a potential for effective antigen presentation processes, while highlighting pepstatin-A as a novel anti-cancer agent.

1) Εισαγωγή

1.1) Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα υψηλά ευπροσάρμοστο αμυντικό σύστημα, που αναπτύχθηκε για να προστατεύει τους πολυκύτταρους οργανισμούς από διάφορους εισβολείς-παθογόνα. Διαθέτει την ικανότητα να παράγει μια μεγάλη ποικιλία μορίων μα και κυττάρων, που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και την εξολόθρευση των εισβολέων. Να τονιστεί ότι είναι ικανό να διακρίνει το ξένα μόρια και κύτταρα από αυτά του εαυτού. Επιπλέον, μπορεί να διακρίνει τα κύτταρα του εαυτού που έχουν τροποποιηθεί σε καρκινικά (*Goldsby and Goldsby 2003*).

Τα βασικά συστήματα ανοσίας στα σπονδυλωτά μπορούν να διακριθούν σε αυτό της **έμφυτης ανοσίας** ή μη ειδικής ανοσίας και σε αυτό της **προσαρμοστικής ανοσίας** ή ειδικής ανοσίας (*Goldsby and Goldsby 2003*). Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει τους μηχανισμούς της *πρώτης γραμμής άμυνας* του οργανισμού, όπως οι βλεννογόνοι, το δέρμα, τα ειδικά για το ανοσοποιητικό φαγοκύτταρα, τα μακροφάγα και ορισμένα διαλυτά μόρια, όπως ιντερφερόνες, η λυσοζύμη, το συμπλήρωμα. Η προσαρμοστική ανοσία, εξαρτάται από την έμφυτη καθώς ξεκινά ως απόκριση σε μια μόλυνση, δραστηριοποιείται στην **ειδική** αναγνώριση, εξάλειψη και τέλος **απομνημόνευση** του εισβολέα. Η αντιγονική ειδικότητα είναι εκείνη που επιτρέπει στην προσαρμοστική ανοσία να αναγνωρίζει λεπτές διαφορές μεταξύ των διάφορων αντιγόνων (*Goldsby and Goldsby 2003*).

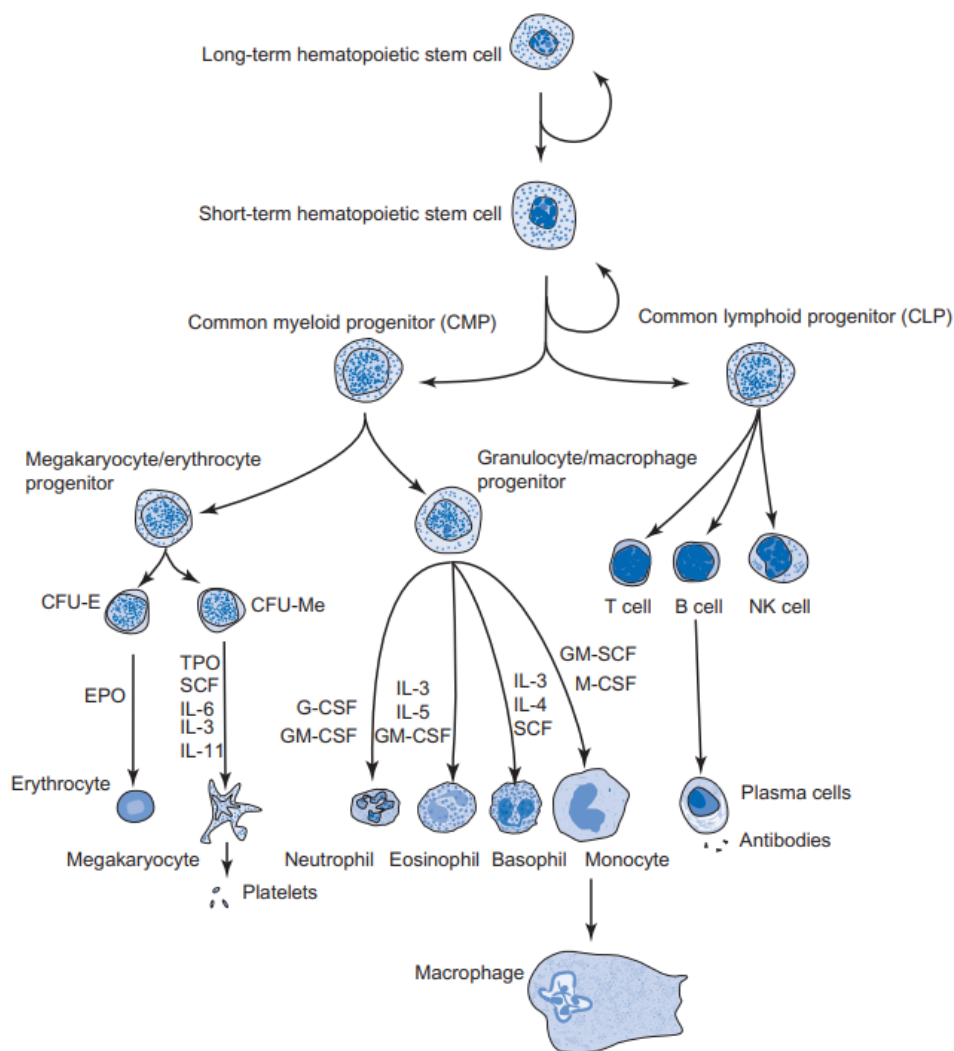
Η προσαρμοστική ανοσία μπορεί να διακριθεί σε **χυμική** και **κυτταροτοξική/ κυτταρομεσολαβούμενη**. Κατά την χυμική, τα Β-λεμφοκύτταρα αποδίδουν στη λέμφο τα αντισώματα, που είναι ειδικά για τον εισβολέα, ενώ κατά την κυτταροτοξική, τα Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται για να εξολοθρεύσουν τα μολυσμένα από τον εισβολέα κύτταρα (*Goldsby and Goldsby 2003*).

1.2) Η διαδικασία της αιμοποίησης

Η αιμοποίηση αφορά την διαδικασία παραγωγής ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς και αιμοπεταλίων και ξεκινά στον εμβρυικό λεκιθικό σάκο κατά τις πρώτες εβδομάδες της ανάπτυξης. Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα *αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο* (hematopoietic stem cell, HSC) με υψηλή ικανότητα **αυτοανανέωσης** και **διαφοροποίησης** (*Goldsby and Goldsby 2003*). Τα

αρχέγονα κύτταρα του λεκιθικού σάκου διαφοροποιούνται σε προγονικά ερυθροειδή κύτταρα, εκφράζοντας την εμβρυική αιμοσφαιρίνη (HbF). Μέχρι τον τρίτο μήνα της εγκυμοσύνης, τα HSC μεταναστεύουν από τον εμβρυϊκό σάκο στο εμβρυϊκό συκώτι και τέλος αποικίζουν στον σπλήνα. Το συκώτι και ο σπλήνας αποτελούν τα κύρια όργανα αιμοποίησης από τον τρίτο έως και τον έβδομο μήνα της εγκυμοσύνης. Κατόπιν του εβδόμου μήνα της κύησης, μετά τη γέννηση και σε όλη την ενήλικη ζωή, η αιμοποίηση λαμβάνει χώρα στον **μυελό των οστών** καθιστώντας τον πρωτογενές λεμφικό όργανο (*Goldsby and Goldsby 2003*). Ο μυελός των οστών προσφέρει ένα κατάλληλο *μικροπεριβάλλον* με συνθήκες τέτοιες, ώστε να προάγεται η αιμοποίηση. Εκεί τα αιμοποιητικά κύτταρα και οι απόγονοί τους αναπτύσσονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν σε ένα δίκτυο ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων, λιπιδίων κυττάρων και μακροφάγων (stromal cells), υπό την επίδραση αυξητικών αιμοποιητικών παραγόντων όπως colony stimulating factors (CSFs), ερυθροποιητίνης, θρομβοποιητίνης, καθώς και ιντερλευκινών (*Feher 2012, Hoffman and Marcellino 2020*).

Στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης, ένα HSC μπορεί να διαφοροποιηθεί σε ένα προγονικό κύτταρο της *μυελικής σειράς (lineage)* ή σε ένα πρόγονο κύτταρο της *λεμφικής σειράς*. Τα πρόγονο κύτταρα της μυελικής σειράς θα διαφοροποιηθούν τελικά σε ερυθρά αιμοσφαίρια και κάποιες κατηγορίες λευκών αιμοσφαιρίων (σιτευτικά κύτταρα, δενδριτικά, κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, αιμοπετάλια), ενώ τα προγονικά κύτταρα της λεμφικής σειράς θα διαφοροποιηθούν δίνοντας τελικά B και T λεμφοκύτταρα, καθώς και φυσικούς φονιάδες (NK cells) (*Goldsby and Goldsby 2003*).



Εικόνα 1: Η διαφοροποίηση και η ωρίμανση των λευκών αιμοσφαιρίων (Feher 2012).

Το αιμοποιητικό σύστημα είναι οργανωμένο με τέτοια ιεραρχία, ώστε το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού των προγονικών κυττάρων να είναι αυτά με τη χαμηλότερη ικανότητα διαφοροποίησης και χωρίς την ικανότητα της αυτοανανέωσης, με αποτέλεσμα τα κύτταρα, τα οποία θα προέρθουν από αυτά, δηλαδή τα τελικώς διαφοροποιημένα να μην έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού. Με αυτό τον τρόπο, ελαττώνεται η πιθανότητα πρόκλησης ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και συνεπώς συσσώρευσης μεταλλαγών κατά την αντιγραφή του DNA και η πρόκληση καρκίνου στους ενδιάμεσους κυτταρικούς απογόνους (Goldsby and Goldsby 2003).

1.3) Τα κύτταρα του αίματος

Το αίμα είναι το υγρό που κυκλοφορεί μέσω της καρδιάς και του αγγειακού συστήματος σε όλο τον οργανισμό, επιτελώντας την απόθεση θρεπτικών συστατικών στους ιστούς και την απομάκρυνση παραπροϊόντων του μεταβολισμού από αυτούς. Το κύριο συστατικό του είναι το **πλάσμα** (άμορφο συστατικό) μέσα στο οποίο αιωρούνται τα *έμμορφα* συστατικά του αίματος, δηλαδή τα **λευκά αιμοσφαίρια**, τα **ερυθρά αιμοσφαίρια** και τα **αιμοπετάλια**.

Τα **ερυθρά αιμοσφαίρια** ή ερυθροκύτταρα (RBCs) είναι τα πλέον πολυάριθμα κύτταρα στην κυκλοφορία, αποτελώντας το 40% του όγκου του αίματος. Παράγονται από τον μυελό των οστών προερχόμενα από την μυελική σειρά, είναι απύρρηνα κύτταρα και περιέχουν την αιμοσφαιρίνη, πρωτεΐνη υπεύθυνη για την απόθεση του O₂ στους ιστούς και την απομάκρυνση του CO₂ από αυτούς. Η αιμοσφαιρίνη είναι αυτή που χαρίζει στο αίμα το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του. Ο μέσος όρος ζωής των RBCs είναι περίπου 120 μέρες.

Τα **αιμοπετάλια** ή θρομβοκύτταρα είναι κυτταρικά θραύσματα διαμέτρου 2-4 μm. Παράγονται από τον μυελό των οστών, προέρχονται και αυτά από την μυελική σειρά, από κύτταρα που ονομάζονται μεγακαρυοκύτταρα, τα οποία παράγουν αιμοπετάλια μετά τον κατακερματισμό του κυτταροπλάσματός τους. Είναι υπεύθυνα για την πήξη του αίματος και την αναστολή της αιμορραγίας (αιμόσταση), αποκαθιστώντας τη βλάβη στα τοιχώματα των αγγείων. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη μετατροπή του *ινωδογόνου* σε ένα μη διαλυτό πρωτεϊνικό πλέγμα, το *ινώδες* και καταλύεται από το ένζυμο, θρομβίνη. Το *ινώδες* εγκλωβίζει τα RBCs, δημιουργώντας ένα θρόμβο στην περιοχή του κατεστραμμένου ιστού, εμποδίζοντας την περαιτέρω απώλεια του αίματος.

Τα **λευκά αιμοσφαίρια** (WBCs) είναι άχρωμα κύτταρα που διαθέτουν πυρήνα και προέρχονται είτε από τη μυελική είτε από τη λεμφική σειρά. Ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι κοκκίων στο κυτταρόπλασμά τους κατατάσσονται σε **κοκκιοκύτταρα** ή **ακοκκιοκύτταρα**, αντίστοιχα (Hartenstein 2006).

1.3.1) Κοκκιοκύτταρα

1.3.1α) Βασεόφιλα

Τα βασεόφιλα παράγονται από των μυελό των οστών, προερχόμενα από τη μυελική σειρά, διαθέτουν λοβωτό πυρήνα (συνήθως δίλοβος) και ένα

έντονα κοκκιώδες κυτταρόπλασμα που βάφεται με το βασικό κυανό του μεθυλενίου, αποδίδοντας ένα πορφυρο-κόκκινο χρώμα. Είναι τα μόνα μη φαγοκυτταρικά κοκκιοκύτταρα και από τα κοκκία τους απελευθερώνουν στην περιφέρεια ουσίες με σοβαρό ρόλο στην ανάπτυξη αλλεργικών αντιδράσεων (π.χ. ισταμίνη) (*Goldsby and Goldsby 2003*). Η διάμετρος τους είναι 12-15 μm και αποτελούν λιγότερο από 1% των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα.

1.3.1β) Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα παράγονται από τον μυελό των οστών, προερχόμενα και αυτά από την μυελική σειρά, διαθέτουν συνήθως δίλοβο πυρήνα και κοκκιώδες κυτταρόπλασμα που βάφεται με το όξινο ερυθρό της ηωσίνης, αποδίδοντας πορτοκαλο-κόκκινο χρώμα. Είναι φαγοκυτταρικά κοκκιοκύτταρα με ικανότητα μετανάστευσης από το αίμα στους ιστούς (*Goldsby and Goldsby 2003*). Η διάμετρός τους είναι 9 μm στο αίμα και 14 μm στους ιστούς. Επιτελούν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού εναντίων παρασιτικών οργανισμών, κατά την οποία απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κυστιδίων (υδρολυτικά ένζυμα και ROS) τους προκαλώντας βλάβες στις μεμβράνες των παρασίτων. Οι αριθμοί τους ανεβαίνουν σε άτομα που υποφέρουν από αλλεργίες, όπως το άσθμα και ο πυρετός εκ χόρτου καθώς και σε προσβεβλημένα από παράσιτα άτομα.

1.3.1γ) Ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα παράγονται από τον μυελό των οστών, προερχόμενα από τη μυελική σειρά και διαθέτουν πολυλοβωτό πυρήνα και κοκκιώδες κυτταρόπλασμα που βάφεται και με όξινες και με βασικές χρωστικές. Μετά την παραγωγή τους εισέρχονται στην κυκλοφορία για κάποιες ώρες μέχρι να μεταναστεύσουν στους ιστούς, όπου και παραμένουν για ορισμένες μέρες (*Goldsby and Goldsby 2003*). Αποτελούν, όπως και τα ηωσινόφιλα, φαγοκυτταρικά κύτταρα και μαζί με τα μακροφάγα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Φέρουν Fc υποδοχείς, υποδοχείς για συστατικά του συμπληρώματος καθώς και υποδοχείς για πολυσακχαρίτες βακτηρίων. Έχουν διάμετρο 10-12 μm και αποτελούν το 50-70% των κυκλοφορούντων λευκών αιμοσφαιρίων. Ο αριθμός τους αυξάνεται σε περιπτώσεις μολύνσεων από βακτήρια, μύκητες καθώς και ιούς.

1.3.2) Ακοκκιοκύτταρα

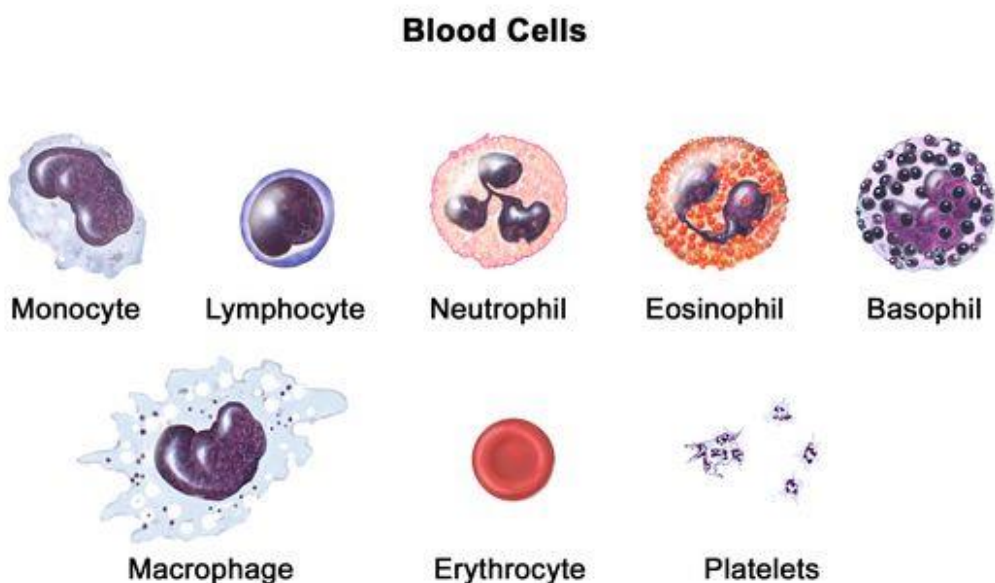
1.3.2α) Μονοπύρηνα-Μακροφάγα

Τα μονοπύρηνα ή μονοκύτταρα παράγονται από τον μυελό των οστών και προέρχονται από τη μυελική σειρά. Αποτελούν τα μεγαλύτερα από τα λευκά αιμοσφαίρια με διάμετρο 12-18μm. Κατά την αιμοποίηση στον μυελό των οστών τα προγονικά κύτταρα των μονοκυττάρων διαφοροποιούνται σε προ-μονοκύτταρα, τα οποία εξέρχονται από τον μυελό των οστών και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου και διαφοροποιούνται τελικώς σε ώριμα μονοκύτταρα με πλήρη πλέον φαγοκυτταρική ικανότητα (*Goldsby and Goldsby 2003*). Κυκλοφορούν στο αίμα για περίπου 8 ώρες και όταν μεταναστεύουν στους ιστούς διαφοροποιούνται σε ειδικά για τον εκάστοτε ιστό, μακροφάγα. Η διαφοροποίηση του μονοκυττάρου σε μακροφάγο ενέχει πλήθος αλλαγών, όπως αύξηση του μεγέθους κατά 5-10 φορές, αύξηση μεγέθους και πολυπλοκότητας ενδοκυτταρικών οργανιδίων, αύξηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας και της παραγωγής τόσο υδρολυτικών ενζύμων όσο και διαλυτών παραγόντων (*Goldsby and Goldsby 2003*). Τα μακροφάγα διαδραματίζουν ένα αξιοσημείωτο ρόλο στην ανοσολογική απόκριση, καθώς είναι **αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs)**, που σημαίνει ότι εφόσον αναγνωρίσουν ένα αντιγόνο θα παρουσιάσουν τμήματα αυτού στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα στο πλαίσιο της χυμικής ανοσίας ή την ενεργοποίηση T-κυτταροτοξικών κυττάρων για τη θανάτωση κυττάρων στόχων, κατά την κυτταρική ανοσία (*Goldsby and Goldsby 2003*). Η ικανότητα των μακροφάγων να παρουσιάζουν τμήματα του αντιγόνου στην κυτταρική επιφάνειά τους οφείλεται στην υψηλή παρουσία μορίων **MHC τάξης II**.

1.3.2β) Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 20-40% των λευκών αιμοσφαιρίων και το 99% των κυττάρων της λέμφου. Το μέγεθος των λεμφοκυττάρων στο αίμα ποικίλει από μικρό σε μεγάλο με το κύριο χαρακτηριστικό τους να είναι ο σφαιρικός πυρήνας. Κυκλοφορούν συνεχώς στο αίμα και τη λέμφο και είναι ικανά να μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς και στα λεμφικά όργανα. Είναι τα μόνα λευκά αιμοσφαίρια που μπορούν από τους ιστούς να επιστρέψουν στο περιφερικό αίμα μέσω μιας διαδικασίας γνωστής και ως *διαπίδυση*. Υποδιαιρούνται σε 3 κύριους πληθυσμούς ανάλογα τα μόρια που εκφράζονται στην επιφάνειά τους και τη λειτουργία τους, τα **B-λεμφοκύτταρα**, τα **T-λεμφοκύτταρα** και τους

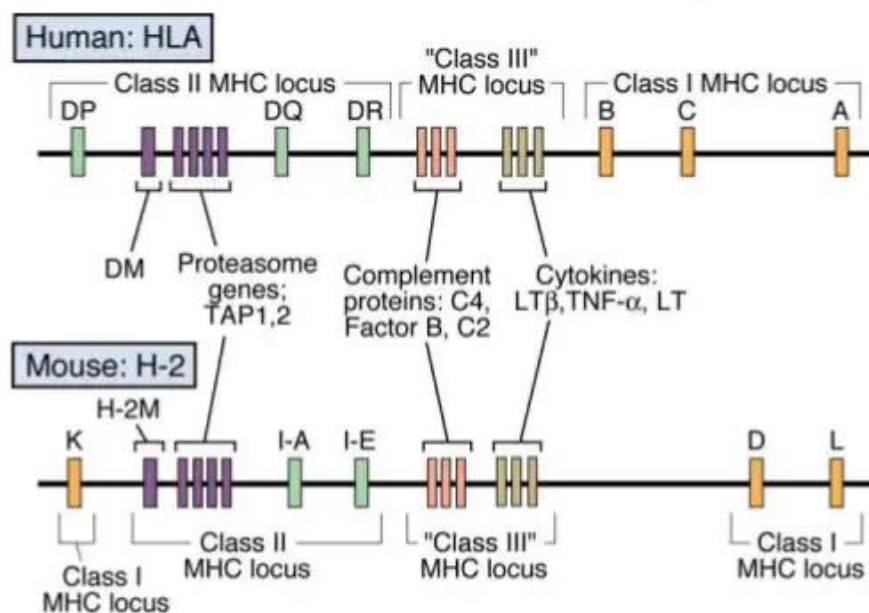
Φυσικούς Φονιάδες (*Goldsby and Goldsby 2003*). Τα Β-λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στον μυελό των οστών και προέρχονται από τη λεμφική σειρά. Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγονται από τον μυελό των οστών, όμως ωριμάζουν και εκπαιδεύονται στον **θύμο αδένα** (πρωτογενές λεμφικό όργανο). Μετά την ωρίμανση τόσο τα Β όσο και τα Τ λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπως ο **σπλήνας** και οι **λεμφαδένες**. Οι λειτουργίες τους αφορούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του αντισώματος κατά την μόλυνση με εξωγενή αντιγόνα, όπως βακτήρια και μύκητες. Τα Τ-λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους υποδιαιρούνται σε δύο κύριους πληθυσμούς, τα **Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα** (CD4+), που μόλις αναγνωρίσουν το παρουσιασμένο από τα APCs αντιγόνο θα προσελκύσουν τα Β-λεμφοκύτταρα και τα **Τ-κυτταροτοξικά** (CD8+) που είναι υπεύθυνα για την θανάτωση κυτταρικών στόχων που φέρουν ενδογενή αντιγόνα όπως ιοί, καρκινικά κύτταρα και ξένα μοσχεύματα (*Goldsby and Goldsby 2003*).



Εικόνα 2: Τα συστατικά του αίματος, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μακροφάγα, ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια. <https://www.cancer.gov>

1.4) Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας-Major Histocompatibility Complex (MHC)

Κάθε είδος θηλαστικού που έχει μελετηθεί έως σήμερα διαθέτει ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα γονιδίων που αποτελούν το **Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (MHC)**, τα προϊόντα του οποίου διαδραματίζουν βασικότατο ρόλο στη διακυτταρική αναγνώριση και στη διάκριση των εαυτών συστατικών από τα μη εαυτά συστατικά (*Goldsby and Goldsby 2003*). Τα γονιδιακά προϊόντα του MHC παίρνουν μέρος τόσο στην **χυμική** όσο και στην **κυτταροτοξική/κυτταρομεσολαβούμενη** ανοσολογική απόκριση. Τα γονίδια του MHC διατάσσονται μέσα σε μια μακριά συνεχόμενη περιοχή του **χρωμοσώματος 6** στον άνθρωπο που ονομάζεται σύμπλεγμα **HLA** (HLA complex), ενώ στον ποντικό διατάσσονται στο **χρωμόσωμα 17** και ονομάζεται σύμπλεγμα **H-2** (H-2 complex) (*Goldsby and Goldsby 2003*).



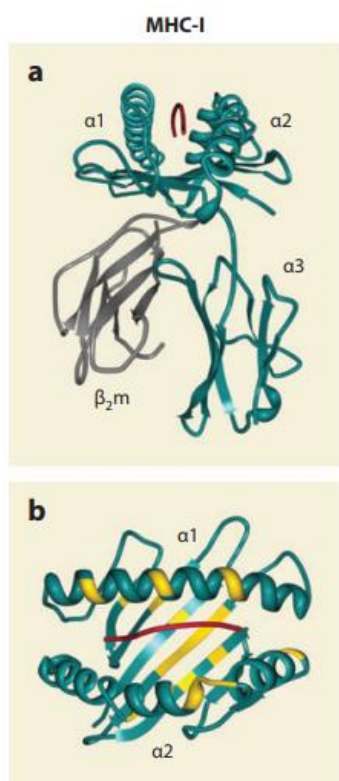
Εικόνα 3: Ο γονιδιακός τόπος του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) σε άνθρωπο (πάνω) και ποντικό (κάτω). <https://www.slideshare.net/sreerajsree/major-histocomatabilty>

Παρόλο που η διεύθυνση των γονιδίων διαφέρει λίγο μεταξύ των δύο ειδών, σε κάθε περίπτωση, τα γονίδια του MHC οργανώνονται έτσι ώστε να κωδικοποιούν **3 τάξεις/κατηγορίες πρωτεϊνικών μορίων**.

1.4.1) Τα MHC I μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα MHC I γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη **σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων** του

οργανισμού και εμφανίζουν υψηλό βαθμό γλυκοζυλίωσης. Η κύρια λειτουργία τους είναι η **παρουσίαση** αντιγονικών επιτόπων στα **T-κυτταροτοξικά κύτταρα (CD8+)** (Goldsby and Goldsby 2003).



Εικόνα 4: α) Η τρισδιάστατη δομή του MHC-I
β) Η δομή των πολυμορφικών αλυσίδων α1 και α2 (Blum, Wearsch et al. 2013).

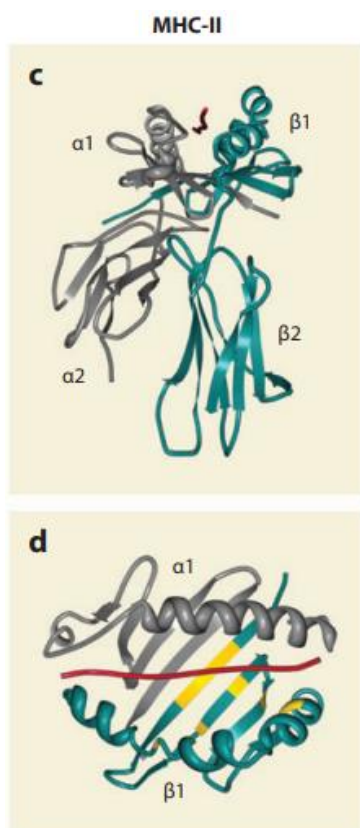
Οι πρωτεΐνες MHC I αποτελούνται από μια **α-αλυσίδα** μεγέθους 45 kDa, η οποία συνδέεται μη ομοιοπολικά με ένα μόριο **β2-μικροσφαιρίνης**, μεγέθους 12 kDa (Goldsby and Goldsby 2003). Η α-αλυσίδα είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, κωδικοποιούμενη από τα γονίδια που βρίσκονται στο σύμπλεγμα **HLA-A,B,C** του ανθρώπου (Goldsby and Goldsby 2003). Η α-αλυσίδα αποτελείται από **τρεις επικράτειες (domains)**, **α1, α2, α3**, καθεμία από τις οποίες έχει περίπου 90 αμινοξέα, μια διαμεμβρανική

περιοχή από περίπου 25 υδρόφοβα αμινοξέα, ακολουθούμενη από μια μικρή υδρόφιλη αμινοξική αλληλουχία και τέλος από ένα σταθεροποιητικό κυτταροπλασματικό τμήμα περίπου 30 αμινοξικών καταλοίπων. Η α3 επικράτεια έχει υψηλή ομολογία με την β2 μικροσφαιρίνη και με το σταθερό τμήμα των ανοσοσφαιρινών. Η α3 και β2 μικροσφαιρίνη οργανώνονται σε δύο β-πτυχωτά φύλλα, καθένα εκ των οποίων αποτελείται από β-αντιπαράλληλους κλώνους (**ανοσοσφαιρινική αναδίπλωση**) (Goldsby and Goldsby 2003). Οι α1 και α2 επικράτειες διαθέτουν **υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας** και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας μια πλατφόρμα 8 β-αντιπαράλληλων κλώνων που εκτείνονται μεταξύ 2 μακρών τμημάτων α-έλικας. Η περιοχή αυτή έχει διαστάσεις $25\text{\AA} * 10\text{\AA} * 11\text{\AA}$ και δημιουργεί μια αύλακα, που ονομάζεται **αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου** (peptide-binding cleft) (Goldsby and Goldsby 2003). Βρίσκεται στην ανώτερη επιφάνεια του MHC I μορίου και προσδένει πεπτίδια μήκους **8-10 αμινοξικών καταλοίπων** (Brändén and Tooze 1999, Goldsby and Goldsby 2003). Η αλληλεπίδραση της α-αλυσίδας και της β2-μικροσφαιρίνης είναι απαραίτητη προκειμένου το MHC I μόριο να λάβει

τη σωστή στερεοδιαμόρφωσή του. Μόλις το μόριο MHC I συνδέσει και αντιγονικό πεπτίδιο οδηγείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Goldsby and Goldsby 2003). Τα αντιγονικά πεπτίδια που θα φορτωθούν στα MHC-I μόρια προκύπτουν κυρίως μέσω της πρωτεόλυσης του 26s ανοσοπρωτεασώματος (Neefjes, Jongema et al. 2011, Blum, Wearsch et al. 2013). Τα MHC-I φορτώνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) εφ' όσον τα αντιγονικά πεπτίδια βρεθούν εκεί από το κυτταρόπλασμα (translocation). Η αντιγονοπαρουσιαστική αυτή οδός αποκαλείται **κυτταροπλασματική** και αφορά τα **ενδογενή** αντιγόνα (Goldsby and Goldsby 2003).

1.4.2) Τα MHC II μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα MHC II γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη **μόνο** των **αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων** (APCs), όπως δενδριτικά κύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα και εμφανίζουν υψηλό βαθμό γλυκοζυλίωσης. Η κύρια λειτουργία τους είναι η **παρουσίαση** του αντιγονικού πεπτιδίου στα **T-βοηθητικά κύτταρα** (CD4+) (Goldsby and Goldsby 2003).

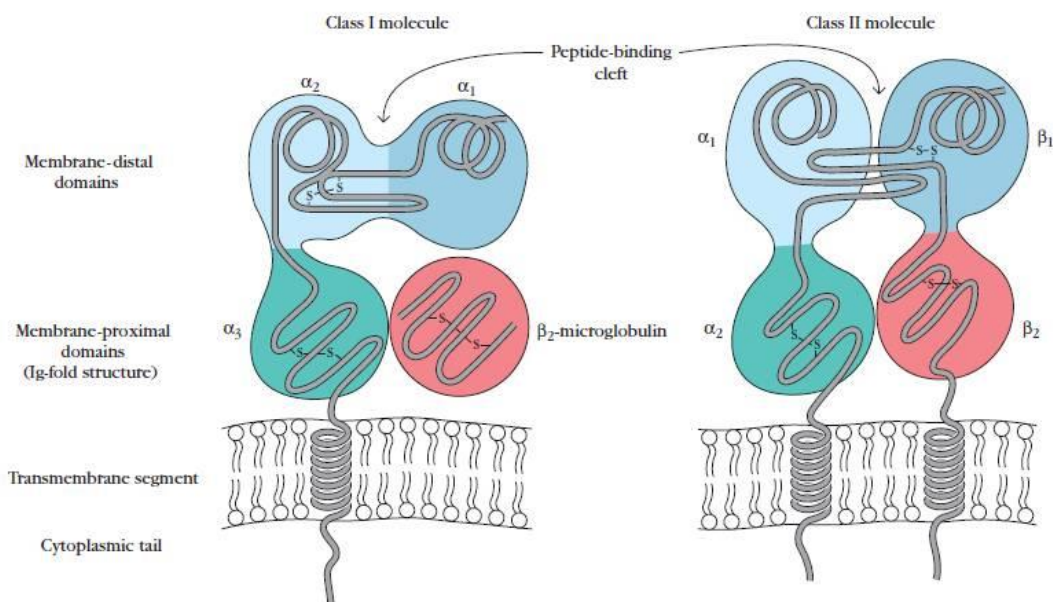


Εικόνα 5: α) Η τρισδιάστατη δομή του MHC-II
 β) Η δομή των πολυμορφικών αλυσίδων α1 και β2 (Blum, Wearsch et al. 2013).

Τα μόρια MHC II αποτελούνται από 2 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μια **α αλυσίδα** μεγέθους 33kDa και μια **β αλυσίδα** 28kDa που συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιολογικές αλληλεπιδράσεις (Goldsby and Goldsby 2003). Κωδικοποιούνται από τις **HLA-DR, DP, DQ** γονιδιακές περιοχές στον άνθρωπο (Goldsby and Goldsby 2003). Είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και διαθέτουν εξωτερικές επικράτειες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα σταθεροποιητικό κυτταροπλασματικό τμήμα (Goldsby and Goldsby 2003). Η **α-αλυσίδα** και η **β-αλυσίδα** αποτελούνται από δύο επικράτειες, **α1** και **α2** και **β1** και **β2**, αντίστοιχα (Goldsby and

Goldsby 2003). Οι πιο κοντινές στη μεμβράνη **α2** και **β2** παρουσιάζουν

χαμηλότερη ποικιλομορφία και έχουν ανοσοσφαιρινικό μοτίβο αναδίπλωσης, σε σχέση με τις εξωτερικές $\alpha 1$ και $\beta 1$ επικράτειες, στις οποίες γίνεται το φόρτωμα του αντιγονικού πεπτιδίου στην περιοχή της **αύλακας πρόσδεσης πεπτιδίου** (Brändén and Tooze 1999, Goldsby and Goldsby 2003). Τα MHC II έχουν διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης από τα MHC I (Brändén and Tooze 1999). Προσδέχουν μεγαλύτερα των **10 αμινοξέων πεπτίδια** με τα άκρα τους να εκτείνονται από την αύλακα πρόσδεσης (Brändén and Tooze 1999). Τα MHC II αναγνωρίζουν ειδικά πλευρικές ομάδες σε περισσότερες θέσεις στο αντιγονικό πεπτίδιο απ' ό,τι τα MHC I (Brändén and Tooze 1999). Η διαφορά στην ικανότητα πρόσδεσης μεταξύ των MHC I και MHC II οφείλεται σε **διαφοροποιήσεις στην αύλακα πρόσδεσης** (Brändén and Tooze 1999). Τα MHC I διαθέτουν συντηρημένα πρόσθετα αμινοξικά κατάλοιπα στην αύλακα πρόσδεσης, που φτιάχνουν δεσμούς υδρογόνου με το αντιγονικό πεπτίδιο και δεν του επιτρέπουν να εξέλθει από αυτή (Brändén and Tooze 1999). Η διαφορά στην ειδικότητα πρόσδεσης θα μπορούσε να οφείλεται και στους **διαφορετικούς μηχανισμούς συγκρότησης** των δυο πρωτεϊνικών μορίων (Brändén and Tooze 1999).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των MHC-I και MHC-II.

<https://www.ask4biology.com/major-histocompatibility-complex-mhc/>

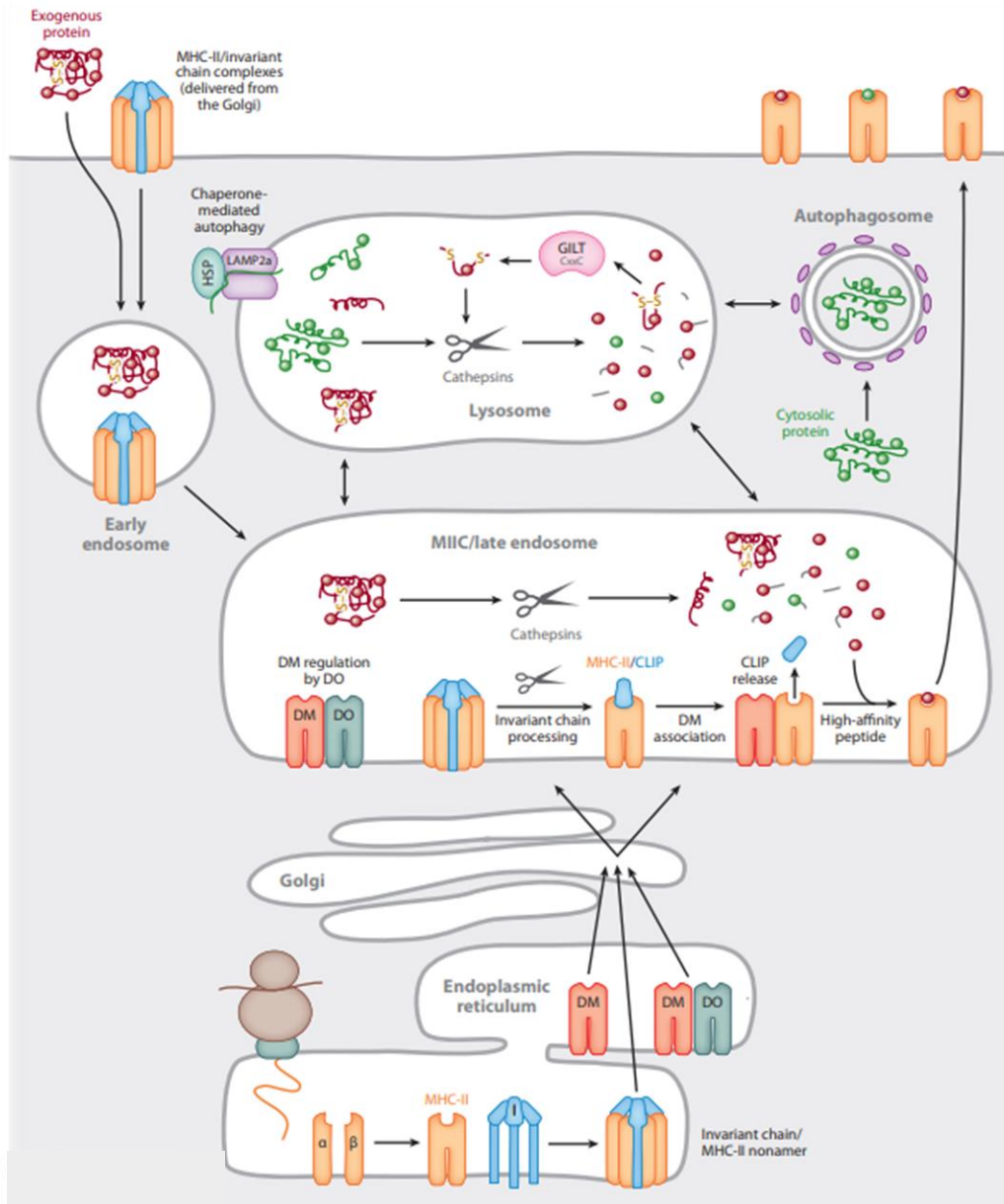
1.4.3) Τα MHC III μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα γονίδια MHC III κωδικοποιούν για διάφορες **εκκριτικές πρωτεΐνες** με ανοσολογικές λειτουργίες, όπως διάφορα συστατικά του συμπληρώματος που σχετίζονται με τη **φλεγμονή**, C4, C2 και BF καθώς και κυτοκίνες, όπως ο TNF (tumor necrosis factor) (*Goldsby and Goldsby 2003*).

1.5) Η κλασική περιορισμένη από HLA-τάξης II αντιγονοπαρουσίαση: Το ενδοκυτταρικό μονοπάτι

Τα **εξωγενή** αντιγόνα, τα οποία προσλαμβάνονται από τα **αντιγονοπαρουσιαστικά** κύτταρα μέσω **ενδοκυττάρωσης** ή φαγοκυττάρωσης, σε κυστίδια επικαλυμμένα με **κλαθρίνη**, υφίστανται επεξεργασία μέσω της **ενδοκυτταρικής οδού** (endocytic pathway) και παρουσιάζονται στη μεμβράνη φορτωμένα στα **MHC II μόρια ιστοσυμβατότητας** (*Goldsby and Goldsby 2003, Neefjes, Jongtsma et al. 2011, Blum, Wearsch et al. 2013*).

Η ενδοκυτταρική οδός φαίνεται να περιλαμβάνει **τρία κύρια διαμερίσματα** αυξανόμενης οξύτητας, τα **πρώιμα ενδοσώματα** (pH=6,0-6,5), τα **ώριμα ενδοσώματα** ή πλέον **multivesicular bodies** ή **MHCs** (MHC-II containing compartments) (pH=5.0-6,0) (*Landsverk, Bakke et al. 2009, Neefjes, Jongtsma et al. 2011, Blum, Wearsch et al. 2013*) και τα **λυσοσώματα** (pH=4,5-5,0) (*Goldsby and Goldsby 2003*).



Εικόνα 7: Το HLA-class II περιορισμένο μονοπάτι ή η ενδοκυτταρική οδός αντιγονοπαρουσίασης (Blum, Wearsch et al. 2013).

Το εξωγενές αντιγόνο, μετά την πρόσληψή του, μετακινείται από τα πρώιμα (περιφέρεια του κυττάρου) προς τα ώριμα ενδοσώματα και τελικά στα λυσοσώματα, όπου θα έρθει αντιμέτωπο με υδρολυτικά ένζυμα και όλο και πιο χαμηλά pH σε κάθε ενδοκυτταρικό διαμέρισμα (Goldsby and Goldsby 2003). Το ενδοκυττάριο αντιγόνο αποικοδομείται σε ολιγοπεπτίδια των 13-18 αμινοξικών καταλοίπων, που δεσμεύονται από τα MHC II και προστατεύονται από την περαιτέρω πρωτεόλυση. Επειδή τα υδρολυτικά ένζυμα είναι ενεργά σε χαμηλά pH, η επεξεργασία του αντιγόνου μπορεί να παρεμποδιστεί με χημικούς παράγοντες που

αυξάνουν το pH στα διαμερίσματα, όπως η *χλωροκίνη* καθώς και από αναστολείς πρωτεασών όπως η *λευπεπτίνη* (Goldsby and Goldsby 2003) και η *πεπστατίνη*. Τελικά, τμήματα των ενδοκυττάρων διαμερισμάτων επιστρέφουν στην περιφέρεια του κυττάρου, όπου και συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη ώστε να ανακυκλωθούν ως επιφανειακοί υποδοχείς (Goldsby and Goldsby 2003).

1.5.1) Η λειτουργία του CD74 ή σταθερής αλυσίδας (Ii) ως μοριακός συνοδός των MHC II

Κατά τη σύνθεση ενός μορίου MHC II στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, **τρία ζεύγη** ετεροδιμερών αλυσιδών **αβ MHC II** συνδέονται με τον **τριμερή** μοριακό συνοδό, **CD74** ή **αμετάβλητη αλυσίδα** (Ii, invariant chain), δημιουργώντας ένα πενταμερές, στη συνέχεια ένα επταμερές και τέλος ένα ολιγομερές (**αβIi**)₃ (*nonamer*) με δυνατότητα εξόδου από το ER (Landsverk, Bakke et al. 2009, Fortin, Cloutier et al. 2013). Ο CD74 διαθέτει μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά, μια διαμεμβρανική περιοχή που διαθέτει μοτίβα για τον τριμερισμό του, μια εξωκυττάρια περιοχή, που διαθέτει την αλληλουχία για **αλληλεπίδραση με τα MHC II** (η **CLIP** αλληλουχία) και μια επικράτεια τριμερισμού στο καρβοξυτελικό άκρο του (Fortin, Cloutier et al. 2013). Είναι πιθανό, ότι ο CD74 αυτό-τριμερίζεται πριν την αλληλεπίδραση με το MHC II και σε αυτό βοηθούν τόσο τα μοτίβα της διαμεμβρανικής περιοχής όσο και η επικράτεια τριμερισμού (Landsverk, Bakke et al. 2009).

Ο CD74 δρα ως **φύλακας** των MHC II, αλληλεπιδρώντας με την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του MHC II μορίου, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση των ενδογενώς παραγόμενων πεπτιδίων, ενώ χρησιμεύει και ως **ικρίωμα** για την αναδίπλωση και την αλληλεπίδραση των α και β αλυσιδών των MHC II (Roche and Cresswell 1990, Goldsby and Goldsby 2003, Blum, Wearsch et al. 2013, Fortin, Cloutier et al. 2013, Bucala and Shachar 2014, Schröder 2016).

Τέλος, ο CD74 δρα και ως **καθοδηγητής** των MHC II κατά τη μεταφορά τους από το **αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο** προς το trans-Golgi και τα **ενδοσωμικά κυστίδια** (Goldsby and Goldsby 2003, Landsverk, Bakke et al. 2009, Neefjes, Jongsma et al. 2011, Blum, Wearsch et al. 2013, Fortin, Cloutier et al. 2013, Schröder 2016). Για την ακρίβεια, ο CD74 καθοδηγεί τη μεταφορά των MHC II από το ER στα MHCs μέσω δυο κλασσικών **μοτίβων δι-λευκίνης**, που διαθέτει στην κυτταροπλασματική του ουρά (Landsverk, Bakke et al. 2009, Blum, Wearsch et al. 2013, Schröder 2016). Αυτά τα μοτίβα επίσης,

αναγνωρίζονται από τους **κλαθρινικούς-προσαρμοστές** του **trans-Golgi, AP1** (trans-Golgi network adaptors) και της **κυτταρικής μεμβράνης, AP2** (plasma membrane adaptor) (Hofmann, Höning et al. 1999, Neeffjes, Jongmsma et al. 2011). Έτσι, ο CD74 κατευθύνει απευθείας τα MHC-II από το ER, στο trans-Golgi σε κυστίδια AP1/κλαθρίνης και από κει στα MHCs ή μέσω ενδοκύττωσης στην κυτταρική μεμβράνη (Roche, Teletski et al. 1993, Hofmann, Höning et al. 1999, Neeffjes, Jongmsma et al. 2011, Blum, Wearsch et al. 2013).

Όσο, η πρωτεολυτική ικανότητα αυξάνει (δηλαδή το pH μειώνεται) σε κάθε διαδοχικό διαμέρισμα, ο CD74 σταδιακά αποικοδομείται από ειδικές pH-ευαίσθητες ενδοσωμικές πρωτεάσες (π.χ. καθεψίνες), αφήνοντας ένα μικρό θραύσμα, **~20 αμινοξικών καταλοίπων**, στην αύλακα πρόσδεσης του MHC II, που ονομάζεται **CLIP** (Class II-associated invariant chain peptide) (Riberdy, Newcomb et al. 1992, Goldsby and Goldsby 2003, Blum, Wearsch et al. 2013). Οι κύριες πρωτεάσες του ενδοκυτταρικού μονοπατιού ανήκουν σε δύο μεγάλες οικογένειες πρωτεασών, τις κυστεΐνοπρωτεάσες, όπως η καθεψίνες B, H, S και L και τις ασπαρτυλοπρωτεάσες, όπως η καθεψίνες S και L. Η καθεψίνες S και L διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ωρίμανση των MHC II, γιατί είναι υπεύθυνες για την πρωτεόλυση του CD74 (Riese, Wolf et al. 1996, Nakagawa, Roth et al. 1998). Η καθεψίνες B και D είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των αντιγονικών πεπτιδίων (antigen processing) στα APCs (Rodriguez and Dimen 1995). Επιπλέον, η καθεψίνη D φαίνεται να παίζει ρόλο και στην αποικοδόμηση του CD74 (Zhang, Maekawa et al. 2000).

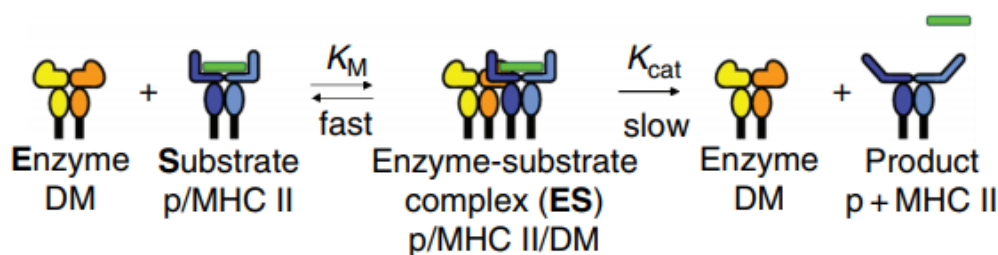
Το CLIP αποτρέπει την πρόωρη φόρτωση του MHC II με αντιγονικό πεπτίδιο. Η συγγένεια του CLIP για την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου είναι ταυτόσημη με αυτήν της αύλακας για το αντιγονικό πεπτίδιο. MHC-II αλληλία με χαμηλή χημική συγγένεια για το CLIP, έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη διάφορων αυτοανοσιών (Busch, Rinderknecht et al. 2005, Blum, Wearsch et al. 2013). Ενδεχομένως, το παραπάνω να αντανakλά στο ρόλο των MHC-II/CLIP συμπλόκων στην ρύθμιση της θυμικής επιλογής (Miyazaki, Wolf et al. 1996, Röhn, Boes et al. 2004).

1.5.2) Ο ρόλος των μη κλασσικών HLA-DM και HLA-DO

1.5.2α) HLA-DM: Ένας θετικός ρυθμιστής της αντιγονοπαρουσίασης

Η απελευθέρωση του CLIP από την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του MHC-II, καταλύεται από μια ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη,

κωδικοποιούμενη επίσης από το MHC, την **HLA-DM** (Morris, Shaman et al. 1994, Denzin and Cresswell 1995, Blum, Wearsch et al. 2013). Το ετεροδιμερές **α** και **β** αλυσίδων της HLA-DM, ενώ έχει υψηλή ομολογία με τα συμβατικά MHC-II μόρια, **δεν παρουσιάζει πολυμορφισμό**, δεν εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη και παραμένει στα MHCs (Goldsby and Goldsby 2003). Η κυτταροπλασματική επικράτεια της β αλυσίδας του DM περιέχει ένα μοτίβο τυροσίνης, υπεύθυνο για την παραμονή του DM στα MHCs. Το DM αλληλεπιδρά και με τον CD74, γεγονός που ναι μεν διευκολύνει, αλλά δεν είναι αναγκαίο για την στερεοδιαμόρφωση και την σταθερότητα το DM (Lindstedt, Liljedahl et al. 1995, Marks, Roche et al. 1995, Pierre, Shachar et al. 2000). Το DM λοιπόν, βρισκόμενο στα MHCs, **αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα MHC-II/CLIP**, επιφέροντας στερεοδιατακτικές αλλαγές, ώστε να **καταλυθεί η διάσταση του CLIP**. Η συγκεκριμένη αντίδραση σε όξινα pH περιγράφεται από την ενζυμική κινητική **Michaelis-Menten** (Denzin and Cresswell 1995, Sloan, Cameron et al. 1995).



Εικόνα 8: Η καταλυτική δράση του HLA-DM (Busch, Rinderknecht et al. 2005).

Από την στιγμή που το CLIP απομακρύνεται από την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του MHC-II, το τελευταίο φορτώνεται με αντιγονικό πεπτίδιο και μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη. Εκεί, το σύμπλοκο MHC-II/αντιγονικό πεπτίδιο θα αναγνωριστεί από τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4+) μέσω του **υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (TCR)** (Goldsby and Goldsby 2003). Το MHC II από την κυτταρική μεμβράνη μπορεί να ανακυκλωθεί είτε μέσω ενδοκύττωσης, ώστε να οδηγηθεί και πάλι στο ενδοσωμικό μονοπάτι, είτε κατόπιν ουβικιτινυλίωσης να οδηγηθεί στα όξινα διαμερίσματα και έπειτα σε αποικοδόμηση.

Το DM επίσης, μπορεί να **απομακρύνει χαμηλής χημικής συγγένειας** αντιγονικά πεπτίδια από τα MHC-II, επιτρέποντας μόνο την φόρτωση των τελευταίων με αντιγονικά πεπτίδια υψηλής χημικής συγγένειας (Kropshofer, Vogt et al. 1996). Γενικά, η φόρτωση του MHC-II με

αντιγονικό πεπτίδιο είναι ανεπαρκής χωρίς την έκφραση του DM από τα APCs, μολονότι έχει παρατηρηθεί απελευθέρωση του CLIP σε DM-/- APCs με πολύ πιο αργό ρυθμό (*Blum, Wearsch et al. 2013*).

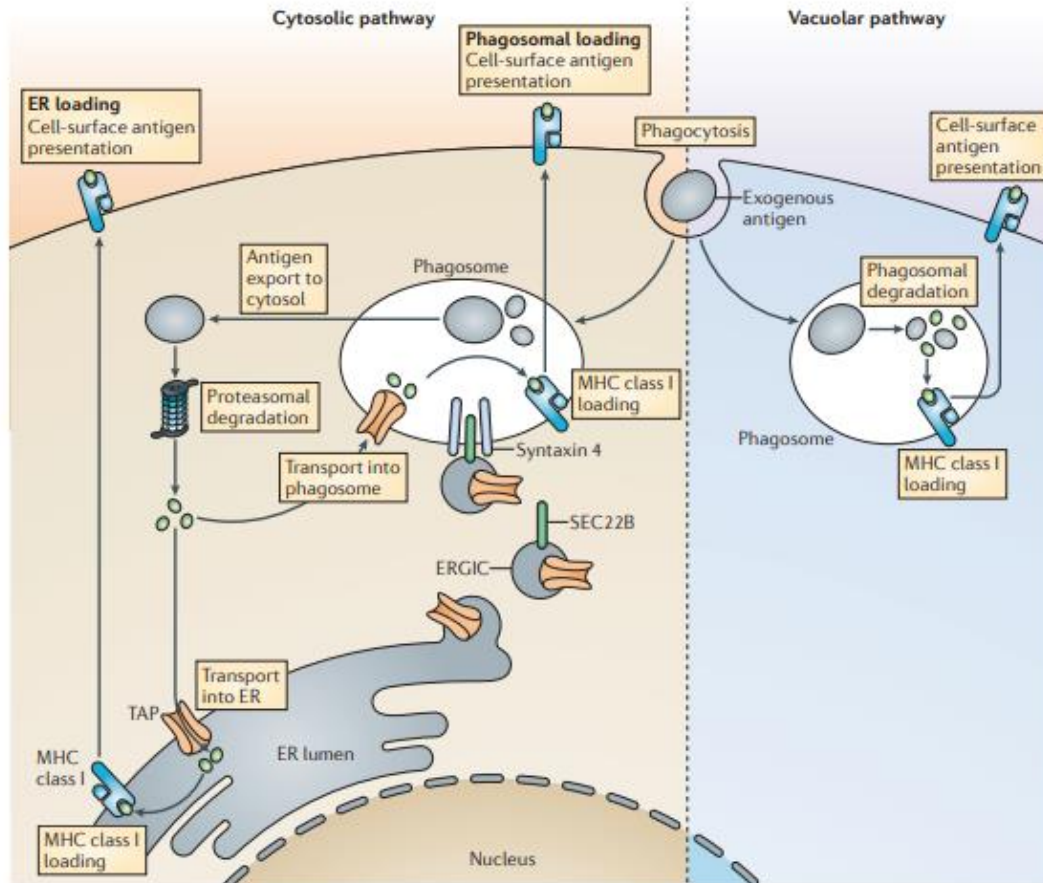
1.5.2β) HLA-DO: Ένας αρνητικός ρυθμιστής της αντιγονοπαρουσίασης

Η λειτουργία του DM διαμορφώνεται από ένα επίσης μη κλασσικό μόριο, μη πολυμορφικό MHC, το **HLA-DO** (*Goldsby and Goldsby 2003, Blum, Wearsch et al. 2013*). Το HLA-DO είναι και αυτό μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από μια **α** και μια **β** αλυσίδα (*Goldsby and Goldsby 2003*). Είναι γενικά αποδεκτό ότι το DO αλληλεπιδρά ισχυρά με το DM και δρα **παρεμποδίζοντας** την δράση του τελευταίου, ελαττώνοντας την απόδοση της αντίδρασης αντικατάστασης του CLIP από την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του MHC-II (*Goldsby and Goldsby 2003*). Σε περίπτωση απουσίας έκφρασης του DM, τα ετεροδιμερή DO παραμένουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), ενώ όταν εκφράζεται το DM, DM και DO εγκαταλείπουν το ER για τα MHCs μαζί (*Liljedahl, Kuwana et al. 1996*). Το HLA-DO εκφράζεται φυσιολογικά μόνο στα B λεμφοκύτταρα και στο θυμικό επιθήλιο, ενώ παρατηρείται χαμηλή έκφρασή του και σε ορισμένους πληθυσμούς δένδριτικών κυττάρων, όπου ενδεχομένως η έκφραση του να ρυθμίζεται από ανταγωνιστές των Toll-like receptors (*Chen and Jensen 2004, Porter, Yi et al. 2011*). Ωστόσο το HLA-DO εκφράζεται φυσιολογικά και στα κύτταρα των τροφοβλαστών, στα οποία δεν εκφράζεται HLA-DM (*ATHANASSAKIS, AIFANTIS et al. 1995*), και συγκροτούν σύμπλοκα με τα MHC II, μη επιτρέποντας στα τελευταία να εκκριθούν στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα την αναστολή της ανοσολογικής απάντησης της μητέρας και άρα την αποφυγή της αποβολής (*Ranella, Vassiliadis et al. 2005*).

Κατόπιν, δομικών αναλύσεων, resonance energy transfer (FRET) ανάλυσης και κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, τόσο το **DO** όσο και το **DR** **αλληλεπιδρούν με το DM στην ίδια περιοχή**. Βάσει της δομής του, το σύμπλοκο DO/DM, εμφανίζει μια φαινομενική μετατόπιση ενός τμήματος της α-έλικας της α αλυσίδας του DO συγκρινόμενη με αυτήν της α-αλυσίδας του συμπλόκου MHC-II/αντιγονικό πεπτίδιο, που αντανακλά στην στερεοδιατακτική αλλαγή που το DM προκαλεί στην διάσταση χαμηλής συγγένειας πεπτιδίων (*Yoon, Macmillan et al. 2012, Guce, Mortimer et al. 2013*).

Παρόλο που το DO ενέχει ένα ρυθμιστικό ρόλο για τη δράση του DM, ο ακριβής του ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη. Μια πιθανή δράση του μπορεί να είναι η **επιλογή των αντιγονικών πεπτιδίων που δεσμεύονται από τα MHC-II** των B λεμφοκυττάρων (*Goldsby and Goldsby 2003*). Τα DO και DM μόρια βρίσκονται μαζί στα MHCs, αλλά στις συνθήκες αυξανόμενης οξύτητας που παρουσιάζει το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, η αλληλεπίδραση των δυο μορίων εξασθενεί και αυξάνεται η πιθανότητα πρόσδεσης πεπτιδίου, παρά την ύπαρξη του DO (*Goldsby and Goldsby 2003*). Μια τέτοια αλληλεπίδραση, θα μπορούσε να οδηγήσει σε προνομιακή επιλογή πεπτιδίων που δεσμεύονται στα MHC-II των B λεμφοκυττάρων συγκριτικά με άλλα APCs (*Goldsby and Goldsby 2003*).

Σε αυτό το σημείο να τονιστεί, ότι τόσο τα MHC-I όσο και τα MHC-II μπορούν να φορτωθούν με πεπτίδια και των **δυο αντιγονοπαρουσιαστικών οδών** (*Blum, Wearsch et al. 2013*). Για παράδειγμα, τα MHC-II μόρια μπορούν να φορτωθούν με πεπτίδια από ενδογενείς μεμβρανικές πρωτεΐνες που αποικοδομήθηκαν στο λυσόσωμα, ενώ τα MHC-I μπορούν αντίστοιχα να προσδέσουν εξωγενείς πρωτεΐνες, που εισήχθησαν στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης ή φαγοκυττάρωσης. Έτσι, τα MHC-I μόρια εισάγονται στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης (*Neeffes, Jongasma et al. 2011*). Το μονοπάτι αυτό **δεν είναι συνήθως επικρατές** κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και αποκαλείται **διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση** (cross presentation) (*Neeffes, Jongasma et al. 2011, Blum, Wearsch et al. 2013*).

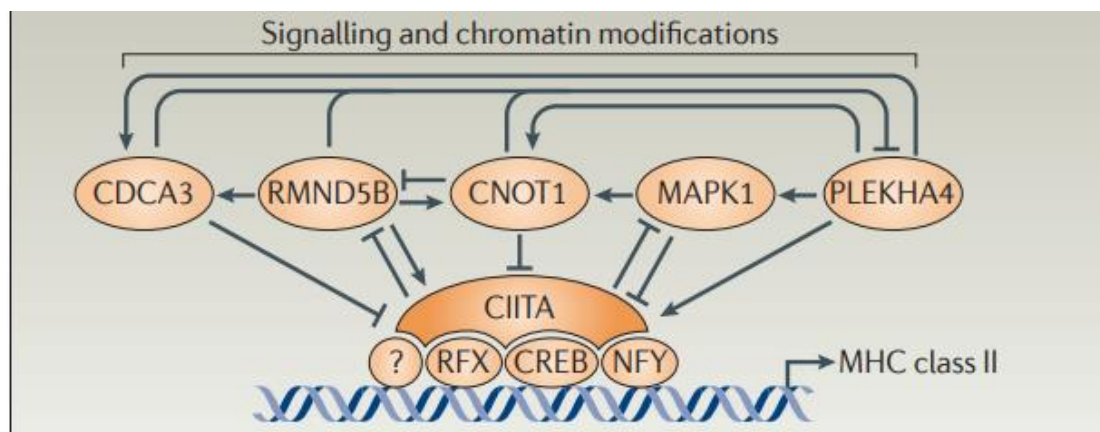


Εικόνα 9: Το μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης σε δενδριτικά κύτταρα (Joffre, Segura et al. 2012).

1.6) Η Μεταγραφική Ρύθμιση των MHC-II γονιδίων

Ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης των MHC-II γονιδίων είναι ο **συνενεργοποιητής** των MHC-II γονιδίων, **CIITA**, διασφαλίζοντας την έκφρασή τους από συγκεκριμένα κύτταρα (Neefjes, Jongtsma et al. 2011). Ο CIITA στρατολογείται στα **cis-DNA στοιχεία**, X, X2 και Y στοιχεία του υποκινητή των MHC-II γονιδίων από το **MHC-II ενισχυτόσωμα** (enhanceosome) που απαρτίζεται από τις εξής πρωτεΐνες: την **CREBP** (cAMP-responsive-element-binding protein), τον **πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα Y** (NFY) και τον **ρυθμιστικό παράγοντα X** (RFX), οι οποίες αλληλεπιδρούν απευθείας και συνεχώς με το DNA (Ting and Trowsdale 2002, Neefjes, Jongtsma et al. 2011, Devaiah and Singer 2013). Η αλληλεπίδρασή τους όμως δεν είναι ικανή για την εκκίνηση της μεταγραφής των MHC-II γονιδίων (Choi, Majumder et al. 2011). Μόλις, ο **CIITA δεθεί** στις παραπάνω πρωτεΐνες συγκροτείται

ένα **μεταγραφικά ενεργό σύμπλοκο** ικανό να ρυθμίζει *αρνητικά* είτε *θετικά* τη μεταγραφή (Ting and Trowsdale 2002). Για να εκφραστούν τα MHC-II, ο CIITA στρατολογεί ένζυμα τροποποίησης των ιστονών, όπως διάφορες ακετυλομεταφοράσες των ιστονών, ενώ όταν η έκφρασή τους, πρέπει να σιγήσει, στρατολογεί απακετυλάσες των ιστονών (Devaiah and Singer 2013).



Εικόνα 10: Τα κύρια συστατικά του ενισχυτοσώματος και η σημασία του συνενεργοποιητή CIITA (Neeffjes, Jongsma et al. 2011).

Ο CIITA ανήκει στην οικογένεια των **NLR/CATTERPILER** πρωτεϊνών με βάση τη δομή του, η οποία περιλαμβάνει μια **επικράτεια που δεσμεύει νουκλεοτίδιο** (nucleotide-binding domain) και μια **πλούσια σε λευκίνη επικράτεια** (Leucine-rich region) στο καρβοξυτελικό άκρο (Lich and Ting 2007). Πολλές πρωτεΐνες αυτής της οικογενείας διαμεσολαβούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και η έκφρασή τους συχνά συσχετίζεται με ποικίλες ασθένειες (Devaiah and Singer 2013). Παρόλα αυτά ο CIITA είναι η μόνη πρωτεΐνη από αυτές με τόσο κρίσιμο ρόλο στην προσαρμοστική ανοσία. Ο CIITA εκφράζεται μόνο στα APCs, αλλά μπορεί να εκφραστεί και σε άλλα κύτταρα του οργανισμού, όπως ινοβλάστες ενδοθηλιακά κύτταρα μεσεγχυματικά κύτταρα, κατόπιν επαγωγής τους με ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) (Steimle, Siegrist et al. 1994, Neeffjes, Jongsma et al. 2011). Η δράση του καθορίζεται από διάφορες **μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις**, όπως ακετυλίωση, ουβικιτινιλίωση, φωσφορυλίωση (Wu, Kong et al. 2009). Στην περίπτωση των APCs, η ενεργοποίηση του CIITA απαιτεί **φωσφορυλίωση** και **μονο-ουβικιτυνιλίωση** (Wu, Kong et al. 2009, Devaiah and Singer 2013). Η λειτουργία του CIITA επίσης καθορίζεται και από την κυτταρική του τοπολογία. Η επικράτεια που προσδένει νουκλεοτίδιο (τριφωσφορική γουανοσίνη ή GTP για τον CIITA) είναι αυτή που 'ελέγχει' το αν ο CIITA βρίσκεται μέσα στον πυρήνα ή στο

κυτταρόπλασμα. Ως πρωτεΐνη που πρέπει να εισέρθει στον πυρήνα, διαθέτει **3 σινιάλα εντοπισμού για τον πυρήνα** (NLR, nuclear localization signals) 2 στο αμινοτελικό του άκρο και 1 στο καρβοξυτελικό άκρο του (*Devaiah and Singer 2013*).

Ο CIITA διαθέτει διάφορες ρυθμιστικές επικράτειες εκτός από τις NBD και LRR που προαναφέρθηκαν. Διαθέτει μία **ενεργοποιητική επικράτεια** (AD, activation domain) μια **επικράτεια αλληλεπίδρασης ακετυλομεταφοράσης** (AT, acetyltransferase domain) και μία **επικράτεια προλίνης/σερίνης/θρεονίνης** (PTS, proline/serine/threonine domain). Η AD προσδένεται σε γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και στην CREBP, ενεργοποιώντας την MHC-II μεταγραφή καθώς και στην καταστολή της IL-4 μεταγραφής. Η LRR αλληλεπιδρώντας με την NBD ρυθμίζει την συνενεργοποιητική δράση του CIITA. Τέλος, η δράση της PST επικράτειας είναι άγνωστη προς το παρόν, μολονότι είναι ζωτικής σημασίας για τη δράση του CIITA (*Devaiah and Singer 2013*).

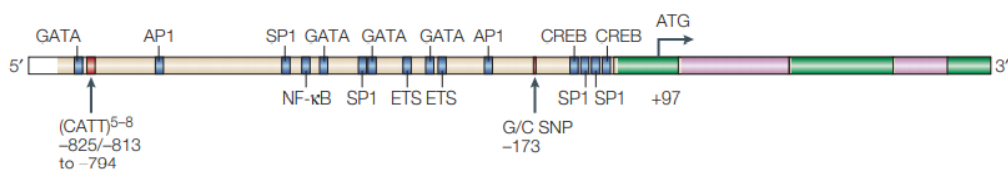
Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί, ότι η έκφραση του CIITA γονιδίου ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο μηχανισμό και περιλαμβάνει 4 υποκινητές και 5 ενισχυτές, αναδεικνύοντας ότι τόσο η **έκφρασή** του όσο και η **λειτουργία** του, πρέπει να είναι **αυστηρά ρυθμιζόμενες**. Το παραπάνω ενδέχεται να εξηγεί, γιατί ο CIITA είναι μια τόσο πολύπλοκη, ασταθής με μικρή διάρκεια ζωής πρωτεΐνη (*Devaiah and Singer 2013*)!

1.7) **Ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF, macrophage migration inhibitory factor)**

Ο MIF είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 114 αμινοξέα και έχει ~12,5 KDa μοριακό βάρος (*Jankauskas, Wong et al. 2019*). Είναι εξαιρετικά συντηρημένη στα σπονδυλωτά, αλλά εκφράζεται και στα αρθρόποδα, τους νηματώδεις σκόληκες ακόμα και στα πρωτόζωα (*Jankauskas, Wong et al. 2019*)! Ο MIF αρχικά ταυτοποιήθηκε και απομονώθηκε σε υπερκείμενα καλλιιεργειών ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και χαρακτηρίστηκε ως **κυτοκίνη**, ικανή να **σταματήσει** τη τυχαία μετανάστευση των μακροφάγων (*Bloom and Bennett 1966*). Πλέον, θεωρείται ένα **πολυδύναμο** και **πλειοτροπικό** μόριο που ενεργοποιεί την παραγωγή διάφορων φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α, tumor necrosis factor-α), η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερφερόνη-γ (IFN-

γ), ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και ιντερλευκίνη-12 (IL-12) (Nobre, de Araújo et al. 2017). Επιπλέον, δρα και ως ανοσοτροποποιητική ορμόνη παραγόμενη από τους βλεννογόνους αδένες (Bucala 1996, Nobre, de Araújo et al. 2017).

Το γονίδιο του MIF βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22q11.2 του ανθρώπου. Η γονιδιακή του έκφραση ρυθμίζεται από **δυο πολυμορφικές περιοχές**, που βρίσκονται στον υποκινητή του MIF γονιδίου: η πρώτη περιοχή περιλαμβάνει μια επανάληψη, 5-8 φορές, των **CATT** βάσεων στη θέση -794 από τη θέση έναρξης της μεταγραφής και η άλλη είναι ένα **SNP** (single nucleotide polymorphism) **G/C** στη θέση -173 από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (Bifulco, McDaniel et al. 2008). Η ύπαρξη περισσότερων από 5 επαναλήψεις του CATT και η ύπαρξη του -173C αλληλίου έχουν συσχετιστεί με αυτοανοσίες (Wu, Leng et al. 2006) και αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη και του στομάχου καθώς και αιματολογικές νεοπλασίες (Meyer-Siegler, Vera et al. 2007, Tong, He et al. 2015, Nobre, de Araújo et al. 2017).



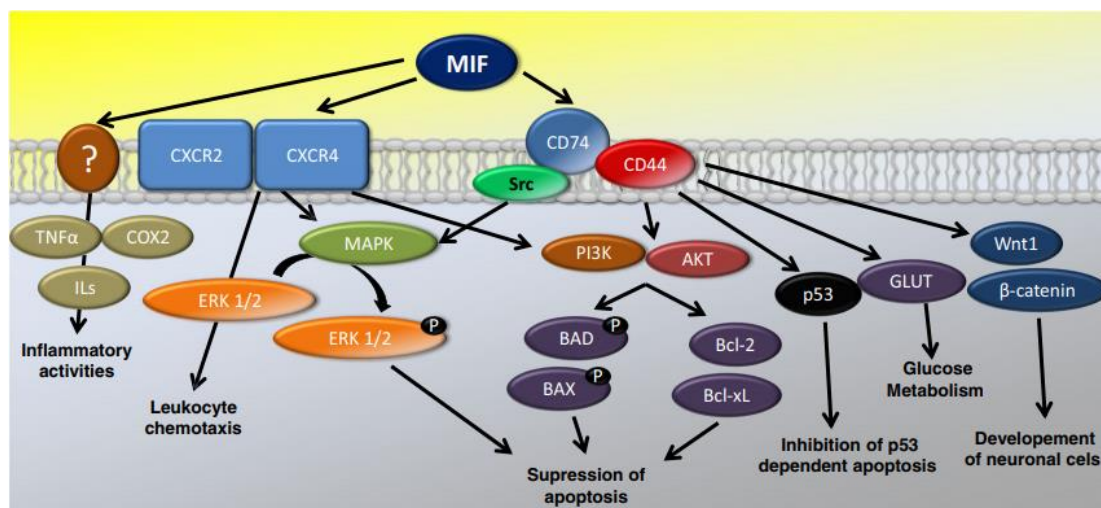
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου του MIF. Το γονίδιο αποτελείται από 3 μικρά εξόνια (πράσινα κουτιά) και 2 εσόνια (ροζ κουτιά). Η 5' DNA περιοχή άνωθεν (upstream) του γονιδίου περιλαμβάνει cis στοιχεία για την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο SP1, ο AP1, η CREB και ο NF-κB (nuclear factor-κB) (Calandra and Roger 2003).

1.7.1) Η μεσολαβούμενη από τον MIF ενδοκυττάρια σηματοδότηση

Ο MIF ασκεί τις ποικίλες βιολογικές του δράσεις στα κύτταρα μετά από πρόσδεση στον υποδοχέα του, τον CD74, παρουσία ενός συνυποδοχέα που, μπορεί να είναι είτε ο CD44, είτε οι χημειοκινικοί υποδοχείς CXCR4 ή CXCR2 (Shi, Leng et al. 2006, Bernhagen, Krohn et al. 2007, Schwartz, Lue et al. 2009, Schröder 2016). Η πρόσδεση οδηγεί σε ενεργοποίηση των **Src** τυροσινικών κινασών. Οι τελευταίες μεσολαβούν ένα καταρράκτη γεγονότων, που θα οδηγήσουν στην μέσω φωσφορύλιωσης ενεργοποίηση της **ERK1/2**(extracellular signal regulated protein kinase) (Shi, Leng et al. 2006), η οποία θα

ενεργοποιήσει με τη σειρά της πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τη **φλεγμονώδη αντίδραση** (*Bifulco, McDaniel et al. 2008*), καθώς και τη **χημειόταξη των λευκών αιμοσφαιρίων (leukocyte chemotaxis)** (*Tillmann, Bernhagen et al. 2013*).

Επιπλέον, η πρόσδεση του MIF στους υποδοχείς του, ενεργοποιεί και την **PI3K/AKT** (κινάση της φωσφατιδυλοϊνositόλης-3/πρωτεϊνικής κινάσης Β) σηματοδότηση (*Lue, Thiele et al. 2007*). Η ενεργοποίηση της AKT, έχει ως αποτέλεσμα την **απενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών**, BAD και BAX και τη σύγχρονη **ενεργοποίηση των αντι-αποπτωτικών** πρωτεϊνών, Bcl-2 και Bcl-xL και συνεπώς την **καταστολή του αποπτωτικού μηχανισμού** του κυττάρου (*Binsky, Haran et al. 2007, Lue, Thiele et al. 2007*).



Εικόνα 12: Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος που μεσολαβούνται από τον MIF (*Nobre, de Araújo et al. 2017*).

1.7.2) Οι βιολογικές δράσεις του MIF

1.7.2α) Φλεγμονώδεις Δραστηριότητες

Ένας φυσιολογικός ρόλος του MIF είναι να δρα ως ‘αντίβαρο’ στις ανασταλτικά αποτελέσματα των στεροειδών στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (*Bucala 1996*). Ο MIF ως κυτοκίνη, προωθεί την παραγωγή και άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών (όπως αυτές αναφέρθηκαν στο 1.7), από τα μακροφάγα, πυροδοτώντας μια πολύ έντονη φλεγμονώδη αντίδραση. Είναι γνωστό ότι, τα **γλυκοκορτικοειδή** (κορτιζόλη-κορτικοστερόνη), που παράγονται από τη στυλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων, παρουσιάζουν **αντιφλεγμονώδεις** ιδιότητες και

παράγονται ως απάντηση στο stress ή τον τραυματισμό για να μετριάσουν τη φλεγμονή. Ο MIF φαίνεται να δρα ως **ανταγωνιστής** της δράσης των γλυκοκορτικοειδών, προωθώντας την ενεργοποίηση της φλεγμονής και της ανοσολογικής απάντησης (*Bucala 1996, Conroy, Mawhinney et al. 2010, Nobre, de Araújo et al. 2017*). Επιπλέον, ο MIF **αυξάνει** τα επίπεδα έκφρασης **προ-φλεγμονωδών μορίων**, όπως η κυκλοξυγονάση-2 (COX-2), δημιουργώντας ένα εξαιρετικά φλεγμονώδες περιβάλλον (*Rosado Jde and Rodriguez-Sosa 2011*). Τα αυξημένα επίπεδα της COX-2, που καταλύει το σχηματισμό της προσταγλανδίνης G2 από αραχιδονικό, κάτω από την επίδραση του MIF, δημιουργούν ένα **θετικό βρόχο ανατροφοδότησης** στην φλεγμονώδη αντίδραση (*Mawhinney, Armstrong et al. 2015*).

1.7.2β) Ενζυμική δράση

Ο MIF παρουσιάζει καταλυτική δυνατότητα κετο-ενολο ταυτομεράσης, γι' αυτό μπορεί να ονομαστεί και **κυτοένζυμο** (*Nobre, de Araújo et al. 2017*). Ο MIF ως ταυτομεράση μπορεί να καταλύει το μετασχηματισμό της 2-καρβόξυ-2,3-διωδροινδολο-5,6-κινόνης (**D-ντοπαχρώματος**) (DOPD) σε 5,6-διωδρόξυ-2-καρβοξυλικό οξύ (**DHICA**) (*Rosengren, Bucala et al. 1996*). Το D-ντοπάχρωμα προέρχεται από το αμινοξύ D-τυροσίνη και όπως είναι γνωστό τα σπονδυλωτά βιοσυνθέτουν μόνο L-αμινοξέα, γι' αυτό και ο βιολογικός αυτός ρόλος του MIF **δεν είναι ξεκάθαρος**. Επιπλέον, φαίνεται να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στο **μεταβολισμό των κατεχολαμινών**, διότι καταλύει το μετασχηματισμό του 3,4-υδρόξυ-φαινυλάμινοχρώματος και του νορεπινεφρινοχρώματος, που είναι τοξικά παραπροϊόντα των κατεχολαμινών, 3,4-διωδροξυ-φαινυλαμίνη και νορεπινεφρίνη σε ινδολιο-διωδρόξυ παράγωγα, που πιθανολογείται ότι χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για τον σχηματισμό της **νευρομελανίνης** (*Matsunaga, Sinha et al. 1999*).

1.7.2γ) Ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων

Ο MIF είναι ευρέως **εκφραζόμενος** κατά τη διάρκεια της **εμβρυικής ανάπτυξης**, ιδιαίτερα στα κύτταρα του νευρικού συστήματος (*Shen, Thompson et al. 2012*). Έχει αποδειχτεί ότι ο MIF προωθεί την **ενεργοποίηση** του πολλαπλασιασμού και της **διαφοροποίησης** των **αρχέγονων νευρικών stem κυττάρων** (NSPCs, neural stem/progenitor cells), τα οποία έχουν υψηλή δυνατότητα αυτοανανέωσης και μπορούν

να διαφοροποιηθούν σε διάφορα κύτταρα της νευρικής σειράς (lineage) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου και κατά της περιγεννητική περίοδο, παίζοντας σημαντικό ρόλο τόσο στη **φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου**, όσο και στη φυσιολογική λειτουργία του (Zhang, Chen et al. 2013). Ο MIF φαίνεται να επάγει την διαφοροποίηση των NSPCs, αυξάνοντας την ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της **Wnt-β-κατενίνης** ενδοκυττάριας σηματοδότησης (Zhang, Chen et al. 2013, Nobre, de Araújo et al. 2017, Guda, Rashid et al. 2019).

1.7.3) Ο MIF και η εμπλοκή του στον καρκίνο

Ο MIF κατέχοντας έναν σημαντικό ρόλο τόσο στη φλεγμονή όσο και στην ανοσολογική απάντηση, μπορεί να είναι ο **συνδετικός κρίκος της φλεγμονώδους αντίδρασης και του καρκίνου**.

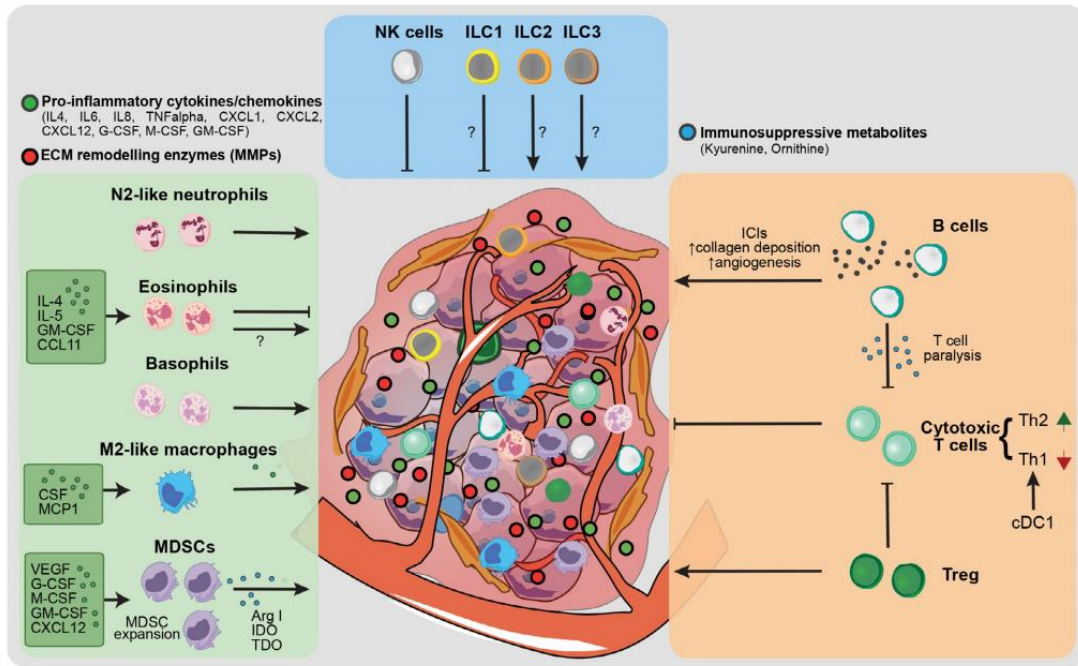
1.7.3α) Η παρεμβολή του MIF στον κυτταρικό κύκλο

Η p53, προϊόν του TP53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων και παίζει κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η p53 προσδέεται στον αναστολέα της Mdm2, με σκοπό την καταστολή της δράσης της και την αποικοδόμησή της. Όταν εισαχθεί ένα λάθος ζευγάρι βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA, η p53, ενεργοποιείται, αποδεσμεύεται από τον αναστολέα της και επιδιορθώνει το λάθος, παρεμποδίζοντας τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου. Μόλις το λάθος επιδιορθωθεί, η p53 αποικοδομείται και ο κυτταρικός κύκλος ολοκληρώνεται (Hafner, Bulyk et al. 2019). Ο MIF φαίνεται να **σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της p53 με τον Mdm2**, μη επιτρέποντας στην πρώτη να φωσφορυλιωθεί για να απελευθερωθεί από τον αναστολέα και να εκτελέσει τη δράση της. Αυτή η **αρνητική ρύθμιση** της λειτουργίας της p53 οδηγεί σε **μη διακοπή του κυτταρικού κύκλου** σε περίπτωση που πρέπει (prevention of cell cycle arrest) και επιπλέον, **αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου** μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού (Jung, Seong et al. 2008). Η απενεργοποίηση της δράσης της p53 μπορεί να επιφέρει ανυπολόγιστη απορρύθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλαγών στο γονιδίωμα και άρα τη δημιουργία μια γενομικής αστάθειας, που μπορεί δυνητικά να αυξήσει το ρίσκο μετασχηματισμού των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά.

1.7.3β) Η καταστολή της ανοσολογικής επαγρύπνησης

Ένας από τους πλέον σημαντικούς μηχανισμούς με τον οποίο ο MIF μπορεί να καταστείλει την ανοσολογική απάντηση ενάντια στους καρκινικούς όγκους είναι μέσω της **αναστολής της δράσης των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (CD8⁺) και των φυσικών φονιάδων (NK)** (Krockenberger, Dombrowski et al. 2008). Επιπλέον, μπορεί να **αυξήσει** την παραγωγή των **myeloid-derived suppressor κυττάρων (MDSCs)** (Simpson, Templeton et al. 2012), τα οποία έχουν εξαιρετικά μεγάλη ανοσοκατασταλτική ικανότητα και συνήθως βρίθουν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, αλλά παρατηρούνται και στην περιφέρεια σε πολλούς καρκίνους ως circulating MDSCs (Almand, Clark et al. 2001). Τα MDSCs είναι GR1+CD11b⁺ κύτταρα και συνήθως κατηγοριοποιούνται σε δύο κυτταρικούς υποπληθυσμούς, τον κοκκιοκυτταρικό (granulocytic) και τον μονοκυτταρικό (monocytic) (Youn, Nagaraj et al. 2008). Και οι δύο υποπληθυσμοί εκφράζουν αργινάση με αποτέλεσμα την καταστολή των Τ-κυτταροτοξικών. Ο κοκκιοκυτταρικός πληθυσμός παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species), ενώ ο μονοκυτταρικός, νιτρικό οξύ, καταστέλλοντας περαιτέρω τη λειτουργία των Τ-κυτταροτοξικών στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Dietlin, Hofman et al. 2007). Σε αυτό το σημείο να τονιστεί ότι, ο κοκκιοκυτταρικός είναι συνήθως ο πιο αυξημένος στα ζωικά μοντέλα όγκων (Youn, Nagaraj et al. 2008), παρόλα αυτά ο μονοκυτταρικός πιστεύεται ότι είναι ο πλέον ανοσοκατασταλτικός, διότι μπορεί να καταστείλει τόσο τον αντιγονο-ειδικό όσο και τον μη αντιγονο-ειδικό πολλαπλασιασμό των Τ-κυτταροτοξικών μέσω της νιτροσυλίωσης είτε του TCR (Nagaraj, Schrum et al. 2010) είτε του MHC (Lu, Ramakrishnan et al. 2011). Τέλος, τα μονοκυτταρικά MDSCs, *in vitro*, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα (Youn, Nagaraj et al. 2008), συνδέοντας τη δράση των MDSCs με τα μακροφάγα που συσχετίζονται με τους όγκους (TAMs, tumor associated macrophages).

Ο MIF μπορεί και **προωθεί** την **διαφοροποίηση των μακροφάγων σε TAMs**, που όπως και τα MDSCs υπάρχουν σε μεγάλο βαθμό στο καρκινικό μικροπεριβάλλον και βοηθούν στην αγγειογένεση του όγκου, και δρώντας μαζί **δεν επιτρέπουν την προσέλκυση των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων και των NK** (Yaddanapudi, Putty et al. 2013), προωθώντας περισσότερο την επιθετικότητα του εκάστοτε καρκίνου.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του μικροπεριβάλλοντος ενός όγκου. Το καρκινικό μικροπεριβάλλον αποτελείται από κύτταρα τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας, στρωματικά κύτταρα και πολλούς διαλυτούς παράγοντες και ένζυμα (Guo, Huang et al. 2019).

1.7.3γ) Η εμπλοκή του MIF στην μετάσταση και στην αγγειογένεση

Η διαδικασία της **μετάστασης** και της **αγγειογένεσης** είναι πολύ σημαντικές για την **πρόοδο** και την **επιβίωση** ενός καρκινικού όγκου. Ο **ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας των αγγείων** (VEGF, vascular endothelial growth factor) και ο **παράγοντας παραγόμενος από την υποξία-1** (HIF-1, hypoxia inducible factor 1) είναι οι πλέον σημαντικοί παράγοντες για την δημιουργία νέων αγγείων στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (Guda, Rashid et al. 2019), τα οποία θα τροφοδοτήσουν τον όγκο με όλα τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση του. Το καρκινικό μικροπεριβάλλον πολύ συχνά, κυρίως στην περίπτωση των στερεών όγκων, χαρακτηρίζεται από **υποξικές συνθήκες**, λόγω της υπερέκφρασης του HIF-1 (Bach, Rinn et al. 2008, Guda, Rashid et al. 2019). Ο **HIF-1 αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του MIF** από τα καρκινικά κύτταρα, συμβάλλοντας περαιτέρω στην αγγειογένεση. Οι υποξικές συνθήκες προωθούν την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων προς το καρκινικό μικροπεριβάλλον.

Τέλος, ο MIF φαίνεται να οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα σε μετάσταση μέσω **αύξης** της έκφρασης την **N-καντερίνης** (N-cadherin) και

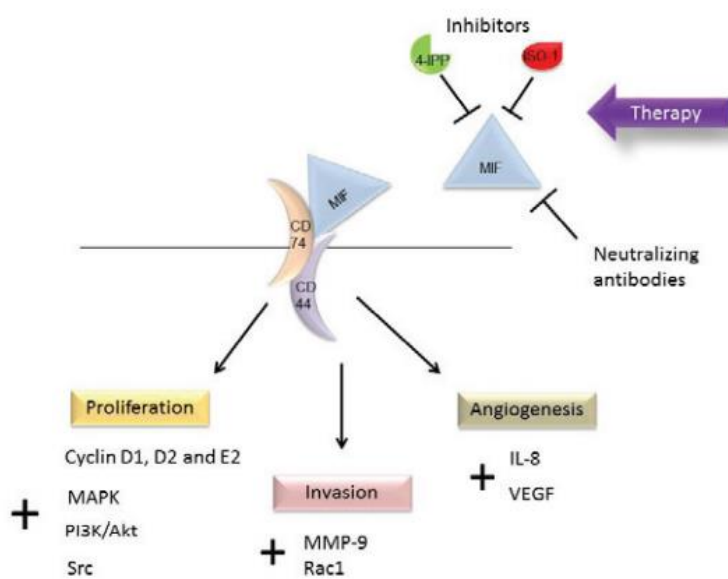
μείωση της έκφρασης της **E-καντερίνης** (E-cadherin) (Guda, Rashid et al. 2019). Η N-καντερίνη είναι πρωτεΐνη υπεύθυνη για την πρόσφυση των κυττάρων στη βασική μεμβράνη και η μείωση της έκφρασής της βοηθά την μεταστατική διαδικασία διαταράσσοντας τους συνδέσμους μεταξύ των κυττάρων (cell to cell junctions). Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα ‘αποσυνδέονται’ από τον περιβάλλοντα ιστό και μεταναστεύουν σε άλλους (μετάσταση).

MIF functional activities	Role in tumourigenesis
P53 inhibition	Accumulation of mutation Inhibition of apoptosis Proliferation of cells
Sustained ERK activation	Promotes invasion Inhibits cell death
COX-2/PGE-2 induction	Tumour Growth Viability Metastasis
Endothelial cell proliferation and differentiation	Promotes angiogenesis

Εικόνα 14: Οι κύριες λειτουργίες του MIF στον καρκίνο (Conroy, Mawhinney et al. 2010).

Λόγω του κυρίαρχου ρόλου που διαδραματίζει ο MIF στον καρκίνο, ενδεχομένως να αποτελεί έναν εξαιρετικό **φαρμακευτικό στόχο** στον τομέα της ογκολογίας. Η αναστολή της δράση του MIF στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να επιτευχθεί μέσω μικρών μορίων αναστολέων, όπως ο **ISO-1**, αναστολέας της ειδικότητας ταυτομεράσης και η **4-ιωδο-φαινυλοπυριμιδίνη** (4-IPP), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη **βιοδιαθεσιμότητα** και **χαμηλή τοξικότητα** (Kindt, Journe et al. 2016). Τέλος, η αναστολή της δράσης του MIF μπορεί επιτευχθεί με τη χρήση **εξουδετερωτικών αντισωμάτων** (neutralizing antibodies), ειδικά για τον υποδοχέα του, **CD74** (Kindt, Journe et al. 2016). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος για τον CD74, το milatuzumab μαζί με τον κλασσικό αντικαρκινικό παράγοντα,

δοξορουβικίνη, βρίσκεται στη φάση I των κλινικών δοκιμών ως θεραπεία για το πολλαπλό μυέλωμα (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01101594*).

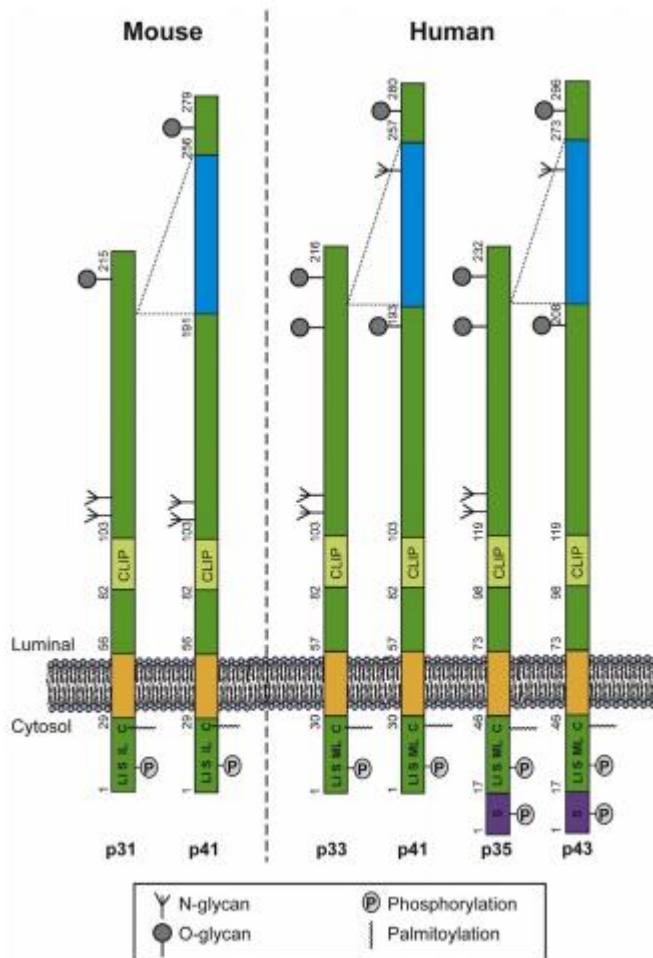


Εικόνα 15: Η φαρμακευτική στόχευση του MIF (Kindt, Journe et al. 2016).

1.8) Οι MIF υποδοχείς-CD74 και CXCR4

1.8.1) Ο διττός ρόλος του CD74 ή σταθερής αλυσίδας (Ii)-O CD74 αποτελεί έναν συγγενικό MIF υποδοχέα.

Ο CD74 εκτός από ενδοκυττάριος μοριακός συνοδός για τα MHC-II μόρια, αποτελεί και μια **διαμεμβρανική πρωτεΐνη** με τοπολογία τύπου II (*Schröder 2016*) (το καρβοξυτελικό άκρο να 'κοιτάει' στον εξωκυττάριο χώρο και το αμινοτελικό άκρο να 'κοιτάει' στο κυτταρόπλασμα). Στον ποντικό, υπάρχουν δύο ισομορφές του CD74, προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του CD74 mRNA και διαθέτουν 215 (p31) και 279 (p41) αμινοξικά κατάλοιπα η καθεμία αντίστοιχα. Στον άνθρωπο αυτές αντιστοιχούν στις ισομορφές **p33** και **p41** αντίστοιχα (*Schröder 2016*). Επίσης στον άνθρωπο, λόγω της χρήση του εναλλακτικού κωδικονίου έναρξης, υπάρχουν δυο επιπλέον ισομορφές του CD74, η **p35** και η **p43** (*Schröder 2016*). Οι νεοσυντιθέμενες ισομορφές, μπορούν να φτιάχνουν είτε ομο είτε έτερο τριμερή και συσσωρεύονται στο αδρό ER (*Marks, Blum et al. 1990*).



Εικόνα 16: Οι ισομορφές του CD74 σε ποντικό (αριστερά) και άνθρωπο (δεξιά). Η τοπολογία τύπου II και οι θέσεις των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Schröder 2016).

Να αναφερθεί ότι το μοτίβο έκφρασης των διάφορων ισομορφών του CD74 ενδέχεται να επηρεάζει το ρεπερτόριο των φορτωμένων πεπτιδίων, παρά το γεγονός ότι όλες έχουν την ικανότητα να βοηθούν στη στερεοδιαμόρφωση και στη μεταφορά του MHC-II στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι (Fortin, Cloutier et al. 2013).

Η επίδραση του CD74 για

την μεταφορά του MHC-II στην ενδοσωμική μεμβράνη εξαρτάται από το αμινοτελικό άκρο του και τουλάχιστον στον ποντικό είναι ανεξάρτητη των ισομορφών (Schröder 2016).

Ο CD74 παράγεται σε **μοριακή συγκέντρωση μεγαλύτερη** από αυτήν που παράγονται τα MHC-II μόρια σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (Koch, Koch et al. 1982). Έτσι, τα ελεύθερα από MHC-II, **CD74 τριμερή μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη** και αποτελούν έναν **υποδοχέα** για τον παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων, **MIF** (macrophage migration inhibitory factor) (Jankauskas, Wong et al. 2019). Η **περιοχή πρόσδεσης** του MIF, βρίσκεται στην εξωκυττάρια επικράτεια του CD74, μεταξύ του **109** και **149 αμινοξικού καταλοίπου** (Leng, Metz et al. 2003, Jankauskas, Wong et al. 2019). Ένας **N-βρόχος**, καθώς και ένα συντηρημένο κατάλοιπο **προλίνης** στην αλληλουχία του MIF τον καθιστούν ικανό να προσδεθεί στον CD74 (Pantouris, Syed et al. 2015). Μέσω *in silico* μοντελισμού του συμπλόκου MIF/CD74, προκύπτει ότι **3 MIF τριμερή προσδέονται σε 1 τριμερές CD74 (3MIF:1CD74)** (Jankauskas, Wong et al. 2019). Η πρόσδεση του MIF στον διαμεμβρανικό CD74 είναι **αναγκαία**, μα **όχι**

ικανή για να πυροδοτήσει ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (Shi, Leng et al. 2006). Η MIF σηματοδότηση μέσω του CD74 εξαρτάται συνήθως από κάποιο **συνυποδοχέα**, με τους πιο συνήθεις να είναι ο **CXCR4** ή ο **CD44** (Shi, Leng et al. 2006, Bernhagen, Krohn et al. 2007, Schwartz, Lue et al. 2009, Schröder 2016).

1.8.2) Ο χημειοκινικός υποδοχέας CXCR4 αποτελεί έναν μη συγγενικό MIF υποδοχέα.

Οι χημειοκίνες είναι κυτοκίνες των 8-10 kDa που κατηγοριοποιούνται σε 4 ομάδες, τις CXC, CC, C και CX3C ανάλογα με τη θέση των **2 πρώτων κυστεϊνών** στην αμινοξική τους αλληλουχία (Zlotnik and Yoshie 2000). Οι χημειοκινικοί υποδοχείς είναι **συζευγμένοι με G πρωτεΐνες** και πολύ συχνά συζευγνύονται με τις **Gi πρωτεΐνες**, που είναι ευαίσθητες στην τοξίνη Pertussis (pertussis toxin sensitive Gi proteins) (Murphy, Baggiolini et al. 2000) του βακτηρίου *Bordetella pertussis*, υπεύθυνη για την εξαιρετικά μολυσματική λοίμωξη του αναπνευστικού, τον κοκίτη. Επιπλέον, οι χημειοκινικοί υποδοχείς είναι ικανοί να προσδέουν διάφορους προσδέτες (ligands), καθώς μόνο 6 από τους 18 προσδέουν μόνο έναν προσδέτη (Balkwill 2004).

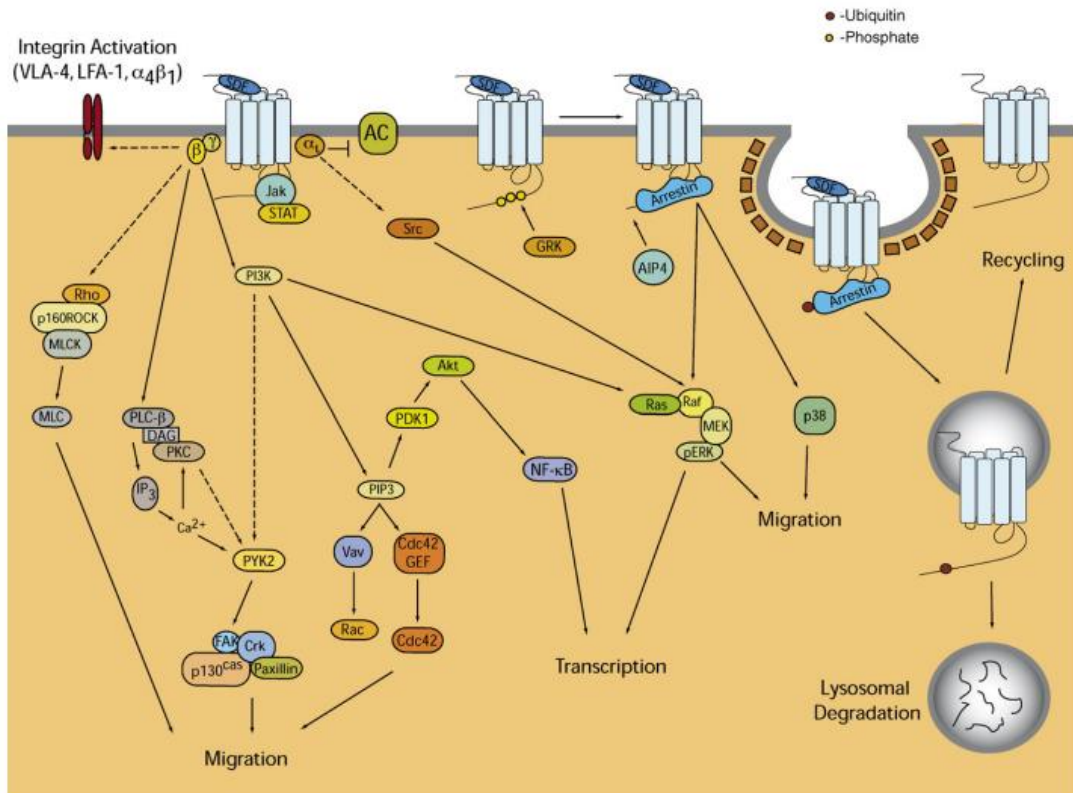
Ένας καλά μελετημένος τέτοιος υποδοχέας είναι ο CXCR4, κυρίως λόγω του ρόλου του ως συνυποδοχέας του ιού HIV (Feng, Broder et al. 1996), καθώς και για την ικανότητα του να διαμεσολαβεί την μετάσταση σε διάφορους καρκίνους (Zlotnik 2006). Ο CXCR4 είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας αποτελούμενος από **7 διαμεμβρανικές έλικες** (7TM receptor) και αποτελείται από 352 αμινοξέα (Busillo and Benovic 2007). Προσδένει **ειδικά** και τις 2 ισομορφές α και β του **παράγοντα των στρωματικών κυττάρων** (stromal cell-derived factor-1, SDF-1α και 1β), που είναι μια CXC χημειοκίνη και αποκαλείται αλλιώς και CXCL12 (Murphy, Baggiolini et al. 2000), με χημική συγγένεια, $Kd=7,5 nM$ και $Kd=13,7nM$ αντίστοιχα (Hesseltgesser, Liang et al. 1998). Πέρα από την δράση του ως χημειοκινικός υποδοχέας στην ενήλικη ζωή, ο CXCR4 παίζει σημαντικό ρόλο στην **ανάπτυξη**, στην **αιμοποίηση** και στην **οργανογένεση** (Busillo and Benovic 2007). Στα ενήλικα άτομα έχει παρατηρηθεί να εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα, όπως λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, προ-B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά

κύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα, νευρικά κύτταρα καθώς και αστροκύτταρα (*Balkwill 2004*).

Το γονίδιο του CXCR4 βρίσκεται στο 2q21 χρωμόσωμα του ανθρώπου. Ενώ ο υποκινητής του γονιδίου του περιέχει αρκετές cis-ρυθμιστικές περιοχές, τα βασικά επίπεδα της μεταγραφής του φαίνεται να **‘ελέγχονται’** από την αντικρουόμενη δράση 2 μεταγραφικών ρυθμιστών, του **πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα-1** (NRF-1, nuclear respiratory factor-1) (*Moriuchi, Moriuchi et al. 1997, Wegner, Ehrenberg et al. 1998*), που ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή του CXCR4, καθώς και του **Ying Yang 1** (YY1), ο οποίος αλληλεπιδρώντας με ένα cis ρυθμιστικό στοιχείο στη θέση -300 από τη θέση έναρξης της μεταγραφής, ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφή (*Moriuchi, Moriuchi et al. 1999*).

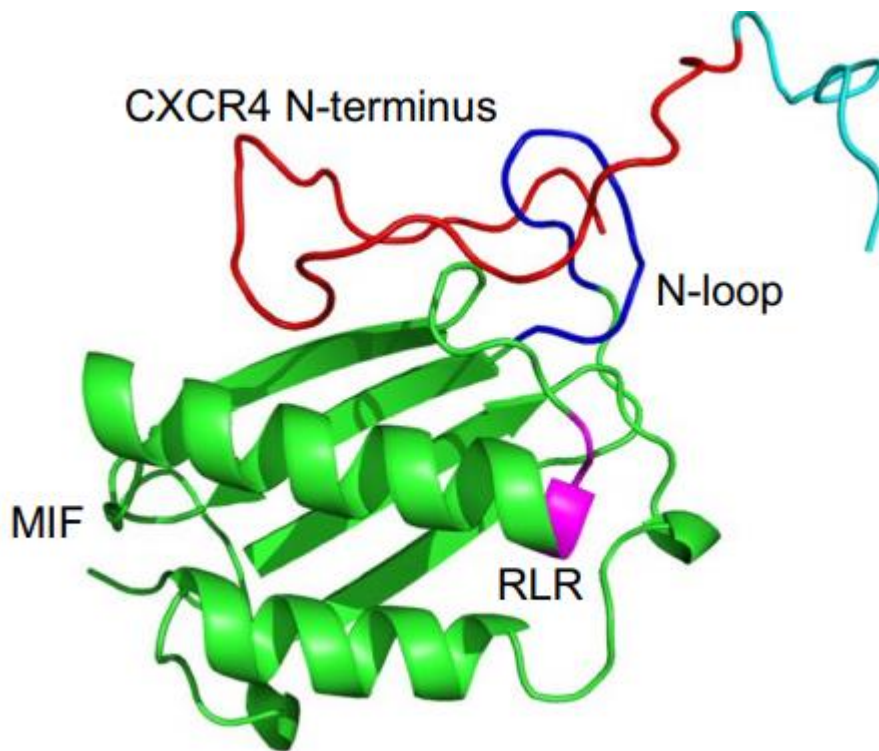
Η μεταγραφή του γονιδίου του CXCR4 επηρεάζεται όμως και από **σηματοδοτικά μόρια**, δείχνοντας πόσο δυναμική είναι η ρύθμιση της μεταγραφής του CXCR4, ως αποτέλεσμα των φυσιολογικών ερεθισμάτων! Παραδείγματος χάρη, η έκφραση του CXCR4 αυξάνεται ως αποτέλεσμα της δράσης διάφορων δεύτερων αγγελιαφόρων, όπως το κυκλικό AMP (cAMP) και τα ιόντα ασβεστίου Ca^{2+} . Επίσης, η έκφρασή του αυξάνεται και από τη δράση κυτοκινών όπως, ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ιντερλευκίνη-4 (IL-4), ιντερλευκίνη-10 (IL-10) ιντερλευκίνη-15 (IL-15). Στον αντίποδα, η έκφραση του CXCR4 γονιδίου φαίνεται να μειώνεται από την δράση φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) και της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) (*Busillo and Benovic 2007*).

Ο CXCR4 διαθέτει **2 πιθανές θέσεις N-γλυκοσυλίσωσης**, στην ασπαραγίνη 11 (Asn11) και στην ασπαραγίνη 176 (Asn176). Ωστόσο, στα κύτταρα των θηλαστικών μόνο η **Asn11** φαίνεται να N-γλυκοσυλιώνεται! Η **γλυκοσυλίωση** του CXCR4 είναι **σημαντική για την πρόσδεση του SDF-1** και βοηθά στην αναστολή της χρήσης του ως HIV συνυποδοχέα (*Chabot, Chen et al. 2000*).



Εικόνα 17: Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος που διαμεσολαβούνται από τον CXCR4 και στον συγγενικό του προσδέτη, SDF-1 (CXCL12) (Busillo and Benovic 2007).

Ένας μη συγγενικός για τον CXCR4 προσδέτης, είναι ο MIF. Η αμινοξική αλληλουχία του MIF διαθέτει πολύ μικρή ομολογία με αυτήν του SDF-1, παρόλα αυτά περιλαμβάνει τα μοτίβα που χρειάζονται για την πρόσδεση στον CXCR4 (Kraemer, Lue et al. 2011). Για την MIF/CXCR4 αλληλεπίδραση, είναι υπεύθυνος ένας N- βρόχος της δευτεροταγούς δομής του MIF καθώς και ένα κοντινό στο N-βρόχο, μοτίβο αργινίνης-λευκίνης-αργινίνης (Arg/Leu/Arg) (RLR) της αμινοξικής του αλληλουχίας στις θέσεις 87,88,89, τα οποία φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό άκρο του CXCR4 (Lacy, Kontos et al. 2018). Ο MIF φαίνεται να ενεργοποιεί τον CXCR4 μέσω μερικού αλλοστερικού ανταγωνισμού σε σύγκριση με τον SDF-1 (Rajasekaran, Gröning et al. 2016).

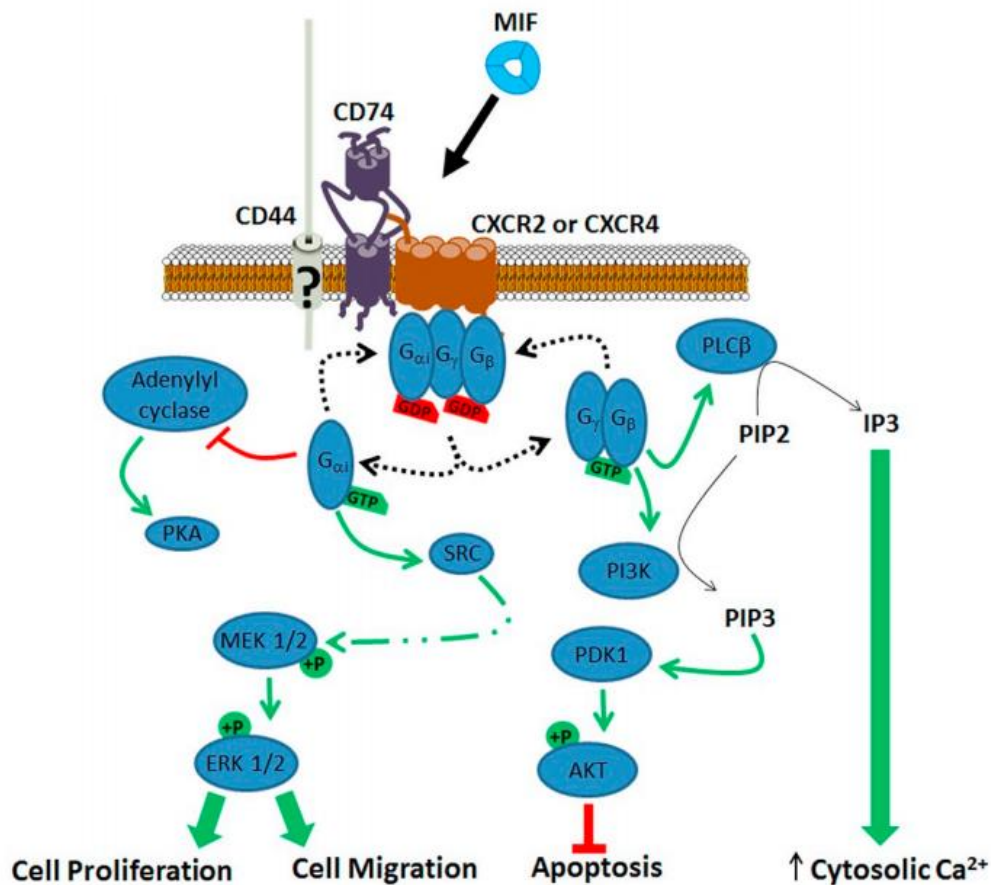


Εικόνα 18: Το δομικό μοντέλο της MIF/CXCR4 αλληλεπίδρασης όπως προκύπτει μέσω *molecular docking* (Lacy, Kontos et al. 2018).

1.8.3) Το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που διαμεσολαβείται από την πρόσδεση του MIF στο σύμπλοκο CD74/CXCR4 και πιθανόν προωθεί τον καρκινικό φαινότυπο.

Προσδεδεμένος ο MIF στο ετερομερές σύμπλοκο CD74/CXCR4 ενεργοποιεί δύο κύρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος, της **PI3K/AKT** σηματοδότησης και της **ERK1/2**. Πιο αναλυτικά, όταν ο MIF προσδεθεί στο CD74/CXCR4, ο τελευταίος αλλάζει στερεοδιαμόρφωση και ενεργοποιεί τις ετεροτριμερείς GαiGγGβ (αποδεσμευόμενες το GDP για να προσδέσουν GTP) πρωτεΐνες με τις οποίες είναι συζευγμένες. Η απομάκρυνση της Gαi-GTP από τις GβGγ προκαλεί την ενεργοποίηση των Src κινασών, που με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν μέσω φωσφορυλίωσης την MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase ή MAPK) και αυτήν με τον ίδιο τρόπο την ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated protein Kinase), **προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευση**. Οι υπομονάδες GβGγ-GTP ενεργοποιούν την PI3K κινάση (Phosphatidylinositol-3 Kinase) και αυτή με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την 4,5 διφωσφορική φωσφατίδυλοϊνοσιτόλη (PIP2) μετατρέποντάς την σε 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατυδυλοϊνοσιτόλη (PIP3). Έπειτα, η PDK1 κινάση

(phosphoinositide-dependent kinase-1) ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την AKT (protein kinase B) κινάση, **παρεμποδίζοντας την απόπτωση**. Παράλληλα, οι υπομονάδες Gβγ-GTP ενεργοποιούν και τη β-φωσφολιπάση C, PLCβ (phospholipase β), η οποία καταλύει τη μετατροπή 4,5 διφωσφορικής φωσφατίδυλοϊνοσιτόλης σε 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και διακύλογλυκερόλη οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου ασβεστίου Ca²⁺.



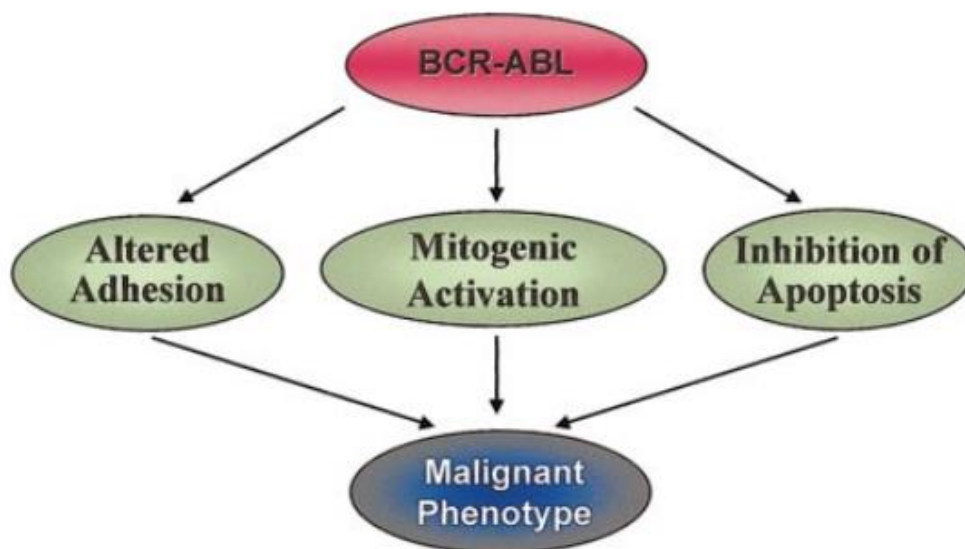
Εικόνα 19: Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που μεσολαβείται από την πρόσδεση του MIF στο σύμπλοκο CD74/CXCR4. Η ανάμειξη του CD44 δεν είναι αποσαφηνισμένη (Jankauskas, Wong et al. 2019).

1.9) Οι λευχαιμίες

1.9.1) Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (XMA, CML, chronic myeloid leukemia)

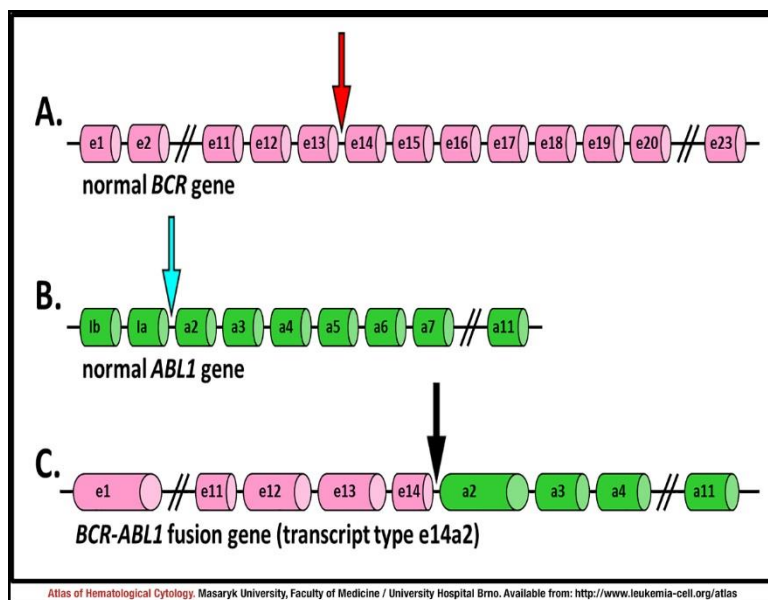
Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (XMA) είναι μια μυελοπολλαπλασιαστική νεοπλασία και προέρχεται από ένα μη

φυσιολογικό αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο (HSC), που εμφάνισε το πλεονέκτημα του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003). Γενετικά, το 90% των λευχαιμικών κυττάρων της ΧΜΛ, εμφανίζουν αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ του χρωμοσώματος 9 και 22, **t9;22**, ή αλλιώς, **Χρωμόσωμα της Φιλαδέλφιας** (Ph chromosome) (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003, Jabbour and Kantarjian 2018). Αυτή η μετατόπιση συντήκει το *abl* γονίδιο (Ablason murine leukemia gene) του χρωμοσώματος 9 με το *bcr* γονίδιο (breakpoint cluster region gene) στο χρωμόσωμα 22, δημιουργώντας το **bcr/abl ογκογονίδιο** (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003). Προϊόν του *bcr/abl* ογκογονιδίου, αποτελεί η **χιμαιρική ογκοπρωτεΐνη BCR/ABL** με μοριακό βάρος 210kDa (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003). Η BCR/ABL παρουσιάζει συνεχή **ενεργότητα τυροσινικής κινάσης** και προωθεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων μέσω κυρίως τριών μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης, της **PI3K/Akt**, της **ERK1/2** και του **STAT5** (Deininger, Goldman et al. 2000, Sillaber, Mayerhofer et al. 2003). Η BCR/ABL εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της μυελικής σειράς, καθώς και σε ορισμένα της λεμφικής σειράς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στους ασθενείς με ΧΜΛ (Szymańska and Park 2019).



Εικόνα 20: Οι κυτταρικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από την ογκοπρωτεΐνη BCR/ABL στην ΧΜΛ, διαφορετική πρόσφυση, ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αναστολή της απόπτωσης (Deininger, Goldman et al. 2000).

Το υπόλοιπο 5% των ασθενών με ΧΜΛ εμφανίζει αμοιβαία μετατόπιση κάποιου άλλου χρωμοσώματος π.χ του 14 με το 22, που είναι BCR/ABL θετικοί και το άλλο 5% εμφανίζει μετατοπίσεις που περιλαμβάνουν 1 ή και περισσότερα χρωμοσώματα, συμπληρωματικά με το 9 και 22 (*Jabbour and Kantarjian 2018*).



Εικόνα 21: A) Το φυσιολογικό *bcr* γονίδιο (χρωμόσωμα 22) B) το φυσιολογικό *abl* γονίδιο (χρωμόσωμα 9) C) Η αμοιβαία μετατόπιση του 9 στο 22 και η δημιουργία του χμαιρικού *bcr/abl* γονιδίου. <https://www.leukemia-cell.org/atlas>

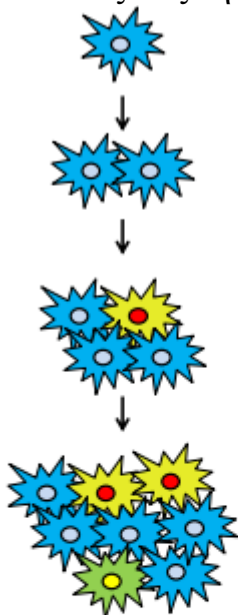
Η κλινική πορεία της ΧΜΛ περιλαμβάνει **3 φάσεις**, την **χρόνια** φάση (chronic phase, CP), την φάση της **επιτάχυνσης** (accelerated phase, AP) και τη φάση της **βλαστικής κρίσης** (blast crisis phase, BP) (*Sillaber, Mayerhofer et al. 2003*). Πέρα από την *bcr/abl*, μπορούν να συμβούν και άλλες γενετικές ανωμαλίες, οι οποίες θα συνδράμουν στη μετάβαση από την CP στην AP και αντίστοιχα από την AP στην BP μέσω της **κλωνικής εξέλιξης** (clonal evolution) και θα οδηγήσουν σε αντίσταση στην αντι-λευχαιμική αγωγή .

CML-CP	CML-AP	CML-BP
Κοκκιοκυττάρωση	Σπληνομεγαλία	$\geq 20\%$ βλαστικών κυττάρων σε περιφερειακό αίμα ή μυελό των οστών
Παρουσία χρωμοσώματος	Κυτταρογενετικές ενδείξεις κλωνικής	Μεγάλες εστίες (foci) ή συμπλέγματα

Φιλαδέλφειας (Ph+)	εξέλιξης	(clusters) βλαστικών κυττάρων σε δείγματα βιοψίας μυελού των οστών
Έκφραση BCR/ABL	10-19% βλαστικών κυττάρων σε περιφερειακό αίμα ή/και μυελό των οστών	
Όχι ενδείξεις CML-AP, CML-BP	>=20% περιφερειακά βασεόφιλα	
	Επίμονη θρομβοπενία μη σχετιζόμενη με τη θεραπεία(<100*10 ⁹ L)	
	Επίμονη θρομβοκυττάρωση λόγω απάθειας στη θεραπεία (>1000*10 ⁹ L)	

Πίνακας 1: Τα κατά ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) κριτήρια για τη διάγνωση των σταδίων της ΧΜΛ.

Η αιτιολογία της ΧΜΛ είναι γενικά **άγνωστη**, αν εξαιρεθούν οι περιπτώσεις έκθεσης σε **ιονίζουσα ακτινοβολία**. Επηρεάζει 1-2 άτομα στα 100000 κάθε χρόνο, με τις γυναίκες να εμφανίζουν προδιάθεση για την ασθένεια (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003). Μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις ηλικίες, αλλά συνήθως διαγιγνώσκεται **μετά την τέταρτη δεκαετία της ζωής** (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003).



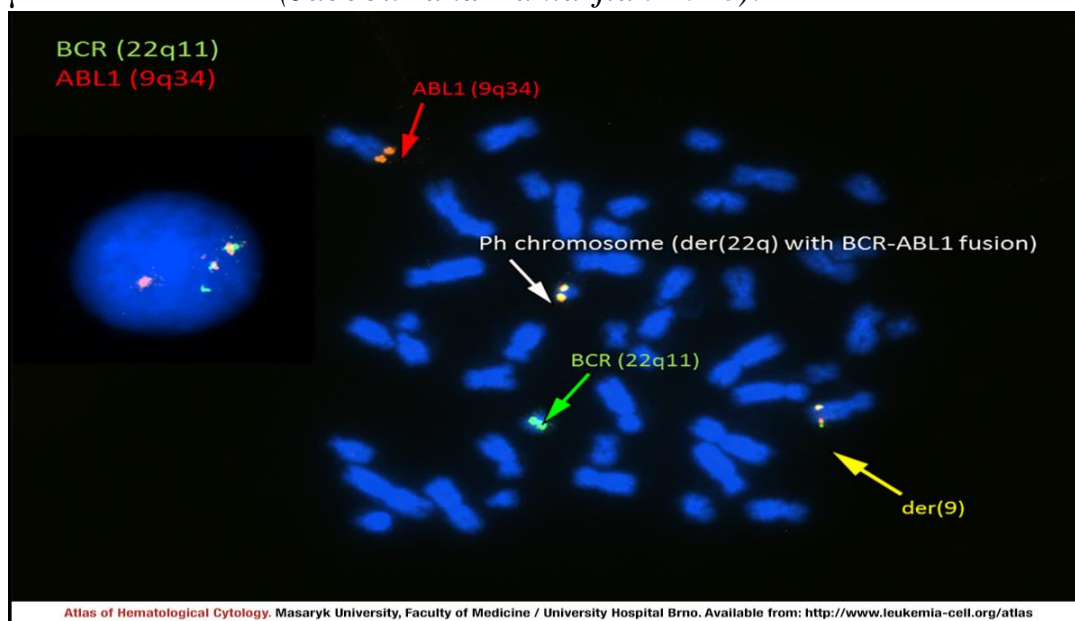
Εικόνα 22: Η κλωνική εξέλιξη στον καρκίνο κατά την οποία κατόπιν συσσώρευσης μεταλλαγών και τη δράση της εξελικτικής πίεσης (π.χ. αντικαρκινική αγωγή), ο πιο αρμοσμένος κλώνος θα επιβιώσει (Inda, Bonavia et al. 2014).

Όσον αφορά τη κλινική διάγνωση της ΧΜΛ, οι ασθενείς συνήθως είναι ασυμπτωματικοί και διαγιγνώσκονται με ΧΜΛ κατόπιν **αιματολογικής εξέτασης**, που παρουσιάζει έντονη **λευκοκυττάρωση** ή **θρομβοκυττάρωση** και **σπληνομεγαλία** κατόπιν φυσικής εξέτασης. Επιπλέον, παρουσιάζουν κυτταροβριθή μυελό των οστών κατόπιν μυελογραφήματος, δεξιάστροφης κλίσης ηωσινοφιλία ή/και

Survival and expansion of best fit clone (s)

βασεοφιλία και σχετικά σπάνια ηπατομεγαλία (Sillaber, Mayerhofer et al. 2003, Jabbour and Kantarjian 2018).

Η κυτταρογενετική διάγνωση της ΧΜΛ, γίνεται μέσω **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης** (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) με σκοπό τον πολλαπλασιασμό (amplification) των bcr/abl μεταγράφων από δείγμα περιφερικού αίματος. Συνήθως για την διάγνωση χρησιμοποιείται η **ποιοτική RT-PCR (QPCR)** για την **παρουσία** του μεταγράφου, ενώ στην περίπτωση της παρακολούθησης της ασθένειας χρησιμοποιείται η **ποσοτική RT-PCR** για την εύρεση του **ποσού** των bcr/abl μεταγράφων (Jabbour and Kantarjian 2018). Επιπλέον συμπληρωματικά, διενεργείται και καρυότυπος με **in situ υβριδοποίηση φθορισμού** (Fluorescence in situ Hybridization, FISH) με κατάλληλους DNA φθορίζοντες ιχνηθέτες (probes) για την ανεύρεση των bcr και abl γονιδίων σε μεταφασικούς πυρήνες. Το δείγμα λαμβάνεται είτε από το περιφερικό αίμα είτε από τον μυελό των οστών (Jabbour and Kantarjian 2018).



Εικόνα 23: FISH καρυότυπος ασθενούς με ΧΜΛ. <https://www.leukemia-cell.org/atlas>

1.9.1α) Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης που μεσολαβούνται από την BCR/ABL.

i. Διαφορετικές ιδιότητες πρόσφυσης:

Τα ΧΜΛ προγονικά κύτταρα παρουσιάζουν **μειωμένη πρόσφυση** στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και στον εξωκυττάριο χώρο (Deininger, Goldman et al. 2000). Η πρόσφυση στο στρώμα ρυθμίζει

αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τα ΧΜΛ κύτταρα διαφεύγουν της ρύθμισης λόγω της μειωμένης τους πρόσφυσης. Η β-ιντεγκρίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-υποδοχέας, που διαμεσολαβεί την πρόσφυση των κυττάρων στον εξωκυττάριο χώρο καθώς και τη διασύνδεση κυττάρου-κυττάρου. Τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΜΛ εκφράζουν μια **ισομορφή της β-ιντεγρίνης, τη β1-ιντεγκρίνη**, η οποία όμως παρουσιάζει ανασταλτικό ρόλο στην πρόσφυση (*Deininger, Goldman et al. 2000*). Μόλις συνδεθούν με προσδέτες (λαμίνινες, κολλαγόνα, φιμπρονεκτίνη), οι ιντεγκρίνες ενεργοποιούν ενδοκυττάρια σηματοδότηση που εμπλέκεται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού, και λόγω της **μειωμένης πρόσφυσής** τους στο στρώμα τα σήματα που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι **μειωμένα** στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΜΛ. Η ABL φαίνεται να εμπλέκεται στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση που ενεργοποιείται από αυτά τα σήματα (*Deininger, Goldman et al. 2000*).

ii. Ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αναστολής της απόπτωσης.

✓ Μέσω ενεργοποίησης του RAS/MAPK/ERK1/2 μονοπατιού.

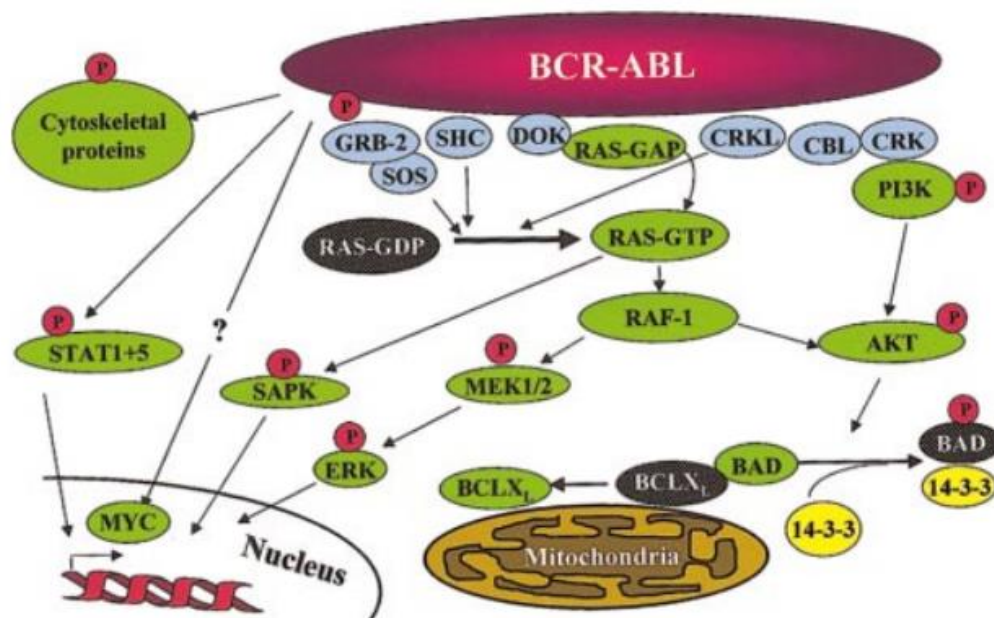
Μετά την **αυτοφωσφορυλίωση** της **BCR/ABL** (τυροσινική κινάση), η τελευταία ενεργοποιείται και συνδέεται με διάφορα υποστρώματα όπως το Grb-2, το οποίο συνδεόμενο με την Sos πρωτεΐνη επιφέρει **ενεργοποίηση** της **RAS** **GTAάσης** (*Deininger, Goldman et al. 2000*)(ενεργή μορφή=RAS-GTP). Η ενεργοποίηση της τελευταίας, θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση των **MEK1/2** κινασών σερίνης- θρεονίνης και έπειτα στην ενεργοποίηση της **ERK1/2**, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με τον **κυτταρικό πολλαπλασιασμό**.

✓ Μέσω ενεργοποίησης του Jak-Stat μονοπατιού

Στα BCR/ABL θετικά κύτταρα παρατηρείται μόνιμη **ενεργοποίηση** (μέσω φωσφορυλίωσης) των **Stat μεταγραφικών παραγόντων** (Stat1 και Stat5) (*Deininger, Goldman et al. 2000*). Ο **Stat5** γενικά παρουσιάζει πλειοτρόπα δράση, αλλά στα κύτταρα της ΧΜΛ φαίνεται να παίζει κύριο ρόλο για τον **καρκινικό τους μετασχηματισμό**, γιατί φαίνεται να μεσολαβεί την **μεταγραφική ενεργοποίηση** της αντι-αποπτωτικής **Bcl-xL** πρωτεΐνης (*Deininger, Goldman et al. 2000*).

✓ Μέσω του PI3k/Akt μονοπατιού

Η PI3K κινάση είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ΧΜΛ κυττάρων όχι μόνο για τον κρίσιμο ρόλο της στο μεταβολισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων, αλλά και για την ενεργοποίηση της **Akt κινάσης**, η οποία θα ενεργοποιήσει το **αντι-αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι** (Deininger, Goldman et al. 2000). Η BCR/ABL φαίνεται να μπλοκάρει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και άρα την συνεπακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών. Τέλος, η BCR/ABL φαίνεται να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της **αντι-αποπτωτικής Bcl-2** είτε με **Ras** είτε με **PI3K/Akt εξαρτώμενο τρόπο** (Deininger, Goldman et al. 2000).



Εικόνα 24: Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από την BCR/ABL και προωθούν τον καρκινικό φαινότυπο (Deininger, Goldman et al. 2000).

1.9.1β) Η θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας

Το θεραπευτικό τοπίο της ΧΜΛ άλλαξε δραματικά με την ανάπτυξη των **μικρών αναστολέων τυροσινικών κινασών** (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) (Deininger, Goldman et al. 2000). Αυτοί οι αναστολείς **αναστέλλουν** την λειτουργία τυροσινικής κινάσης της BCR/ABL, λειτουργώντας ως είτε ως **μιμικτικό μόριο του ATP**, το οποίο χρειάζεται η BCR/ABL για να ασκήσει τη λειτουργία της, είτε δρουν **μπλοκάροντας** την είσοδο στο **καταλυτικό κέντρο της κινάσης**,

εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της (*Deininger, Goldman et al. 2000*). Κατηγοριοποιούνται σε **πρώτης** γενιάς όπως το imatinib, **δεύτερης** γενιάς και πιο αποτελεσματικοί όπως το dasatinib, nilotinib και bosutinib και **τρίτης** γενιάς, όπως το ponatinib, για περιπτώσεις έντονης φαρμακευτικής αντίστασης στις προηγούμενες δυο κατηγορίες (*Jabbour and Kantarjian 2018*). Πριν την ανακάλυψή τους, χρησιμοποιούνταν παράγοντες αναστολής της σύνθεσης του DNA, η υδροξουρία καθώς και η θεραπεία με ιντερφερόνη-α (IFN-α) (*Jabbour and Kantarjian 2018*), που φαινόταν να αναστρέφει το φαινόμενο της διαφορετικής πρόσφυσης των ΧΜΛ κυττάρων (*Deininger, Goldman et al. 2000*). Ωστόσο, η πλέον στοχευμένη θεραπεία της ΧΜΛ έχει ανεβάσει το προσδόκιμο ζωής των ασθενών από 20% σε 80%-90% (*Jabbour and Kantarjian 2018*)!

1.9.2) Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ, AML, acute myeloid leukemia,)

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι και αυτή μια **μυελοπολλαπλαστική νεοπλασία** και προκύπτει από κάποια μη φυσιολογικά στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση HSCs (*Saultz and Garzon 2016*). Σε αντίθεση με τη χρόνια μορφή της ΧΜΛ, η ΟΜΛ είναι εξαιρετικά **ετερογενής** αιματολογική νεοπλασία (*Saultz and Garzon 2016*) και μάλλον ομοιάζει κλινικά με τη ΧΜΛ σε βλαστική κρίση (*Sillaber, Mayerhofer et al. 2003*). Κλινικά, όπως και στην ΧΜΛ, οι ασθενείς διαγιγνώσκονται κατόπιν αιματολογικής εξέτασης με έντονη **λευκοκυττάρωση** και σημάδια αποτυχημένης αιμοποίησης όπως, **αναιμία** και **θρομβοπενία** (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*). Επίσης, η παρουσία πάνω από 20% βλαστών στο περιφερικό αίμα είτε στο μυελό των οστών (κατόπιν αναρρόφησης μυελού και μυελογραφήματος), όπως και στη βλαστική κρίση της ΧΜΛ, είναι σημαντική κλινική ένδειξη της ασθένειας (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*). Ο ΠΟΥ κατηγοριοποιεί την ΟΜΛ στους κάτωθι υποτύπους: ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές μεταλλαγές, ΟΜΛ με συσχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία αλλαγές, μυελογενή νεοπλάσματα συσχετιζόμενα με τη θεραπεία, μυελογενές σάρκωμα, μυελογενείς πολλαπλασιασμοί συσχετιζόμενοι με το σύνδρομο Down και ΟΜΛ χωρίς ιδιαίτερα κριτήρια (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Saultz and Garzon 2016*). Η αιτιολογία της είναι συνήθως η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, σε καρκινογόνα χημικά, όπως το βενζόλιο και η χημειοθεραπεία, κυρίως με αλκυλιωτικούς αντινεοπλασματικούς παράγοντες (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*). Παρόλα αυτά, στην

πλειοψηφία των περιπτώσεων η ΟΜΛ συμβαίνει *de novo* σε μέχρι πρότινος υγιή άτομα (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*).

Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι, η μετατοπίσεις **t8;21** και η **t15;17**. Προϊόντα των συντηγμένων γονιδίων αποτελούν οι χμιαϊκές πρωτεΐνες, **runt-related transcription factor1** και **1T1**, **RUNX1-RUNX1T1** και η **promyeloid leukemia-retinoid acid receptor α**, **PML-RARA**, αντίστοιχα (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*). Εκτός από χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όμως, με την ασθένεια έχουν συσχετιστεί και διάφορες μεταλλαγές. Σύμφωνα με μελέτες σε ζωικά μοντέλα, οι γενετικές μεταλλαγές στην ΟΜΛ μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε **3 τάξεις** (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*):

Στις **τάξης I** κατηγοριοποιούνται αυτές που **ενεργοποιούν τα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού**, όπως μεταλλαγές στο TP53 γονίδιο, μεταλλαγές στο γονίδιο του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης KIT και μεταλλαγές στο γονίδιο της τύπου Fms τυροσινικής κινάσης 3 (FLT3) (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Saultz and Garzon 2016*). Στις **τάξης II**, αυτές που οδηγούν σε **λανθασμένη αιμοποιητική διαφοροποίηση**, όπως αυτή στο γονίδιο της νουκλεοφοσμίνης (NPM1) (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Saultz and Garzon 2016*). Στις **τάξης III**, αυτές που αφορούν γονίδια που **εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση**, όπως στο γονίδιο της μεθυλομεταφοράσης 3A του DNA (DNMT3A) και σε αυτό της μεθυλομεταφοράσης της μικτής σειράς λευχαιμίας (mixed lineage leukemia, MLL) (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Saultz and Garzon 2016*).

Για τη θεραπεία της ΟΜΛ, κυκλοφορούν διάφορα **μικρά μόρια-αναστολείς**, όπως αναστολείς FLT3 κινάσης και αναστολείς δράσης του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (*De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016*). Παρόλα αυτά έχουν προταθεί και πιο **εξατομικευμένες θεραπείες** που περιλαμβάνουν τη χρήση **μονοκλωνικών αντισωμάτων** που ασκούν την αντι-καρκινική δράση τους μέσω της άμεσης εξαρτώμενης από αντισώματα κυτταροτοξικότητας, είτε μέσω στοχευμένης μεταφοράς στο σημείο του όγκου και κατόπιν σύζευξης με κάποιον κυτταροτοξικό παράγοντα. Τέλος, προσπάθειες γίνονται και για την θεραπεία της ΟΜΛ, μέσω της τεχνολογίας **CART** (chimeric antigen T cell receptors). Το δύσκολο είναι όμως να προσδιοριστεί το κατάλληλο αντιγόνο για την ΟΜΛ, προκειμένου να στοχευθούν τα καρκινικά κύτταρα και όχι τα φυσιολογικά μυελικά κύτταρα. Για παράδειγμα, έχει αναπτυχθεί ένας CD33-ειδικός CAR υποδοχέας συνδυασμένος με το μονοκλωνικό

αντίσωμα gemtuzumab με τη χρήση του οποίου παρατηρήθηκε αυξημένη επιβίωση στα ξενόγραφα ζώα στα οποία χορηγήθηκε, καθώς και *in vitro* αντι-καρκινική δράση στις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές στις οποίες χρησιμοποιήθηκε (Kenderian, Ruella et al. 2015). Όμως, να τονιστεί σε αυτό το σημείο, ότι ο CD33 εκφράζεται και στα φυσιολογικά κύτταρα της μυελικής σειράς!

1.9.3) Πιθανοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα λευχαιμικά κύτταρα και καταστέλλουν την ανοσολογική επαγρύπνηση.

- Έκκριση ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών, όπως ιντερλευκίνη-10 (IL-10) ή μετασχηματιστικό παράγοντα αύξησης-β (TGF-β) που καταστούν τα **T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα μη δραστικά** (van Luijn, van den Ancker et al. 2009).
- **Υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών μορίων** που αναστέλλουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς που επάγονται από τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ή από τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) (van Luijn, van den Ancker et al. 2009).
- Μέσω **παραγωγής** του **MIF** και την επαγωγή στο περιβάλλον του όγκου MDSCs και TAMs (Simpson, Templeton et al. 2012, Yaddanapudi, Putty et al. 2013, Curran, Godfrey et al. 2017).
- Μέσω **μειωμένης ή καθόλου αντιγονοπαρουσίασης** (Papadimitriou, Morianos et al. 2008), για παράδειγμα μη έκφρασης στη μεμβράνη των HLA-class II μορίων ή/και μέσω μειωμένης ή καθόλου κατάλληλης επεξεργασίας του λευχαιμικού αντιγόνου από τους αντιγονοπαρουσιαστικούς μηχανισμούς (van Luijn, van den Ancker et al. 2009).
- Μέσω εξωκυττάρωσης των MHC II στα εξωσώματα: τα **διαλυτά MHCII** μπορούν να ρυθμίζουν **αρνητικά** την **ενεργοποίηση** των **T-λεμφοκυττάρων** (Papadimitriou, Zerva et al. 2013)

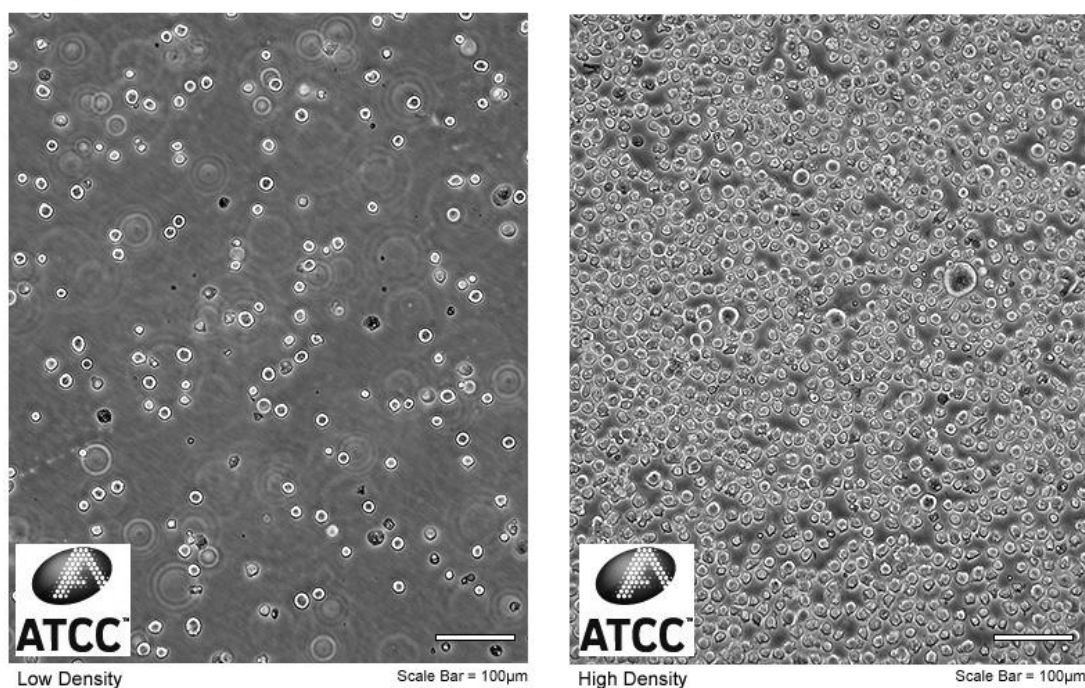
1.10) Οι σταθερές κυτταρικές σειρές των λευχαιμιών

1.10.1) K-562

Τα K-562 είναι μια σταθερή κυτταρική σειρά της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας σε βλαστική κρίση, ερυθρολευχαιμικού τύπου. Προέρχονται από γυναίκα ασθενή ηλικίας 53 ετών (<https://www.atcc.org/products/ccl->

243). Είναι εναιωρηματικά κύτταρα με μορφολογία μυελοβλαστών (<https://www.atcc.org/products/ccl-243>). Είναι Rh⁺ και επιπλέον διαθέτουν μια αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 15 και 17, t15;17 (<https://www.atcc.org/products/ccl-243>). Επιπλέον, δεν εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη MHC II μόρια ούτε MHC I, ενώ παρόλα αυτά τα πρώτα υπάρχουν ενδοκυττάρια, αλλά και σε μορφή εξωσωμάτων (Papadimitriou, Morianos et al. 2008, Papadimitriou, Zerva et al. 2013). Επίσης, εκφράζουν μόνο τη β αλυσίδα του HLA-DO ενώ, τα επίπεδα έκφρασης του HLA-DM είναι χαμηλά με το DOβ να φτιάχνει σταθερά σύμπλοκα με το DR στα ενδοσώματα (Papadimitriou, Morianos et al. 2008). Εκφράζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση CD74 από ότι MHC-II και επίσης παράγουν αυτοκρινώς MIF (Mirella, Lina et al. 2016).

ATCC Number: **CCL-243**™
Designation: **K-562**



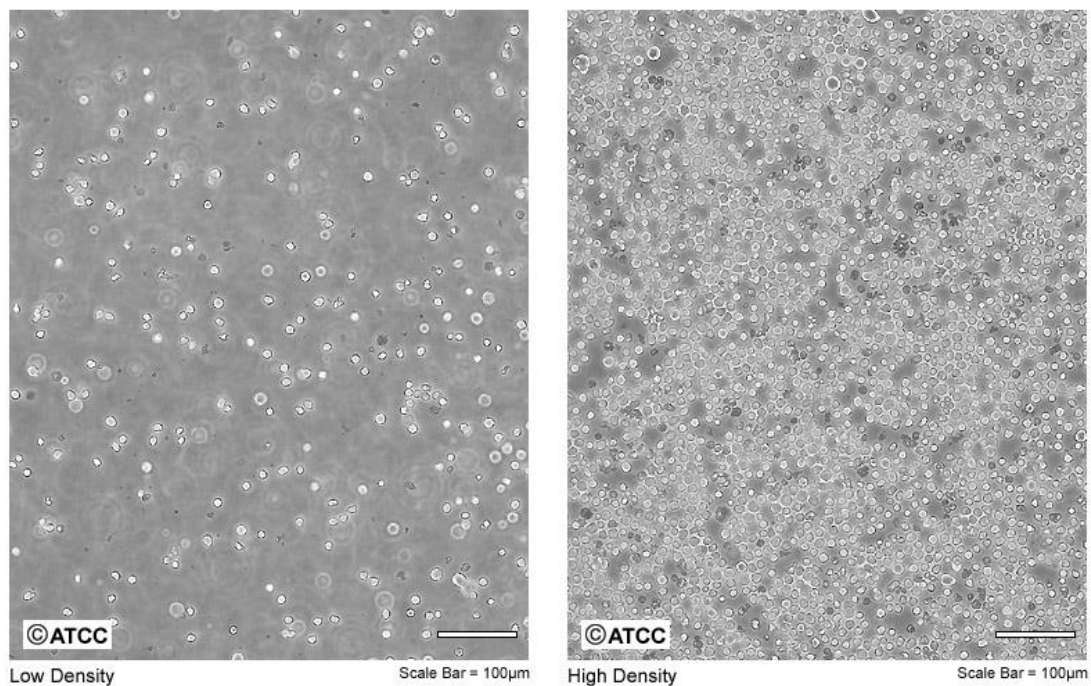
Εικόνα 25: Η μορφολογία των μυελοβλαστών της κυτταρικής σειράς K562 σε εναιωρηματική καλλιέργεια (<https://www.atcc.org/products/ccl-243>).

1.10.2) HL-60

Τα HL-60 είναι μια σταθερή κυτταρική σειρά της οξείας προμυελογενούς λευχαιμίας (<https://www.atcc.org/products/ccl-240>). Προέρχονται μια γυναίκα ασθενή, 36 ετών. Είναι εναιωρηματικά κύτταρα με μορφολογία ουδετερόφιλων προμυελοβλαστών

(<https://www.atcc.org/products/ccl-240>). Είναι Rh- και όπως και τα K-562 έχουν την t15;17 αμοιβαία μετατόπιση (<https://www.atcc.org/products/ccl-240>). Επίσης, δεν εκφράζουν MHC II στην κυτταρική τους μεμβράνη και εκφράζουν μόνο τη β αλυσίδα του DO (Papadimitriou, Morianos et al. 2008). Εκφράζουν, όπως και τα K562, CD74 και MIF. Τέλος, μέσω επαγωγής με IFN-γ, μπορούν να εκφράσουν ένα ποσοστό MHC II στην μεμβράνη τους σε αντίθεση με τα K-562 και να αυξήσουν την παραγωγή του MIF (Mirella, Lina et al. 2016).

ATCC Number: **CCL-240**
Designation: **HL-60**



Εικόνα 26: Η μορφολογία των προμυελοβλαστών της κυτταρικής σειράς HL-50 σε εναιωρηματική καλλιέργεια (<https://www.atcc.org/products/ccl-240>).

Σκοπός της εργασίας

Ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς αποφυγής της ανοσολογικής επαγρύπνησης από τα λευχαιμικά κύτταρα είναι η απουσία MHC II μορίων στην κυτταρική τους μεμβράνη. Παρόλο που τα λευχαιμικά κύτταρα έχουν ενδοκυττάρια αποθέματα των MHC II, δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος ο μηχανισμός με τον οποίο τα MHC II ‘φυλακίζονται’ στο ενδοκυττάριο περιβάλλον και δεν εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Ερευνώντας αυτόν τον μηχανισμό καθώς και τις πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στον εγκλωβισμό των MHC II στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, ίσως να είναι το κλειδί για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των λευχαιμιών καθώς και άλλων καρκίνων που ‘κρύβονται’ από το ανοσοποιητικό σύστημα, χρησιμοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό.

Στην παρούσα εργασία το ενδιαφέρον στράφηκε, στον MIF και τους υποδοχείς του, CD74 και CXCR4. Δεδομένου του διττού ρόλου του CD74 στα λευχαιμικά κύτταρα, είτε ως μοριακός συνοδός των MHC II είτε ως MIF υποδοχέας, αλλά και τη σημασία του ίδιου του MIF στην προώθηση του καρκινικού φαινοτύπου μέσω της πυροδότησης ενδοκυττάριας σηματοδότησης, δημιουργήθηκαν τα ερωτήματα: α) ότι ο MIF μπορεί να είναι ένας πιθανός ανταγωνιστής του MHC II ως προς την πρόσδεση στον CD74 αλλά, και β) πώς οι MIF υποδοχείς, CD74 και CXCR4, πιθανόν επηρεάζουν το ενδοκυτταρικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης.

Στο πλαίσιο της εργασίας επιλέχθηκαν οι σταθερές λευχαιμικές σειρές K562 και HL-60 για την διαλεύκανση της εμπλοκής τόσο των MIF υποδοχέων, CD74 και CXCR4, αλλά και του MIF στο μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II μορίων και εξακριβώθηκαν τα ενδοκυττάρια και μεμβρανικά επίπεδα των MIF, CD74 και CXCR4.

Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση του μεταγραφικού συνενεργοποιητή των MHC II, CIITA, στα ενδοκυτταρικά και μεμβρανικά επίπεδα έκφρασης των MIF υποδοχέων, CD74 και CXCR4 με τη χρήση της σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς K562-CIITA-K9.

Τέλος, ελέγχθηκε, αν η καταβολική δραστηριότητα των καθεψινών, επηρεάζει τα ενδοκυτάρια, μεμβρανικά και εκκρινόμενα επίπεδα έκφρασης των MIF υποδοχέων, CD74 και CXCR4, μέσω αναστολής της δράσης τους από τον αναστολέα όξινων πρωτεασών, πεπστατίνη Α.

2) Υλικά και Μέθοδοι

2.1) Κυτταροκαλλιέργειες

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι σταθερές κυτταρικές σειρές K-562 (ATCC) και HL-60 (ATCC) καθώς και, η διαμολυσμένη κυτταρική σειρά K-562-CIPTA-K9, που υπερεκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα CIPTA. Όλες οι κυτταρικές σειρές ξεπαγώθηκαν από τους -80°C, στο υδατόλουτρο για 3-5 λεπτά στους 37°C, και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI (Biosera) εμπλουτισμένο με 20% FBS (Biosera) και 50μg/ml γενταμυκίνη (Gibco) σε T-25 φλάσκες (Sarstedt) κατάλληλες για εναιωρηματική καλλιέργεια. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε αυτές τις συνθήκες έως ότου έφταναν στην μέγιστη πυκνότητά τους (**confluency**). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 6 λεπτά στις 1200 στροφές, καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό RPMI (Biosera) εμπλουτισμένο με 10% FBS (Biosera) και 50μg/ml γενταμυκίνη (Gibco) και επώαση για συνεχή καλλιέργεια 3ών-4ων ημερών σε T-75 φλάσκες (Greiner bio-one Cellstar®) κατάλληλες για εναιωρηματική καλλιέργεια, σε τελικό όγκο 18 mL. Μετά από 3-4 μέρες γινόταν αλλαγή θρεπτικού υλικού. Κάθε φυγοκέντρηση θεωρήθηκε ως 1 passage και όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με καλλιέργειες κάτω των 5-6 passages. Τα κύτταρα παγώθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI (Biosera) με 20% FBS (Biosera), 50μg/ml γενταμυκίνη (Gibco) και 10% DMSO (Thermo) σε κατάλληλα cryovial και τοποθετήθηκαν στους -80°C.

Οι κυτταρικές σειρές επωάζονταν σε επωαστήρα (Forma Scientific) με 5% CO₂ και 37°C.

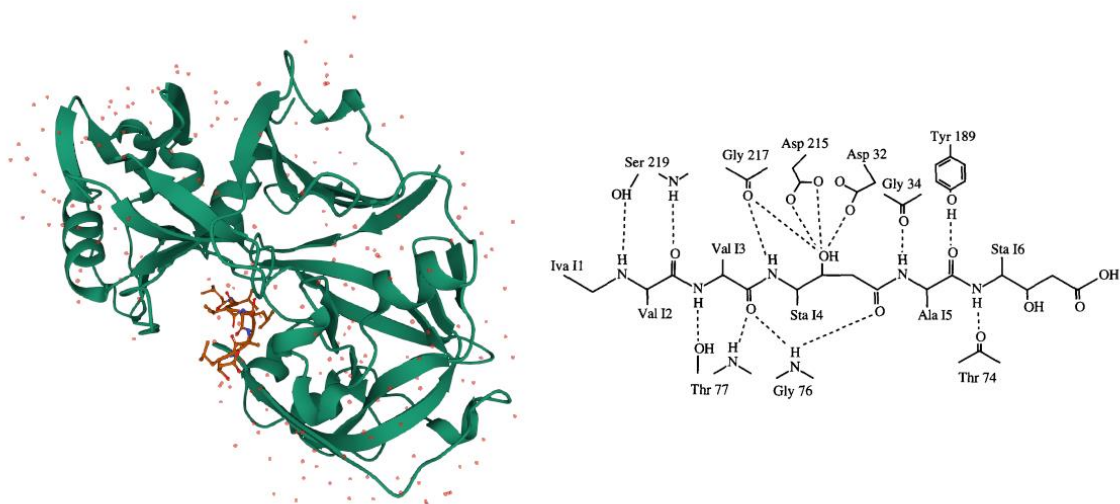
Η φυγοκέντρηση γίνονταν σε φυγόκεντρο KUBOTA 5100.

2.2) Επώαση των κυτταρικών σειρών με Πεπστατίνη-A

Εφόσον οι καλλιέργειες φτάνανε τη μέγιστη πυκνότητα τους (~85% confluent, ~700000 κύτταρα/ml για τα K562 και ~900000 κύτταρα/ml για τα HL-60), οι κυτταρικοί πληθυσμοί διαχωρίζονταν (split), φυγοκεντρίζονταν για 6 λεπτά στις 1200 στροφές και επαναδιαλύονταν σε θρεπτικό υλικό RPMI (Biosera) με 10% FBS (Biosera) και 50μg/ml γενταμυκίνη σε T-75 φλάσκες (Greiner bio-one Cellstar®), σε τελικό όγκο 18 ml. Μετά από 3 μέρες συνεχούς καλλιέργειας, τα κύτταρα στρώνονταν σε βάρα πλάκα (Sarstedt) με συγκέντρωση 600000 κύτταρα/ml και 550000 κύτταρα/ml για τα K562 και τα HL-60

αντίστοιχα και επωάζονταν με 1 µg/ml πεπστατίνης-A (*Sigma*) για 48 ώρες (*Athanassakis, Protoparadakis et al. 1999*) στους 37°C και 5% CO₂. Μετά τις 48 ώρες, τα κύτταρα απομονώθηκαν για ανοσοφθορισμό και τα υπερκείμενα για ELISA.

Η πεπστατίνη A είναι ένας αναστολέας όξινων πρωτεασών, πιο συγκεκριμένα ασπαρτυλ-πρωτεασών, όπως η πεψίνη και η καθεψίνες E και D. Είναι ένα εξαπεπτίδιο που περιέχει το ασυνήθιστο αμινοξύ **στατίνη** και παράγεται από διάφορα είδη του *Ακτινομύκητα* (*Umezawa, Aoyagi et al. 1970*). Το αμινοξύ στατίνη (4-άμινο-3 υδρόξυ-6-μεθυλοεπανοϊκό οξύ) φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την αναστολή των όξινων πρωτεασών, διότι μιμείται το τετραεδρικό μεταβατικό στάδιο της πεπτιδικής κατάλυσης, που χρησιμοποιείται από τις όξινες πρωτεάσες (*Marciniszyn, Hartsuck et al. 1976*).



Εικόνα 27: Η πεπστατίνη-A (πορτοκαλί) στο ενεργό κέντρο της πεψίνης (πράσινο)-αριστερά (<https://www.rcsb.org/3d-view/1PSO/1>) . Οι πιθανοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της πεψίνης και του εξαπεπτιδίου της πεπστατίνης-A-δεξιά (*Fujinaga, Chernaiia et al. 1995*).

2.3) Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση μεμβρανικών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων με τη χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων ειδικών για το αντιγόνο (πρωτεΐνη) του ενδιαφέροντος. Για την ανίχνευση ενδοκυττάρων αντιγόνων η κυτταρική μεμβράνη πρέπει να γίνει διαπερατή στα αντισώματα είτε **μόνιμα** είτε **παροδικά**.

Μετά την 48ωρη επώαση με πεπστατίνη-A ή μετά από 3-4 μέρες συνεχούς καλλιέργειας σε T-75 φλάσκες, για τον εξοκυτόριο ανοσοφθορισμό, 10^6 κύτταρα ανά δείγμα ξεπλύθηκαν 1 φορά με 1X PBS (*Sigma*). Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά με διάλυμα Blocking Buffer, 3% w/v BSA (*Sigma*)-1X PBS (*Sigma*) σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C. Κάθε δείγμα φορτώθηκε σε πηγάδια μιας 96άρας πλάκας V-bottom (*Sarstedt*) και επώαστηκε με το κατάλληλο αντίσωμα σε συγκέντρωση 1μg/ml, διαλυμένο σε Antibody Buffer, 1% w/v BSA (*Sigma*)-1X PBS (*Sigma*), για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C. Σε περίπτωση που τα αντισώματα δεν είναι συζευγμένα με φθορίζουσα χρωστική απαιτείται επώαση με δεύτερο αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική και είναι ειδικό να αναγνωρίζει το πρώτο. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα έγινε σε κατάλληλη αραιώση σε Antibody Buffer για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C. Τέλος, τα δείγματα, ξεπλύθηκαν με 1X PBS (*Sigma*), τοποθετήθηκαν σε FACs tubes και μετρήθηκαν για την εξακρίβωση της έντασης φθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Για τον ενδοκυττάριο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιήθηκαν 1500000 κύτταρα ανά δείγμα και πριν την επώαση με Blocking Buffer, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παγωμένης παραφορμαλδεΐδης 4% w/v (*Sigma-Aldrich*) και επώαστηκαν στο πάγο για 10 λεπτά. Έπειτα, η μεμβράνη έγινε **μόνιμα** διαπερατή σε αντισώματα με επώαση των κυττάρων σε διάλυμα παγωμένης μεθανόλης 20% v/v (*Merck*) για 15 λεπτά στον πάγο. Μετά από κάθε βήμα τόσο του εξοκυτόριου όσο και του ενδοκυττάριου φθορισμού, γινόταν 2X πλύσεις με 1X PBS (*Sigma*).

Αντισώματα:

- ✓ **CD74:** mouse anti-human CD74 monoclonal antibody PE conjugated clone By2 (IgG1) anti human Ii (short & long forms) (Santa Cruz Cat. number sc -20062 –PE)
- ✓ **MIF:** goat anti-human/ rat/mouse MIF (Santa Cruz Cat. number sc-16965)
- ✓ **CXCR4:** mouse anti-human CXCR4 (ENDOGEN)
- ✓ **HLA-DO:** mouse anti- HLA-DO (DoB.L1, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)
- ✓ **HLA-DR:** FITC-labelled mouse anti-HLA-DR (L243, Santa Cruz, Paso Robles, CA, USA)
- ✓ **HLA-DM:** mouse anti-HLA-DM (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)
- ✓ anti-mouse IgG-PE (Santa Cruz) σε αραιώση 1/2000

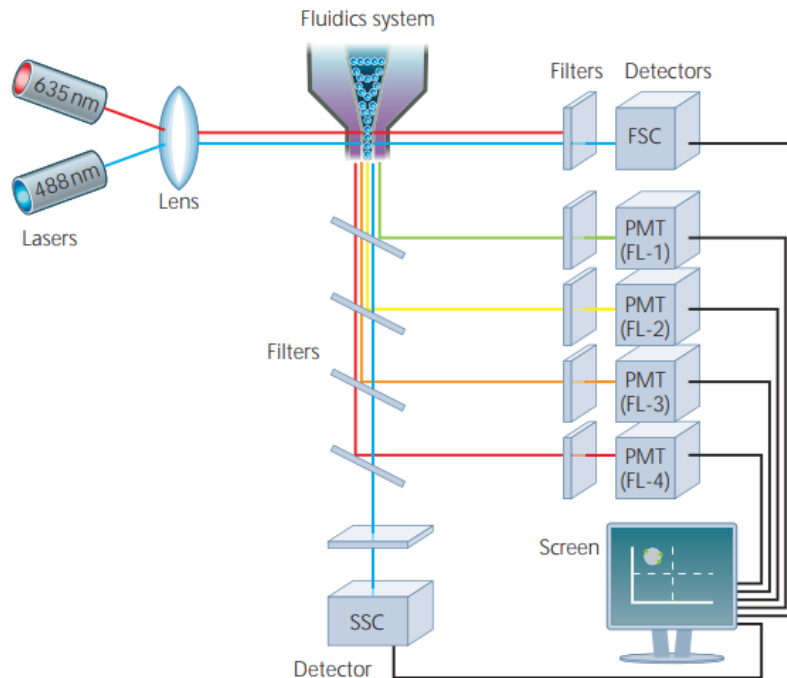
✓ anti-goat-IgG-FITC σε αραιώση 1/3500

2.4) Κυτταρομετρία ροής (FACs)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση της κυτταρικής επιφάνειας καθώς και των ενδοκυττάρων μορίων και μπορεί να χαρακτηρίσει και να διακρίνει διάφορους κυτταρικούς υποτύπους σε έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό, αναλύοντας το κυτταρικό μέγεθος και την κοκκιότητα (<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>).

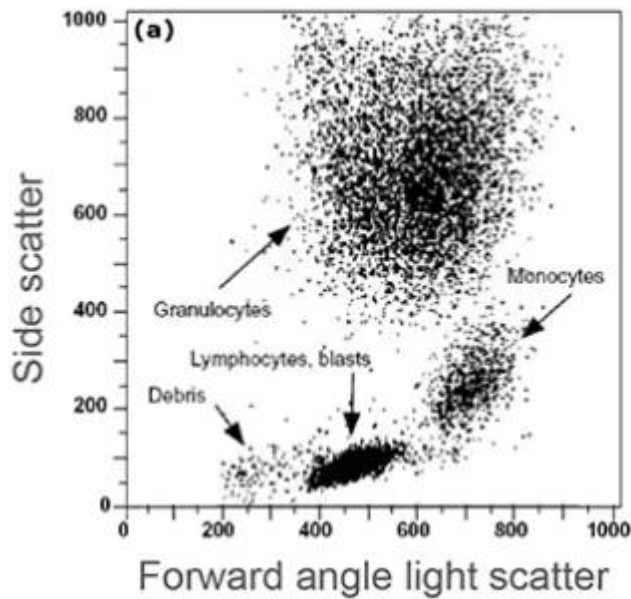
Επιπλέον, μπορεί να μετρήσει την ένταση φθορισμού που προέρχεται από φθορίζοντα αντισώματα ειδικά να αναγνωρίσουν πρωτεΐνες ή από φθορίζοντες προσδέτες π.χ Propidium Iodide που προσδένονται ειδικά σε ενδοκυττάρια μόρια, όπως το DNA (<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>). Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της έντασης φθορισμού από φθορίζοντα αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος CD74, MIF, CXCR4, HLA-Doβ, HLA-DM και HLA-DR.

Μέσω υδροδυναμικής εστίασης παράγεται μια μονή ροή κυττάρων ή σωματιδίων και καθώς ένα κύτταρο ή ένα σωματίδιο διέρχεται από το Laser του κυτταρομετρητή ροής, σκεδάζει το φως με αποτέλεσμα στην οθόνη του υπολογιστή, που είναι συνδεδεμένος ο κυτταρομετρητής, να καταγράφονται στοιχεία που σχετίζονται με το μέγεθός του (**Forward Scatter Channel**) και με την κοκκιότητά του (**Side Scatter Channel**).



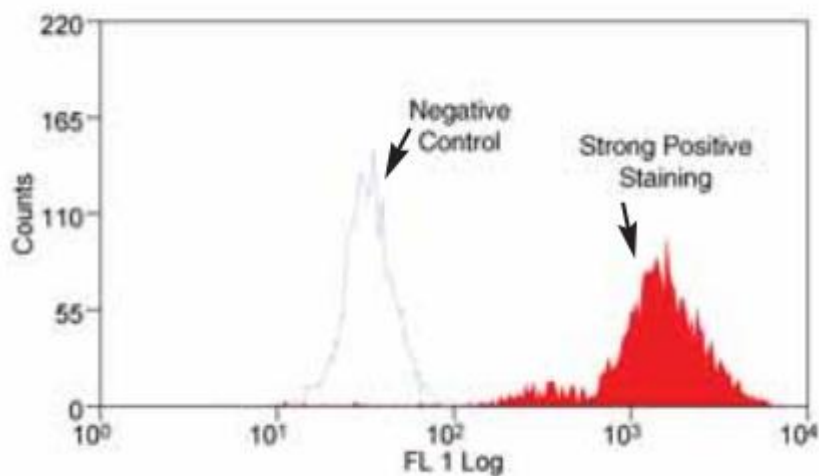
Εικόνα 28: Η διάταξη του κυτταρομετρητή ροής (FACs) ([https://smhs.gwu.edu/flow-cytometry/sites/flow-cytometry/files/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec\(1\).pdf](https://smhs.gwu.edu/flow-cytometry/sites/flow-cytometry/files/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec(1).pdf))

Πιο αναλυτικά, στον οριζόντιο άξονα FSC, το φως σκεδάζεται υπο 20° γωνία σε σχέση με τον άξονα της ακτίνας laser, γι' αυτό η ένταση του φωτός στον FSC άξονα ισοδυναμεί με το μέγεθος του κυττάρου ή σωματιδίου. Στον κάθετο άξονα SSC, το φως σκεδάζεται υπό 90° γωνία σε σχέση με τον άξονα της ακτίνας laser και γι' αυτό η ένταση του φωτός στον SSC άξονα ισοδυναμεί με την κοκκιότητα του κυττάρου. Με βάση αυτές τις πληροφορίες μπορεί να γίνει διάκριση των διαφορετικών υποπληθυσμών κυττάρων μέσα σε ένα σύνθετο-ετερογενές δείγμα κυττάρων.



Εικόνα 29: Το κοκκιογράμμα, FSC/SSC σε έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό. Κάθε κουκκίδα αποτελεί ένα σωματίδιο ή κύτταρο (<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>).

Αν κάποιο μόριο έχει σημανθεί με φθορίζουσα χρωστική ή αντίσωμα τότε μετριέται η ένταση του φθορισμού σε διάφορα μήκη κύματος π.χ στο FL1 Channel για πράσινο και στο FL2 Channel για κόκκινο, με αποτέλεσμα να καταγράφονται στην οθόνη του υπολογιστή ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα τόσο για τα μεμβρανικά όσο και για τα ενδοκυττάρια μόρια που έχουν σημανθεί.



Εικόνα 30: Το 1D ιστόγραμμα μέτρησης έντασης φθορισμού στο πράσινο Channel FL1. Το αρνητικό control τοποθετείται κοντά στην αρχή των αξόνων, ενώ το θετικό σε φθορισμό δείγμα πιο δεξιά. Η αυτή η μετατόπιση μεταξύ αρνητικού control και θετικού δείγματος δείχνει την ένταση του φθορισμού και το ποσοστό των θετικών κυττάρων(που φθορίζουν) μέσα στον πληθυσμό ([https://smhs.gwu.edu/flow-cytometry/sites/flow-cytometry/files/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec\(1\).pdf](https://smhs.gwu.edu/flow-cytometry/sites/flow-cytometry/files/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec(1).pdf)).

Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φθορίζοντα αντισώματα συζευγμένα με την φθορίζουσα χρωστική FITC, που απορροφά στα 490 nm και εκπέμπει στα 525 και συνεπώς αποδίδει πληροφορία στο FL1 Channel και φθορίζοντα αντισώματα συζευγμένα με την φθορίζουσα χρωστική PE, που απορροφά στα 490 και 565 nm και εκπέμπει στα 578 nm και συνεπώς αποδίδει πληροφορία στο FL2 Channel. Οι μετρήσεις έγιναν στο κυτταρομετρητή ροής FACScan της εταιρίας Becton Dickinson και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με το *FCS express 3.0*.

2.5) Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA)

Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA) είναι μια ανοσοβιοχημική μέθοδος για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αντιγόνων, πρωτεϊνών, πεπτιδίων και ορμονών σε διαλύματα ή κυτταρικές επιφάνειες. Η οπτικοποίηση της αντίδρασης γίνεται μέσω ενζύμου και χρωμογόνου υποστρώματος και συνεπώς μετριέται σε φωτόμετρο. Στα πειράματα αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε η **indirect ELISA** και η μετρήσεις έγιναν σε φωτόμετρο κατάλληλο για μέτρηση ELISA plate, της εταιρίας *Biotek (Biotek-Synergy HT)*.

Μετά την 48ωρη επώαση με πεπστατίνη-A ή μετά από 3-4 μέρες συνεχούς καλλιέργειας σε T-75 φλάσκες, τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών συλλέχθηκαν και φυλάχθηκαν στους -20°C. Ξεπαγώθηκαν ομαλά με μετάβαση στους 4°C και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C, και κατόπιν καλής ανάδευσης σε Vortex διαλύθηκαν σε Coating buffer, 0.05M NaHCO₃, 0.05 Na₂CO₃ pH 9.6 σε αραιώση 1:1 και στρώθηκαν σε 96 πλάκα flat bottom (*Sarstedt*). Ακολούθησε επώαση για 16-18 ώρες στους 4°C. Μετά την επώαση, ακολούθησαν 3X πλύσεις με Washing buffer, 1X PBS (*Sigma*)-0,05% v/v Tween (*Calbiochem*), και

επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C , με Blocking Buffer, 2% w/v BSA (*Sigma*)-1X PBS (*Sigma*). Κατόπιν 3X πλύσεων με Washing buffer, ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα, ειδικό για τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος CD74, MIF, CXCR4 και HLA-DR, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C. Έπειτα από 3X πλύσεις με Washing buffer, ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα ειδικό για το πρώτο και συζευγμένο με το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP), για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C. Μετά από 3X πλύσεις με Washing buffer, προστέθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα TMB (*TMB Substrate Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA*) σε αραιώση 1:1. Μετά από 10-15 λεπτά και την εμφάνιση του χαρακτηριστικού μπλε χρώματος, η αντίδραση σταμάτησε με τη χρήση H₂SO₄ σε συγκέντρωση 1M. Η πλάκα μετρήθηκε στα 450 nm. Τόσο τα πρώτα όσο και τα δεύτερα αντισώματα ήταν διαλυμένα σε Antibody Buffer, 0,1% w/v BSA (*Sigma*)-1X PBS (*Sigma*) και προστέθηκαν σε αραιώση 1/1000 και 1/5000 αντίστοιχα.

Αντισώματα:

- ✓ **CD74:** CD74 purified mouse anti-human monoclonal antibody, clone By2 (IgG1) anti-human Ii (short & long forms) (Santa Cruz, Cat.number sc-20062)
- ✓ **MIF:** goat anti-human/ rat/mouse MIF (Santa Cruz Cat. number sc-16965)
- ✓ **CXCR4:** mouse anti-human CXCR4 (ENDOGEN)
- ✓ **HLA-DR:** mouse anti-HLA-DP, DQ, DR (HB145; ATCC, Rockville, MD, USA)
- ✓ anti-goat-IgG-HRP (Thermo)
- ✓ anti-mouse-IgG-HRP (Thermo)

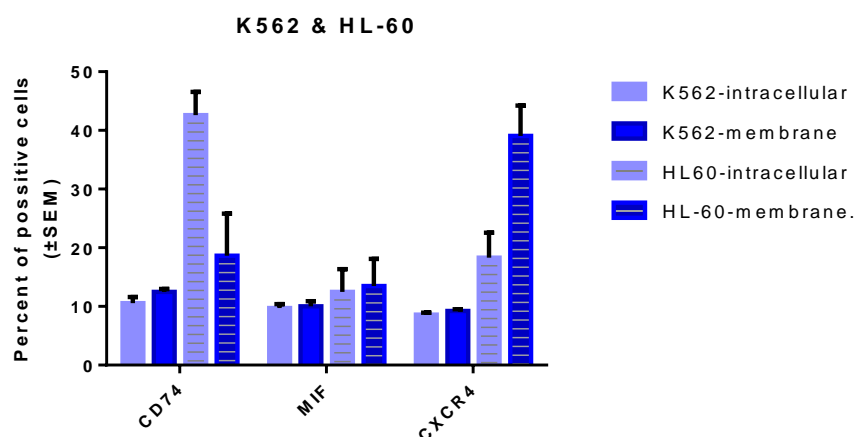
2.7) Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα *Graph Pad Prism 6*. Χρησιμοποιήθηκε το unpaired t-test για τη σύγκριση των στατιστικά σημαντικών επιπέδων (p) μεταξύ των τιμών ελέγχου και των τιμών των αποτελεσμάτων .

3) Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1) Η μεμβρανική και ενδοκυττάρια έκφραση των MIF υποδοχέων, CD74 και CXCR4 στις σταθερές κυτταρικές σειρές K562 και HL-60.

Στις σταθερές κυτταρικές σειρές, K562 και HL-60 διαπιστώθηκαν τόσο τα μεμβρανικά όσο και τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης του MIF και των υποδοχέων του. Για την διαπίστωση των ενδοκυττάρια επιπέδων, η μεμβράνη έγινε μόνιμα διαπερατή σε μακρομόρια, όπως αντισώματα.



Γράφημα 1: Τα μεμβρανικά και ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης των MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4 στα K562 και HL-60, όπως προκύπτουν από τον ανοσοφθορισμό και την επακόλουθη μέτρηση με κυτταρομετρίας ροής. Οι τιμές προκύπτουν από την ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής και το γράφημα σχεδιάστηκε στο Graph Pad Prism 6. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών πειραμάτων.

Για την κυτταρική σειρά K562, παρατηρούνται παρόμοια επίπεδα του MIF και των υποδοχέων του CD74 και CXCR4 με (intracellular) ή χωρίς (membrane) διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη αυτών των πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη και όχι στα ενδοκύτταρα διαμερίσματα. Εφόσον, ο CD74 βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη των K562, παραπέμπει σε εξασθενημένη ή καθόλου δυνατότητα αντιγονοπαρουσίασης από τα K562. Οπότε και να υπάρχουν λειτουργικά ενδοκυττάρια αποθέματα MHC II στα K562, ο CD74 δεν βρίσκεται στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα για να επιτελέσει το ρόλο του ως μοριακός συνοδός των MHC II, δηλαδή αφενός να προφυλάξει την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του MHC II από την πρόωρη πρόσδεση αντιγονικών πεπτιδίων και αφετέρου να καθοδηγήσει τα MHC II από το αδρό ER στα ενδοσωμικά κυστίδια, όπου θα

φορτωθούν με το αντιγονικό πεπτίδιο (*Fortin, Cloutier et al. 2013*). Η ύπαρξη του CXCR4 στη μεμβράνη και όχι στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς είναι 7TM υποδοχέας (*Busillo and Benovic 2007*). Η φάση καλλιέργειας που απομονώθηκαν τα K562 για ανοσοφθορισμό καταδεικνύει ότι ο MIF βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο και πιθανόν προσδεμένος στο σύμπλοκο CD74/CXCR4, καθώς είναι γνωστό ότι δρα αυτοκρινικά, αλλά και παρακρινικά (*Mirella, Lina et al. 2016*). Η απουσία έκφρασης του CD74 από τα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, υποδεικνύει ότι τα K562 μπορεί να αξιοποιούν το μεμβρανικό σύμπλοκο CD74/CXCR4 για την πρόσδεση του MIF και μάλλον την πυροδότηση της MIF ενδοκυττάριας σηματοδότησης (*Jankauskas, Wong et al. 2019*), που προωθεί τον κακοήγη φαινότυπο των K562, κάτι που μένει να διαπιστωθεί.

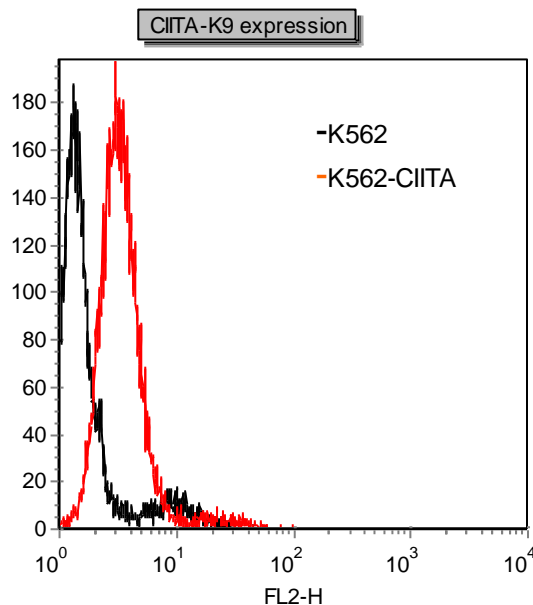
Από την άλλη μεριά, στα HL-60 παρατηρείται αυξημένο ποσοστό έκφρασης του CD74 στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, γεγονός που δίνει στα HL-60 τη δυνατότητα της αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II, καθώς ο CD74 είναι διαθέσιμος για να επιτελέσει το ρόλο του ως μοριακός συνοδός. Με φανερά χαμηλότερο ποσοστό εμφανίζεται ο CD74 στην κυτταρική μεμβράνη των HL-60, σε αντίθεση με το ποσοστό του μεμβρανικού CXCR4, που είναι σαφώς υψηλότερο, καταδεικνύοντας και σε αυτήν την κυτταρική σειρά την αντίστασή του στην ενδοκυττάρωση και υποβάθμισή του. Εδώ, εγείρεται το ερώτημα της στοιχειομετρίας του μεμβρανικού συμπλόκου CD74/CXCR4 στα HL-60 σε σχέση με τα K562. Ο MIF φαίνεται να ακολουθεί παρόμοιο μοτίβο έκφρασης στη μεμβράνη με τον CD74, που δείχνει την αναγκαιότητα της ύπαρξης του CD74 για την πρόσδεσή του στο σύμπλοκο CD74/CXCR4 και ταυτόχρονα αναδεικνύει και το ρόλο του CD74 ως MIF υποδοχέα.

Συμπερασματικά, οι δύο κυτταρικές σειρές φαίνεται να χρησιμοποιούν με διαφορετικό τρόπο τον CD74, τα μεν K562 μάλλον ως MIF υποδοχέα, ενώ τα HL-60 κυρίως ως μοριακό συνοδό των MHC II. Αν και κλινικά, η χρόνια μυελογενής λευχαιμία στη βλαστική της κρίση είναι παρόμοια με την οξεία μυελογενή λευχαιμία, εδώ παρατηρείται ότι οι κυτταρικές σειρές, που αντανakλούν στην κάθε μορφή λευχαιμίας, K562 και HL-60, αντίστοιχα, παρουσιάζουν έναν διαφορετικό φαινότυπο, με τα K562 να είναι ίσως πιο κακοήγη από τα HL-60, με τα τελευταία να διατηρούν τη δυνατότητα της αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II.

3.2) Η εμπλοκή του μεταγραφικού συνενεργοποιητή των MHC II, CIITA στα επίπεδα έκφρασης του MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας ότι τα K562 δεν εκφράζουν λειτουργικό CIITA, ελέγχθηκε εάν η αδυναμία έκφρασής του, που συνεπάγεται αδυναμία μεταγραφής των MHC II, μπορεί να επηρεάζει την παραμονή του CD74 στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, καθώς και την επίδρασή του στην έκφραση των CXCR4 και MIF.

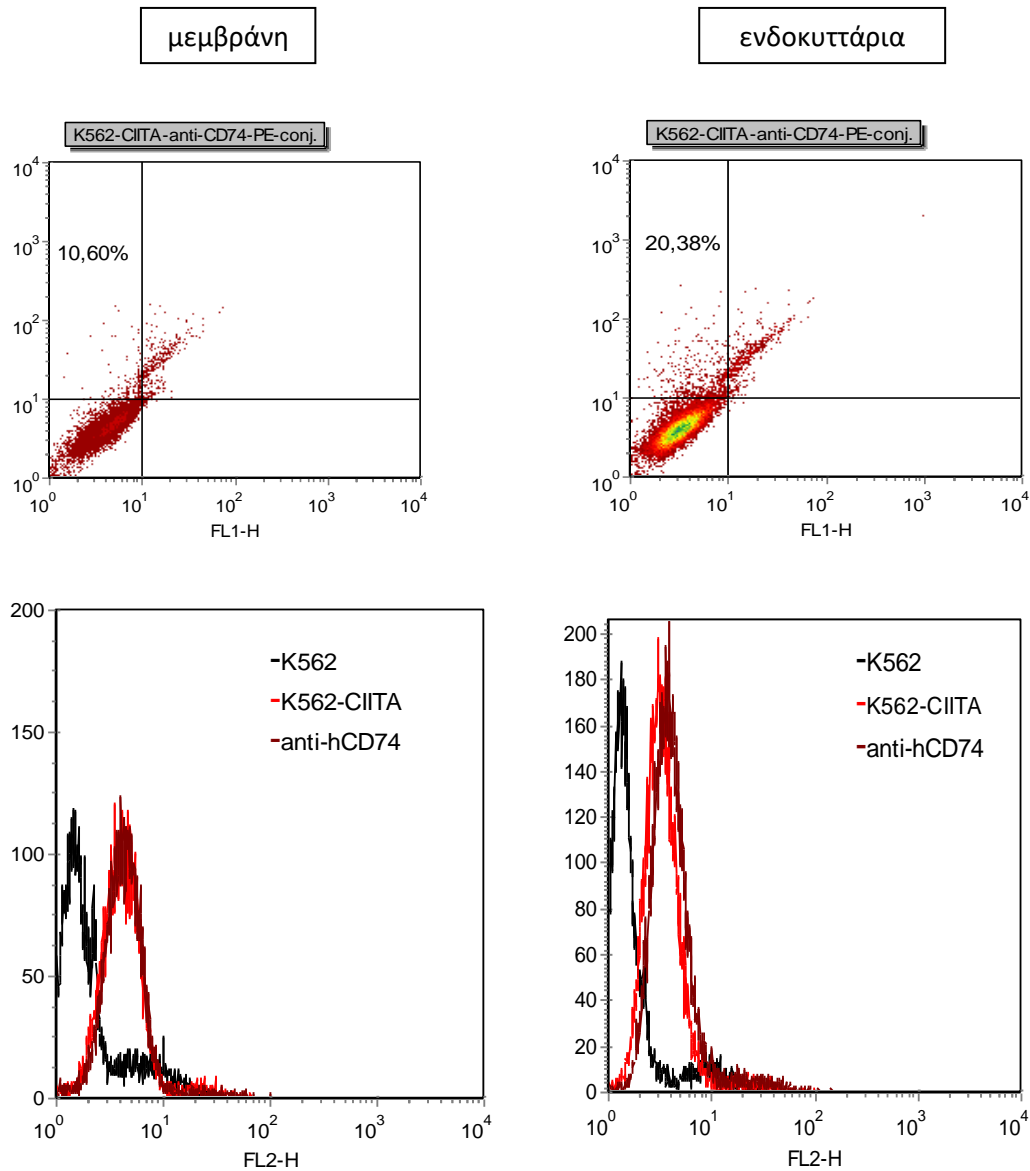
Για να εξακριβωθούν τα παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε η σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά, K562-CIITA-K9, που υπερεκφράζει τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή των MHC II, CIITA.



Εικόνα 31: Ανάλυση της έκφρασης του CIITA στη διαμολυσμένη κυτταρική σειρά K562-CIITA-K9 σε σχέση με τα K562 όπως αυτή προκύπτει από την κυτταρομετρία ροής.

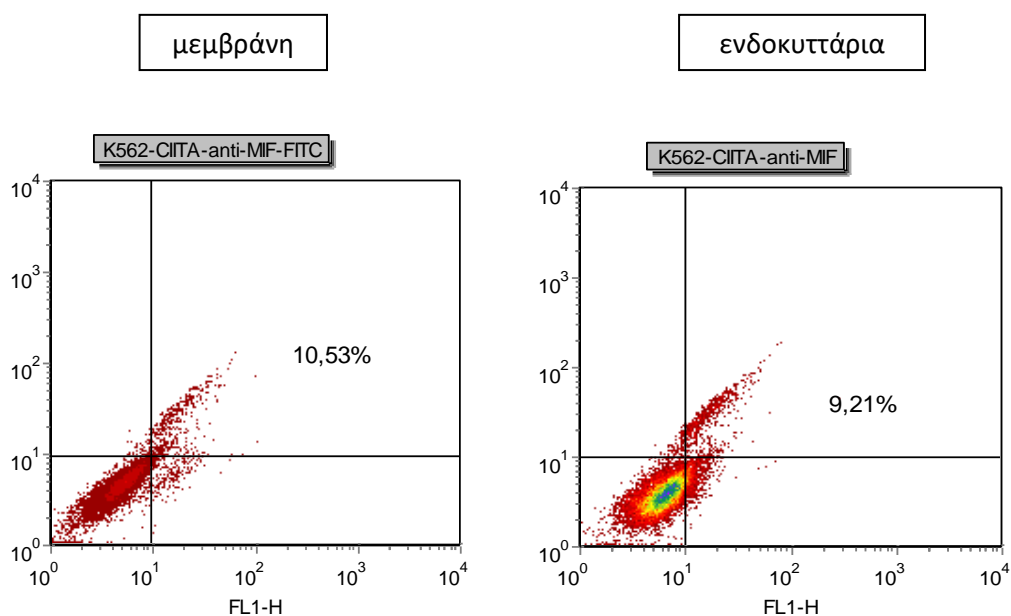
Από την ανάλυση των δεδομένων, που προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής, τα διαμολυσμένα K562-CIITA-K9 φαίνεται να εκφράζουν σε 69,13% τον CIITA, όπως παρατηρείται στο ιστόγραμμα (Εικ.31) από την μετατόπιση της καμπύλης φθορισμού των K562-CIITA-K9 συγκριτικά με τα K562.

Εφόσον διαπιστώθηκε η ικανοποιητική έκφραση του CIITA στην διαμολυσμένη κυτταρική σειρά, K562-CIITA-K9, ελέγχθηκε η μεμβρανική και ενδοκυττάρια έκφραση του MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4 με ανοσοφθορισμό και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 32: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του CD74 στα K562-CIITA-K9, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του CD74 στα K562-CIITA-K9 σε σχέση με την CIITA έκφραση, όπως προκύπτουν από την ανάλυση ιστογράμματος της κυτταρομετρίας ροής.

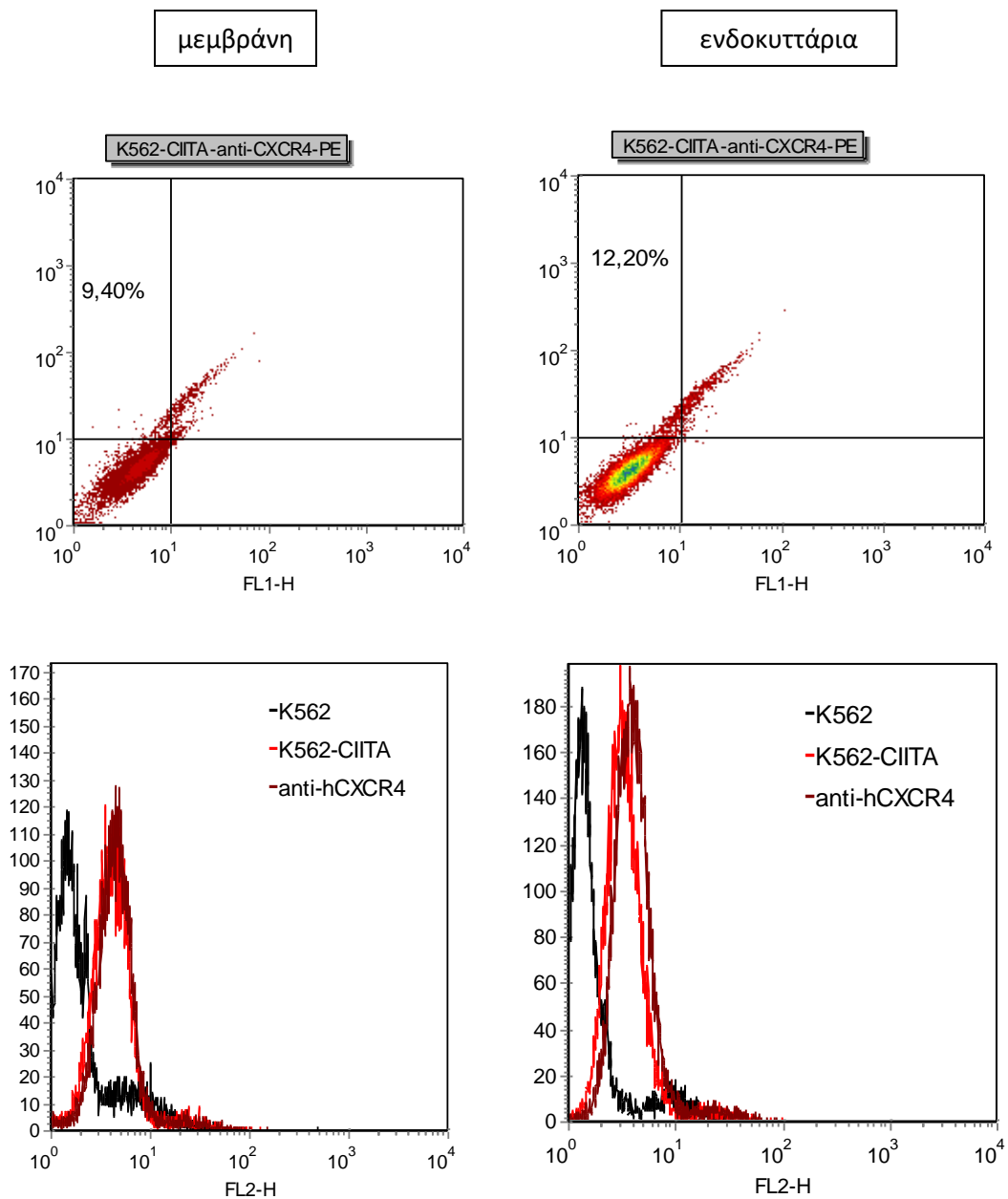
Με την επαναφορά του λειτουργικού CIITA παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην ενδοκυττάρια έκφραση του CD74 σε σχέση με τη μεμβράνη. Η έκφραση του CIITA φαίνεται να εμπλέκεται θετικά στην παραμονή του CD74 στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα και άρα στην επιτέλεση του ρόλου του ως μοριακός συνοδός των MHC II μορίων. Όπως αναφέρθηκε και στο 1.6) η έκφραση του CIITA είναι κρίσιμης σημασίας για τη μεταγραφή των MHC II και η αδυναμία της έκφρασής του, μηχανισμός χρησιμοποιούμενος από πολλούς καρκίνους, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία επεξεργασίας των MHC II στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι (*van Luijn, van den Ancker et al. 2009*), κάτι που ενδεχομένως στα K562 να εκφράζεται με την αδυναμία παραμονής του CD74 στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα.



Εικόνα 33: Τα μεμβρανικά επίπεδα (αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (δεξιά) έκφρασης του MIF στα K562-CIITA-K9, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού.

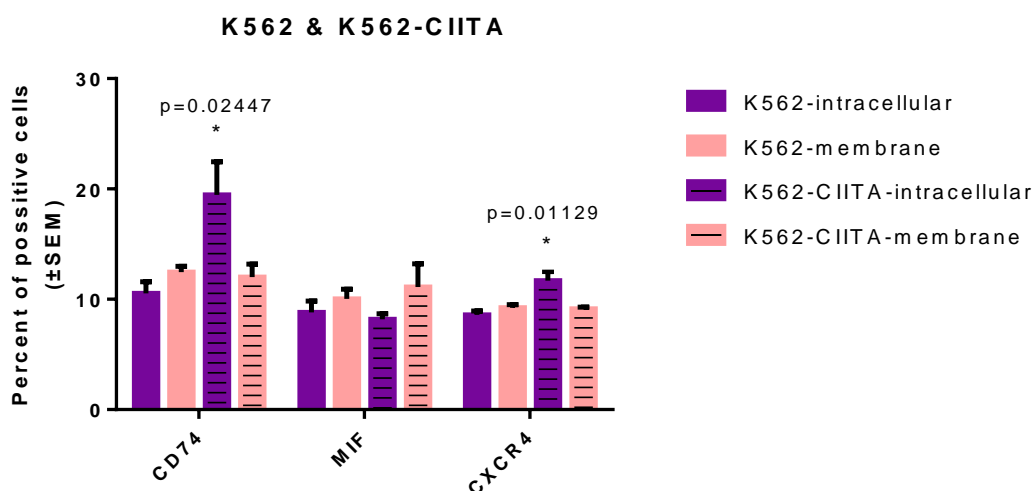
Στα διαμολυσμένα K562-CIITA-K9 παρατηρούνται παρόμοια επίπεδα μεμβρανικής και ενδοκυττάριας έκφρασης του MIF, όπως αυτά προκύπτουν από τον ανοσοφθορισμό και τη μέτρηση με κυτταρομετρία ροής, γεγονός που δείχνει ότι βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη πιθανόν προσδεδεμένος στο σύμπλοκο CD74/CXCR4. Μάλιστα, αντίστοιχα ποσοστά παρατηρούνται και στην μεμβρανική έκφραση του CD74 και του CXCR4, καταδεικνύοντας, ότι ο CIITA, μάλλον δεν εμπλέκεται στη

ρύθμιση της στοιχειομετρίας του συμπλόκου CD74/CXCR4, αλλά και ούτε στην ρύθμιση της έκφρασης του MIF.



Εικόνα 34: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του CXCR4 στα K562-CIITA-K9, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του CXCR4 στα K562-CIITA-K9 σε σχέση με την CIITA έκφραση, όπως προκύπτουν από την ανάλυση του ιστογράμματος της κυτταρομετρίας ροής.

Η επαναφορά του CIITA, τέλος, φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα του CXCR4, που καταδεικνύει ότι η έκφραση του λειτουργικού CIITA στα K562, μπορεί να βοηθά στην αύξηση των επιπέδων ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα CXCR4.



Γράφημα 2: Τα μεμβρανικά και ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης των MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4 στα K562 και στα διαμολυσμένα K562-CIITA-K9, όπως προκύπτουν από τον ανοσοφθορισμό και την επακόλουθη μέτρηση με κυτταρομετρίας ροής. Οι τιμές προκύπτουν από την ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής και το γράφημα σχεδιάστηκε στο Graph Pad Prism 6. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα στατιστικώς σημαντικά επίπεδα, $p=0,02$ για τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης του CD74 σε σχέση με το μεμβρανικό επίπεδο έκφρασής του και $p=0,01$ για τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης του CXCR4 σε σχέση με τα μεμβρανικά επίπεδα έκφρασής του στα διαμολυσμένα K562-CIITA-K9. Οι p -value τιμές $< 0,05$ θεωρήθηκαν σημαντικές.

Συνοψίζοντας, με την έκφραση του λειτουργικού συνενεργοποιητή των MHC II γονιδίων, CIITA, στα διαμολυσμένα K562-CIITA-K9, αυξήθηκαν σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα ενδοκυττάριας έκφρασης των MIF υποδοχέων, CD74 και CXCR4, σε σχέση με τα K562, τα οποία δεν εκφράζουν λειτουργικό CIITA. Με τον CD74 να παραμένει στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα και όχι στη μεμβράνη, τα K562-CIITA-K9 μπορεί να παρουσιάσουν μια δυναμική αντιγονοπαρουσίασης μέσω του ενδοκυτταρικού μονοπατιού και των MHC II, αφού θα είναι ικανός να

επιτελέσει το ρόλο του ως καθοδηγητής των τελευταίων από το αδρό ER στα MHCs, αλλά και ως φύλακας της αύλακας πρόσδεσης πεπτιδίου των MHC II (*Fortin, Cloutier et al. 2013*). Επιπλέον, η έκφραση λειτουργικού CITA στα K562-CITA-K9, φαίνεται να κατευθύνει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα CXCR4, με αποτέλεσμα χαμηλότερα ποσοστά μεμβρανικής έκφρασης του τελευταίου. Με τα υψηλά επίπεδα του ενδοκυττάρου CD74, τα K562-CITA-K9, καταφέρνουν να πλησιάσουν το φαινότυπο των HL-60 ως αναφορά στην ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II, συν το πλεονέκτημα της υψηλότερης ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα CXCR4 και την πιθανή υποβάθμισή του. Με τους δύο υποδοχείς να εντοπίζονται κυρίως στο ενδοκυττάριο περιβάλλον και όχι τόσο πολύ στη μεμβράνη, ίσως τα K562-CITA-K9, να τροχοπεδούν κάπως την MIF ενδοκυττάρια σηματοδότηση και άρα την προώθηση του λευχαιμικού φαινοτύπου (*Jankauskas, Wong et al. 2019*).

3.3) Η επίδραση των καθεσινών στα ενδοκυττάρια, μεμβρανικά και εκκρινόμενα επίπεδα έκφρασης των MIF υποδοχέων, CD74 και CXCR4 στις κυτταρικές σειρές K562 και HL-60.

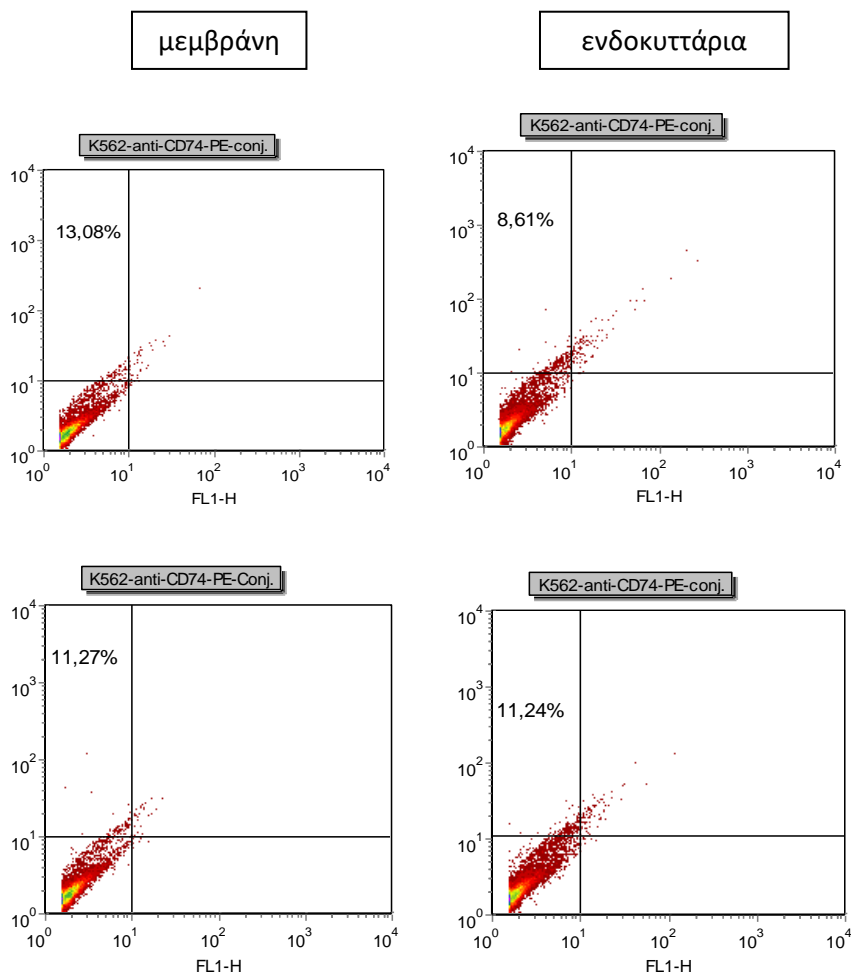
Οι διαφορές μεταξύ των ενδοκυττάρων και μεμβρανικών επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών του ενδιαφέροντος, οδήγησαν στο ερώτημα του κατά πόσο ο καταβολισμός των πρωτεϊνών αυτών από καθεσίνες διαδραματίζει κάποιο ρόλο στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων του MIF. Οι καθεσίνες, όπως αναφέρθηκε στο 1.5.1) παίζουν σημαντικό ρόλο στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης, με τις καθεσίνες S και L να συνδράμουν στην ωρίμανση των MHC II μορίων, μέσω της αποικοδόμησης του CD74 (*Riese, Wolf et al. 1996*) και τις καθεσίνες B και D, να είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των αντιγονικών πεπτιδίων, που θα φορτωθούν στα MHC II (*Rodriguez and Dimen 1995*). Ωστόσο, η καθεσίνη D φαίνεται να συντελεί και αυτή στην πρωτεόλυση και την απελευθέρωση των MHC II από τον CD74 (*Zhang, Maekawa et al. 2000*). Εκτός από το ενδοκυτταρικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης όπως και άλλες φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου (ανάπτυξη, απόπτωση, ομοιόσταση), οι καθεσίνες επιτελούν καίριο ρόλο και στον καρκίνο, μέσω της καταβολικής δραστηριότητάς τους στα καρκινικά κύτταρα (*Rakash 2012*)(*Edwards, Hoøer-Hansen et al. 2008*). Τόσο τα εξωκυττάρια, όσο και τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης πρωτεασών, όπως οι καθεσίνες, μπορούν να επηρεάσουν σε

σημαντικό βαθμό τα ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Οποιαδήποτε αλλαγή στην έκφρασή τους είναι ικανή να οδηγήσει σε διαταραγμένη είτε ενδοκυττάρια είτε εξωκυττάρια σηματοδότηση, με αποτέλεσμα κάποια παθολογική κατάσταση, όπως η καρκινογένεση (Edwards, Hoøer-Hansen et al. 2008). Στον καρκίνο, μια ‘διαταραχή’ στη σηματοδότηση, μπορεί να προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα το εξελικτικό πλεονέκτημα, που δυναμικά θα οδηγήσει σε περεταίρω ογκογενετικές αλλαγές και στην προώθηση της μετάστασης (Edwards, Hoøer-Hansen et al. 2008). Πρόσφατες έρευνες αναδεικνύουν το ρόλο των καθεψινών και το λυσοσωμικό καταβολισμό με όλα τα στάδια της ογκογένεσης και όχι μόνο με τα τελικά και πιο επιθετικά, όπως θεωρούνταν στο παρελθόν, αναδεικνύοντας τον όρο *cancer degradome* και την πρωτεόλυση, ως μια από τις σημαντικότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Edwards, Hoøer-Hansen et al. 2008).

Για παράδειγμα, η δραστηριότητα της καθεψίνης B, που ανήκει στην οικογένεια των κυστεϊνοπρωτεασών, συσχετίζεται με την αύξηση και τη μεταστατική ικανότητα ενός όγκου (Rakash 2012). Επιπλέον, η δραστηριότητα της καθεψίνης D, που ανήκει στην οικογένεια των ασπαρτυλοπρωτεασών, διεγείρει τον καρκινικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, καθώς και τη μετάσταση σε διάφορους όγκους, όπως αυτού του μαστού και του προστάτη (Rakash 2012) (Benes, Vetvicka et al. 2008). Συχνά, λοιπόν, η έκφραση των καθεψινών B και D χρησιμοποιείται ως μάρτυρας εξέλιξης της ασθένειας (Rakash 2012) (Benes, Vetvicka et al. 2008). Επιπλέον, η ειδική αναστολή της καθεψίνης D, από την πεπστατίνη-A, σε καρκινικές σειρές του προστάτη, του μαστού και του νευροβλαστώματος, έχει δείξει την ενεργοποίηση της κασπασοερξαρτώμενης απόπτωσης, γεγονός που αναδεικνύει την καθεψίνη D σε σημαντικό μόριο για την στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία (Castino, Pace et al. 2002, Maynadier, Vezenkov et al. 2013).

Για να ελεγχθεί η εμπλοκή ή όχι των καθεψινών στον καταβολισμό των του MIF και των MIF υποδοχέων, οι κυτταρικές σειρές K562 και HL-60, επώαστηκαν για 48h με τον αναστολέα ασπαρτυλοπρωτεασών, πεπστατίνη-A, ειδικό για την καθεψίνη D, και αποτυπώθηκε το προφίλ των παραγόντων ενδιαφέροντος με ανοσοφθορισμό και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

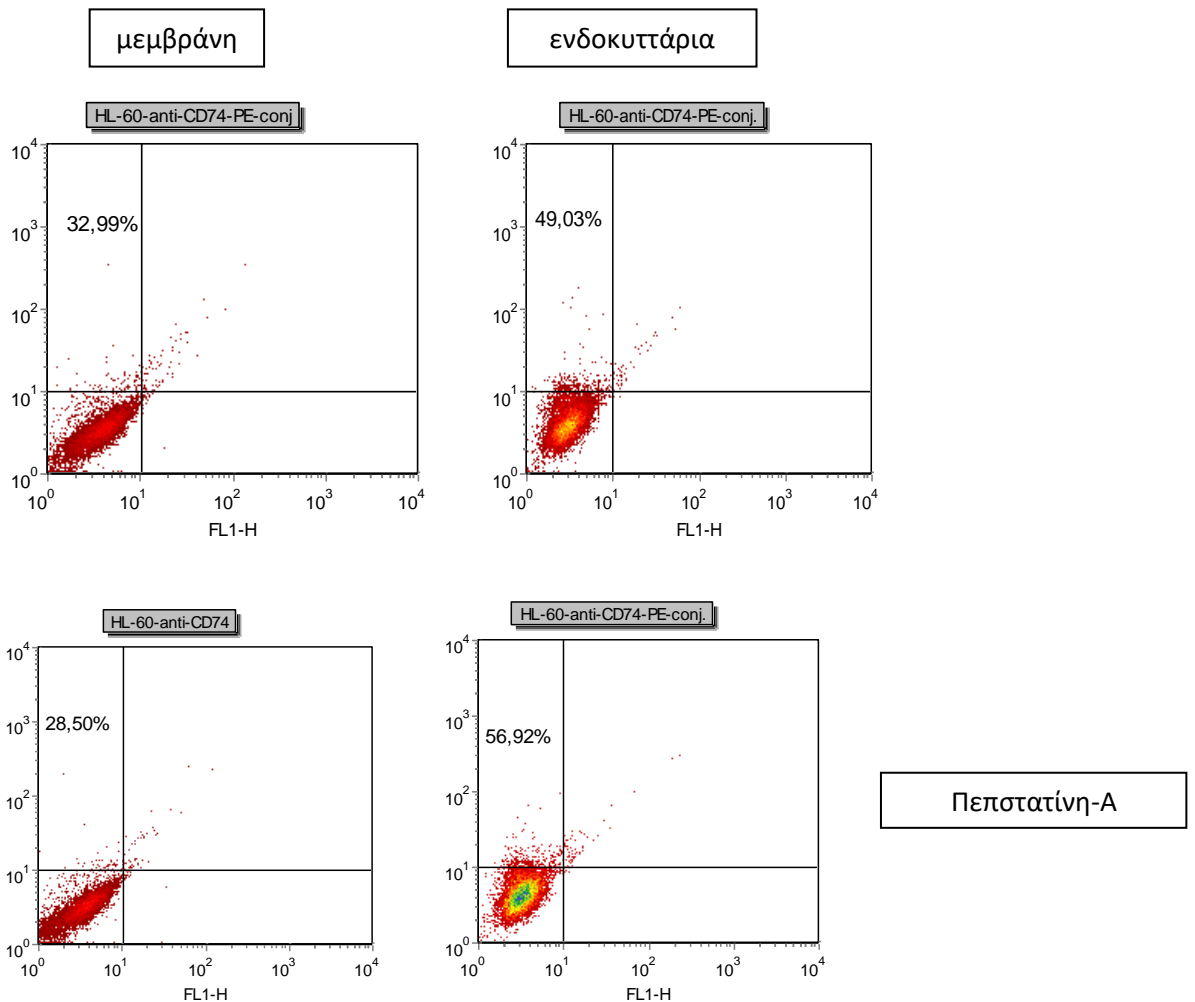
K562



Πεπστατίνη-A

Εικόνα 35: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του CD74 στα K562, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του CD74 στα K562 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής.

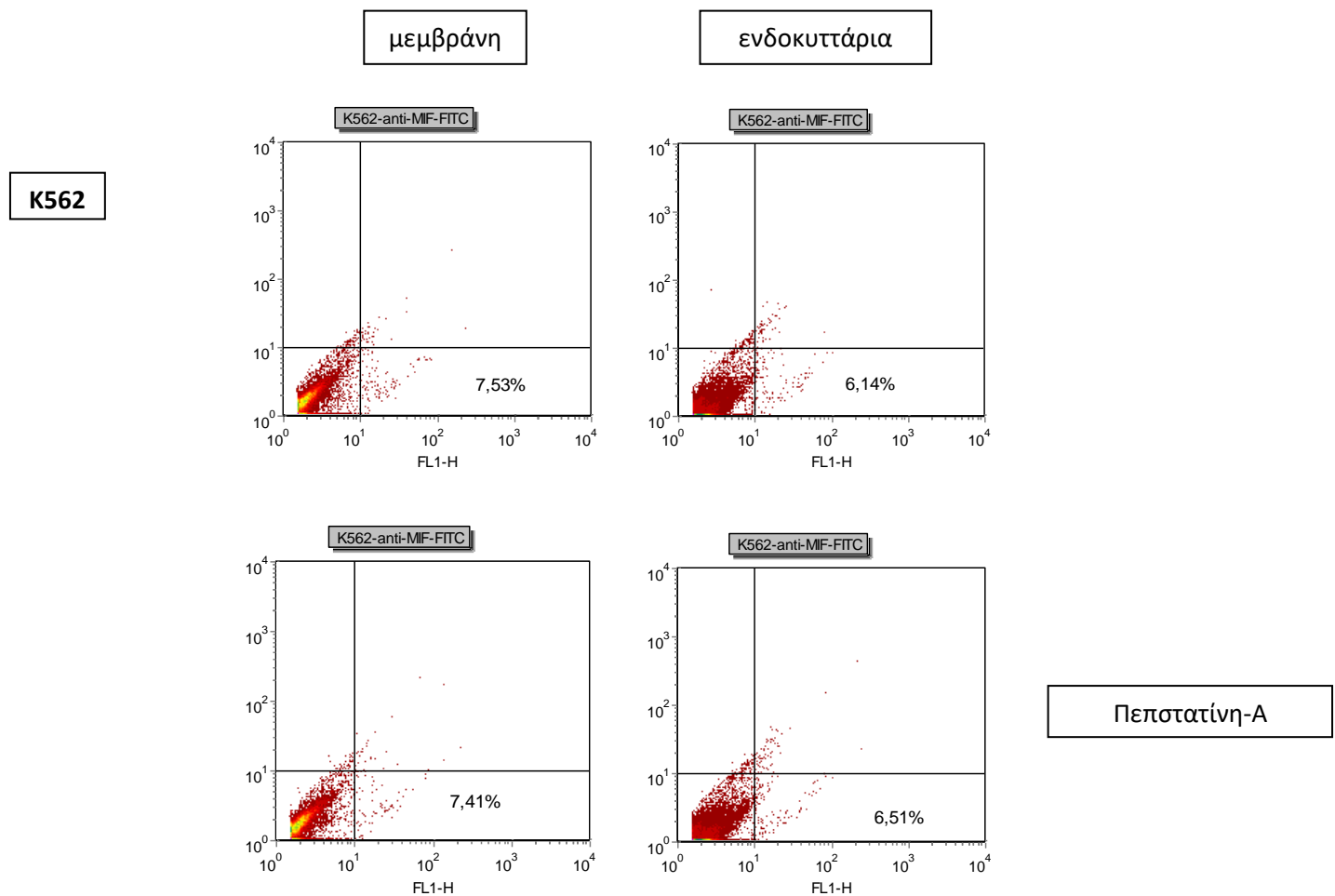
HL-60



Εικόνα 36: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του CD74 στα HL-60, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του CD74 στα HL-60 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής.

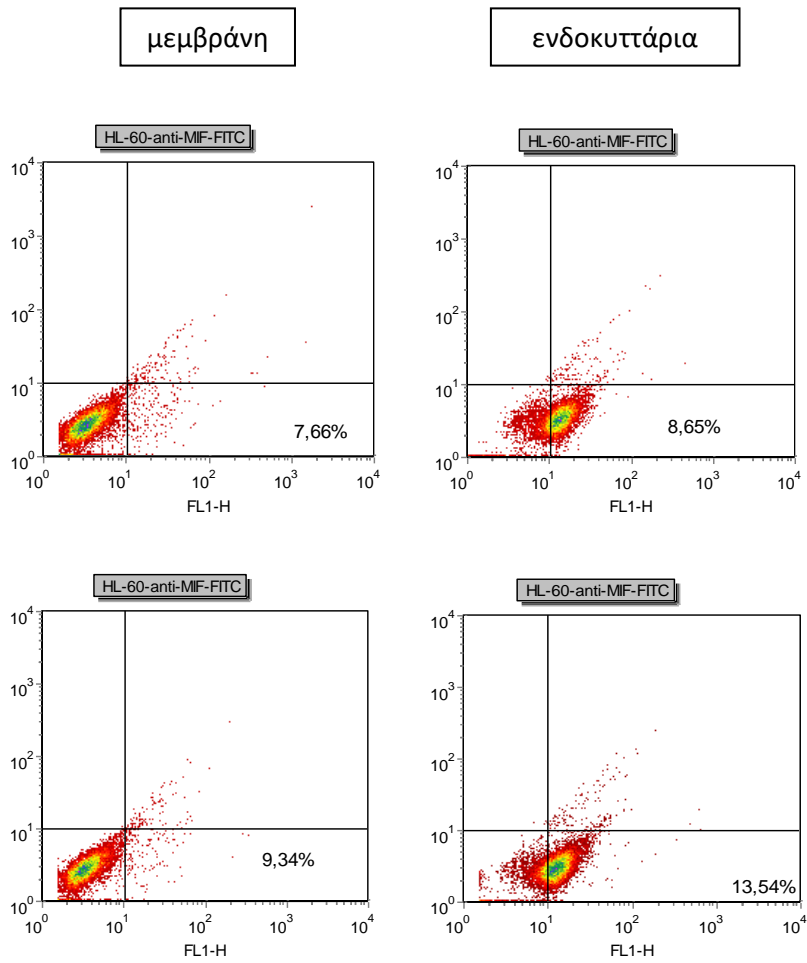
Τόσο στα K562 όσο και στα HL-60, η επώαση με πεπστατίνη-A αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα του CD74, γεγονός που υποδηλώνει την ενδοκυττάρωση και τον καταβολισμό του από την καθεψίνη D. Επιπλέον

στην περίπτωση των K562 θα μπορούσε να εξηγήσει, γιατί ο βρίσκεται κυρίως στη μεμβρανική του μορφή.



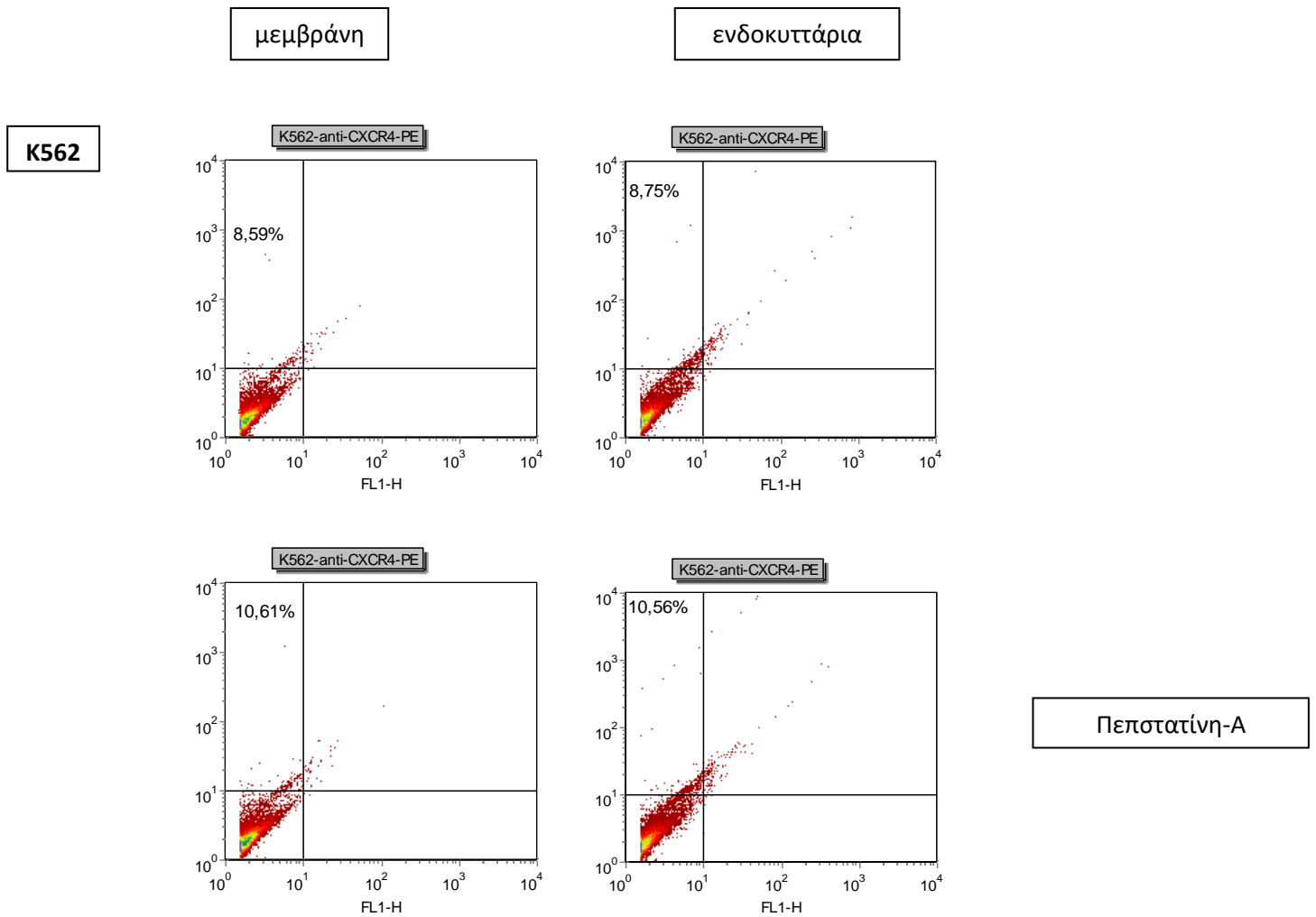
Εικόνα 37: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του MIF στα K562, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του MIF στα K562 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής.

HL-60

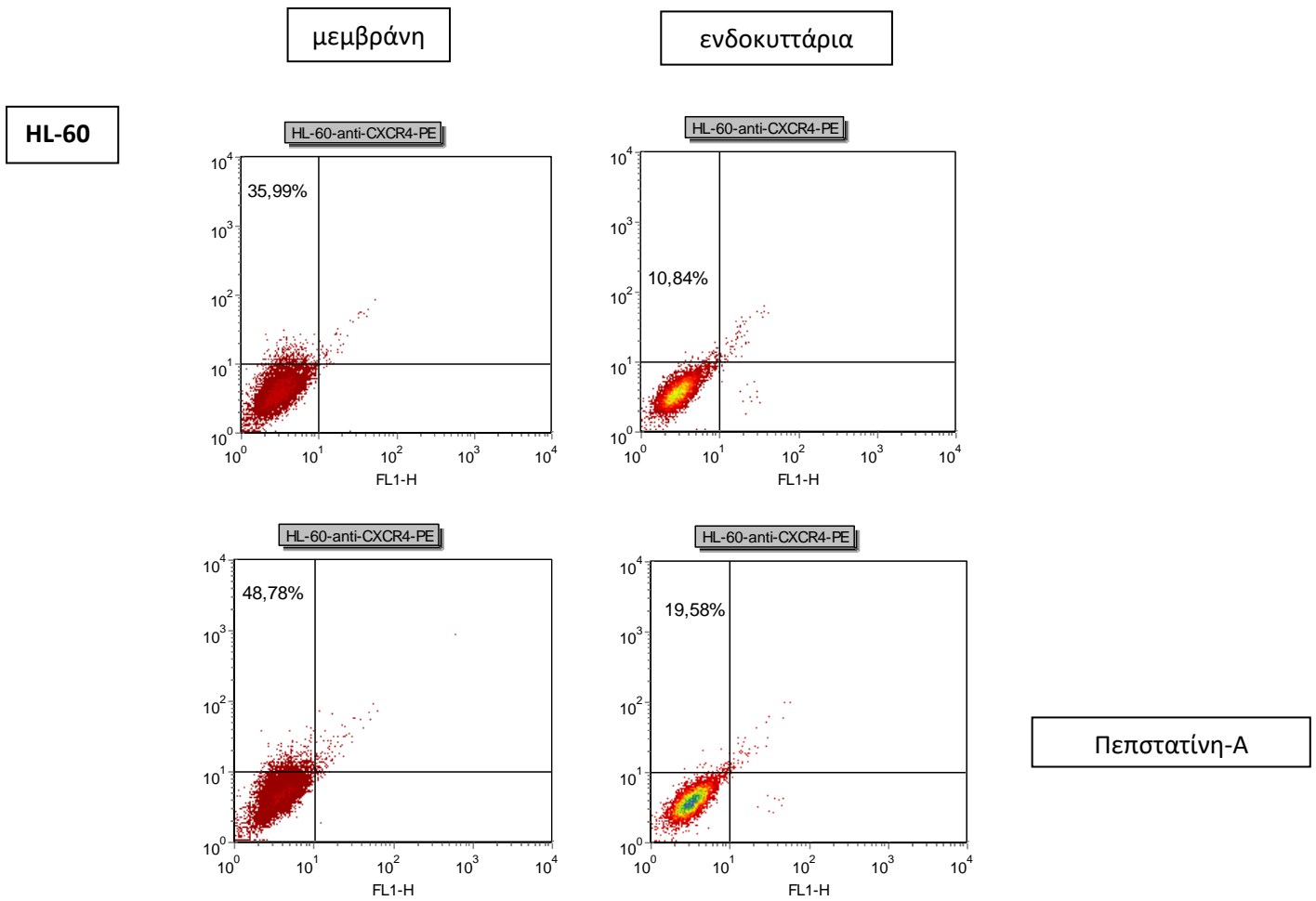


Πεπστατίνη-A

Εικόνα 38: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του MIF στα HL-60, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του MIF στα HL-60 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής.



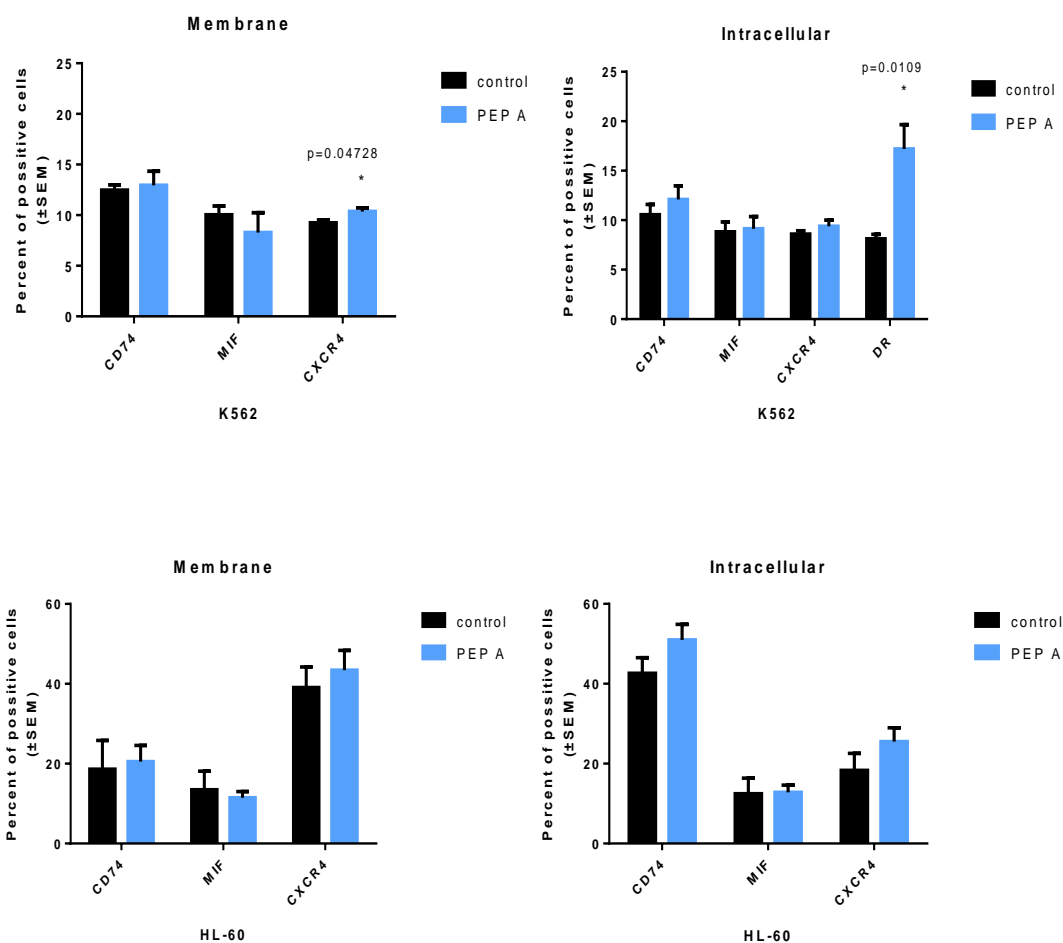
Εικόνα 39: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του CXCR4 στα K562, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του CXCR4 στα K562 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπσατίνης-A, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 40: Τα μεμβρανικά επίπεδα (πάνω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (πάνω δεξιά) έκφρασης του CXCR4 στα HL-60, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής. Τα μεμβρανικά επίπεδα (κάτω αριστερά) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα (κάτω δεξιά) έκφρασης του CXCR4 στα HL-60 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A, όπως αυτά προκύπτουν από τα διαγράμματα της έντασης του φθορισμού της κυτταρομετρίας ροής.

Στα K562 η επώαση με την πεπστατίνη δείχνει να αυξάνει σημαντικά τα μεμβρανικά επίπεδα του CXCR4, καταδεικνύοντας τον έμμεσο ρόλο της καθεψίνης D, η οποία πρωτεολύοντας κάποιο άλλο υπόστρωμα δεν επιτρέπει την έκφραση του στη μεμβράνη σε μεγάλο βαθμό. Η αναστολή της καθεψίνης D από την πεπστατίνη-A φαίνεται να καθοδηγεί τον CXCR4 στη μεμβράνη των K562. Από την άλλη πλευρά, στα HL-60 μετά την επώαση με πεπστατίνη-A παρατηρείται αύξηση στα

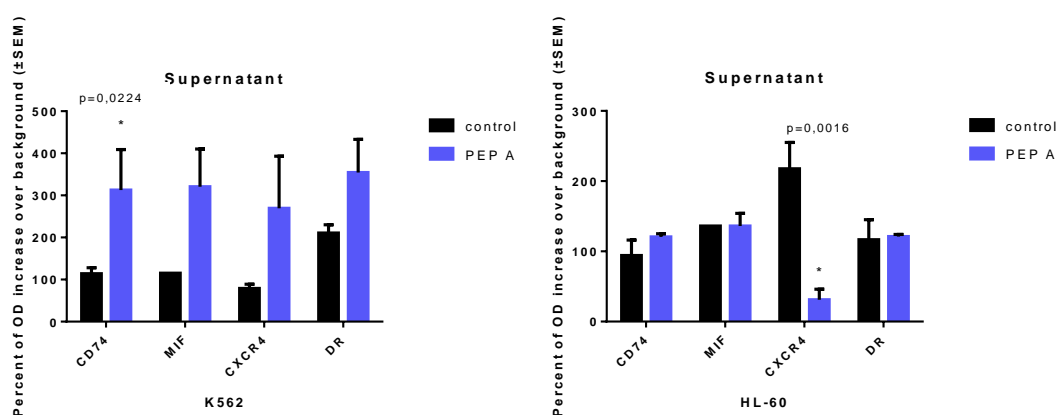
ενδοκυττάρια επίπεδα του CXCR4, που υποδηλώνει τον καταβολισμό του από την καθεψίνη D.



Γράφημα 3: Τα μεμβρανικά και ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης των MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4 στα K562 και στα K562 και HL-60 πριν και μετά την επώαση με 1 $\mu\text{g/ml}$ πεπστατίνης-A, όπως προκύπτουν από τον ανοσοφθορισμό και την επακόλουθη μέτρηση με κυτταρομετρίας ροής. Οι τιμές προκύπτουν από την ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής και το γράφημα σχεδιάστηκε στο Graph Pad Prism 6. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα στατιστικώς σημαντικά επίπεδα, $p=0,04$ για τα μεμβρανικά επίπεδα έκφρασης του CXCR4 μετά την επώαση με 1 $\mu\text{g/ml}$ πεπστατίνης-A σχέση με το control στα K562 και $p=0,0109$ για τα ενδοκυττάρια επίπεδα του DR μετά την επώαση με 1 $\mu\text{g/ml}$ πεπστατίνης-A σχέση με το control στα K562. Οι *p*-value τιμές < 0,05 θεωρήθηκαν σημαντικές.

Στην περίπτωση των K562 ελέγχθηκαν και τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης των MHC II μορίων πριν και μετά την επώαση με πεπστατίνη-A. Η παρεμπόδιση του καταβολισμού του CD74 μέσω της αναστολής της πεπστατίνης-A φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των MHC II στα K562, καταδεικνύοντας ότι μπορούν να μετακινηθούν από το αδρό ER στα MHCs, όταν ο CD74 βρίσκεται στην ενδοκυττάρια μορφή του.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε αν η επώαση με πεπστατίνη-A επηρεάζει τα επίπεδα έκκρισης του MIF και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4 καθώς και των MHC II μορίων στα υπερκείμενα των K562 και HL-60 με ELISA και συνεπάκολουθη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης.



Γράφημα 4: Τα εκκρινόμενα επίπεδα του MIF και των υποδοχέων του καθώς και τα εκκρινόμενα επίπεδα των MHC II στις κυτταρικές σειρές K562 και HL-60, πριν και μετά την επώαση με 1 μg/ml πεπστατίνης-A. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών επαναλήψεων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα στατιστικώς σημαντικά επίπεδα, $p=0,0224$ για τα εκκρινόμενα επίπεδα του CD74 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A σχέση με το control στα K562 και $p=0,0016$ για τα εκκρινόμενα επίπεδα του CXCR4 μετά την επώαση με 1μg/ml πεπστατίνης-A σχέση με το control στα HL-60. Οι p-value τιμές $< 0,05$ θεωρήθηκαν σημαντικές.

Στα υπερκείμενα των K562, παρατηρείται αυξημένη έκκριση τόσο του MIF όσο και των υποδοχέων του, CD74 και CXCR4 μετά την επώαση των κυττάρων με πεπστατίνη-A, καθώς αυξημένα είναι και τα επίπεδα έκκρισης των MHC II μετά την επώαση με πεπστατίνη-A, γεγονός που καταδεικνύει τον καταβολισμό όλων των προαναφερθέντων πρωτεϊνών

από την καθεψίνη D και δικαιολογεί τα μειωμένα επίπεδα έκκρισής τους στα υπερκείμενα των K562 πριν την επώαση με πεπστατίνη-A.

Στον αντίποδα, η αναστολή της καταβολικής δραστηριότητας της καθεψίνης D από την πεπστατίνη-A φαίνεται να μην επηρεάζει τα επίπεδα έκκρισης του MIF, του CD74 και των MHC II μορίων στα υπερκείμενα των HL-60. Επιπλέον, η επώαση με πεπστατίνη-A φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα έκκρισης του CXCR4, πιθανόν αναστέλλοντας τη δράση κάποιου άλλου μορίου, που είναι απαραίτητο στην έκκριση του CXCR4 στα υπερκείμενα των HL-60

Ανακεφαλαιώνοντας, η αναστολή της καθεψίνης D από την πεπστατίνη-A και στις δύο κυτταρικές σειρές αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα του CD74, καταδεικνύοντας το καταβολισμό του από την καθεψίνη D πριν την επώαση με πεπστατίνη-A. Ειδικά στην περίπτωση των K562, παρατηρούνται σημαντικά υψηλά επίπεδα MHC II στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, δείχνοντας ότι η αναστολή του καταβολισμού του CD74 μπορεί να προσδώσει δυναμική αντιγονοπαρουσίασης στα K562 εφόσον ο CD74 μπορεί να επιτελέσει το ρόλο του ως μοριακός συνοδός των MHC II, παραμένοντας στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Το υψηλό ποσοστό έκκρισης του CD74 μετά την επώαση της πεπστατίνης-A στα υπερκείμενα των K562 συνηγορούν και αυτά με τη σειρά τους στην εμπλοκή της καθεψίνης D στον καταβολισμό του.

Τα αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα του CXCR4 στα HL-60, μετά την επώαση με πεπστατίνη-A, καταδεικνύουν την μεσολάβηση της καθεψίνης D στον καταβολισμό του υποδοχέα, αλλά μάλλον με έμμεσο τρόπο λαμβάνοντας υπόψη τα εκκρινόμενα επίπεδα του CXCR4 στα υπερκείμενα των HL-60. Από την άλλη μεριά, τα K562 εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη τη μεμβρανική μορφή του υποδοχέα CXCR4, μετά την επώαση με πεπστατίνη-A, υποδεικνύοντας ότι η καθεψίνη D επιδρά σε κάποιο ενδιάμεσο υπόστρωμα, που στην περίπτωση μη αναστολής του ρυθμίζει αρνητικά την μεμβρανική μεταφορά του. Παρόλα αυτά, η δράση της πεπστατίνης-A κατευθύνει την έκκριση του CXCR4 στα υπερκείμενα των K562 δείχνοντας, ότι η καθεψίνη D πρωτεολύει κάποια πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης του CXCR4.

Τέλος, ο MIF στην περίπτωση των K562 φαίνεται να καταβολίζεται από την καθεψίνη D, σύμφωνα με τα υψηλά επίπεδα έκκρισης του στα υπερκείμενα των κυττάρων μετά την επώαση με πεπστατίνη-A. Αντίθετα, η πεπστατίνη-A δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκκριση του MIF στην περίπτωση των υπερκειμένων των HL-60.

4) Συμπεράσματα

Ένας βασικός μηχανισμός καταστολής της ανοσολογικής επαγρύπνησης από τα λευχαιμικά κύτταρα είναι η απουσία MHC II μορίων στην κυτταρική τους μεμβράνη, παρά την ενδοκυττάρια έκφρασή τους. Ο μηχανισμός με τον οποίο εγκλωβίζονται στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα παραμένει μέχρι και σήμερα υπό διερεύνηση. Η σταθερή αλυσίδα Ii ή CD74 διαδραματίζει διττό ρόλο σε αυτά τα κύτταρα, ως μοριακός συνοδός των MHC II, αλλά και ως υποδοχέας του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων, MIF. Για να επιτελέσει το ρόλο του ως MIF υποδοχέας ο CD74, και την συνεπακόλουθη πυροδότηση της MIF ενδοκυττάριας σηματοδότησης, χρειάζεται τον χημειοκινικό συνυποδοχέα, CXCR4. Πολλές αναφορές συνδέουν την MIF ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω πρόσδεσης στο σύμπλοκο CD74/CXCR4 με την προώθηση του καρκινικού φαινοτύπου. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε, αν ο MIF και οι MIF υποδοχείς επηρεάζουν το ενδοκυτταρικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II μορίων με την υπόθεση ότι ίσως ο MIF να ενέχει ανταγωνιστικό ρόλο ως προς την πρόσδεση στον CD74 με τα MHC II. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι σταθερές λευχαιμικές σειρές, K562 και HL-60 καθώς και τα διαμολυσμένα K562-CITTA-K9. Παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση των K562 τόσο ο MIF όσο και οι υποδοχείς του, CD74 και CXCR4 εκφράζονται κυρίως σε μεμβρανικό επίπεδο. Με την απουσία του CD74 από τα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, τα K562, στερούνται την ικανότητα της αντιγονοπαρουσίασης και φαίνεται μάλλον, να χρησιμοποιούν τη μεμβρανική μορφή του CD74 σε συνδυασμό με τον συνυποδοχέα CXCR4, για την πρόσδεση του MIF και την πυροδότηση της MIF σηματοδότησης. Στον αντίποδα, τα HL-60, διατηρούν κάποια επίπεδα έκφρασης του CD74 στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, γεγονός που τους προσδίδει δυναμική αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II. Παρότι, λοιπόν, σε κλινικό επίπεδο, οι δυο μορφές λευχαιμίας, χρόνια σε βλαστική κρίση και οξεία αντίστοιχα, δεν διαφοροποιούνται, φαίνεται να χρησιμοποιούν με διαφορετικό τρόπο τον CD74, με τα K562, που αντανakλούν στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία σε βλαστική κρίση, να είναι πιο επιθετικά, εφόσον δεν παρουσιάζουν ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης.

Ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης των MHC II είναι ο μεταγραφικός συνενεργοποιητής, CITTA, και η αδυναμία έκφρασης του αντανakλά σε

αδυναμία έκφρασης των MHC II γονιδίων. Επειδή τα K562 δεν εκφράζουν λειτουργικό CIIITA, χρησιμοποιήθηκε η διαμολυσμένη κυτταρική σειρά K562-CIIITA-K9, για να εξακριβωθεί, αν η έκφραση του λειτουργικού CIIITA επηρεάζει την παραμονή του CD74 στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα καθώς και τον τρόπο που επηρεάζει τον συνυποδοχέα CXCR4 και τον MIF. Ο λειτουργικός CIIITA φαίνεται να ρυθμίζει θετικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα του CD74 και να αυξάνει τα επίπεδα ενδοκυττάρωσης του CXCR4, που μπορεί να οδηγήσουν σε πιθανή υποβάθμισή του, δείχνοντας πιθανή εμπλοκή του CXCR4 στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι. Μέσω του λειτουργικού CIIITA, τα K562 αυξάνουν τη δυνατότητα αντιγονοπαρουσίασης μέσω των MHC II και με τους δύο MIF υποδοχείς να βρίσκονται κυρίως στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, ενδεχομένως να τροχοπεδούν την κακοήθη MIF σηματοδότηση.

Τέλος, αναγνωρίζοντας το καίριο ρόλο των πρωτεασών, όπως οι καθεψίνες στην καρκινογένεση ελέγχθηκε η πιθανή εμπλοκή της καταβολικής διεργασίας των καθεψινών, τόσο στον MIF και τους υποδοχείς του, CD74 και CXCR4 όσο και στα MHC II στις δύο λευχαιμικές σειρές μέσω της εφαρμογής ενός αναστολέα ασπαρτυλόπρωτεασών, την πεπστατίνη-A. Στα επωασμένα με πεπστατίνη-A K562 και HL-60 παρατηρήθηκε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων έκφρασης του CD74. Στα K562 η δράση της πεπστατίνης-A φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα της μεμβρανικής μορφής του CXCR4, μάλλον αναστέλλοντας κάποιο υπόστρωμα που υποβοηθά την μεμβρανική του μεταφορά, σε αντίθεση με τα αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα του CXCR4 στα HL-60, που δείχνουν ότι μάλλον η πεπστατίνη-A αναστέλλει κάποιο υπόστρωμα που βοηθά την ενδοκυττάρωση και πιθανή υποβάθμιση του υποδοχέα. Διαφορετική είναι η επίδραση της πεπστατίνης-A και στα επίπεδα έκκρισης των μορίων ενδιαφέροντος, CD74, CXCR4, MIF μα και MHC II που ενδεχομένως να υποδηλώνει το διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης της έκκρισης από τις δυο κυτταρικές σειρές, καταδεικνύοντας ξανά τον διαφορετικό τρόπο που χρησιμοποιούν, αυτά τα μόρια οι δυο μορφές λευχαιμίας. Παρά τη διαφορετική δράση της πεπστατίνης-A στα K562 και τα HL-60, η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του CD74 και των MHC II στην περίπτωση των K562, αντανακλούν στην επίδραση των καθεψινών και στην λευχαιμία και πως η αναστολή τους μπορεί ενδεχομένως να αναστρέψει το λευχαιμικό φαινότυπο μέσω επανάκτησης της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας. Τέλος, αναδεικνύεται, ότι η

αναστολή ης δράσης των καθεψινών μπορεί να είναι η επόμενη σελίδα στην έρευνα για την στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία, με την πεπστατίνη-A να είναι ένας πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας.-

5) Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας, του τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης, με επιβλέπουσα την καθηγήτρια Ειρήνη Αθανασάκη.

Έγινα μέλος του δυναμικού του εργαστηρίου τον Αύγουστο του 2020, πραγματοποιώντας το δεύτερο rotation του μεταπτυχιακού μου, καθώς και την μεταπτυχιακή μου εργασία. Σε αυτό το σημείο, λοιπόν, δράττομαι της ευκαιρίας, να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Αθανασάκη, που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της και με το εργαστήριό της. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για όλη την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την ένθερμη υποστηριξή της κατά τη διάρκεια αυτού του project, καθώς και την κατατοπιστική καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια αυτού του δύσκολου χρόνου.

Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ για την συμβολή της, στην μεταδιδάκτορα του τμήματος, Κατερίνα Μπακέλα. Την ευχαριστώ βαθύτατα για τις χρήσιμες συμβουλές της, την εκπαίδευση στις πειραματικές διαδικασίες και την καθοδήγησή της, που ξεπέρασαν τις υποχρεώσεις μιας μεταδιδάκτορα!

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα Ιωάννα Ζερβα για την βοήθεια στον εγκλιματισμό μου στο εργαστήριό και τη συνεισφορά της στις κντταροκαλλιέργειες.

Ειδική μνεία, στην προπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος, Θεολογία Μορφονιού για την αρωγή της στο κομμάτι των HL-60. Εύχομαι καλές μεταπτυχιακές σπουδές και καλή σταδιοδρομία!

Δεν θα έλειπε το θερμό μου ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την υποψήφια διδάκτορα Τάνια, και τους προπτυχιακούς φοιτητές Δέσποινα, Λαμπρίνα, Ανδρέα, Νεφέλη και Βάσω για την εξαιρετική συνεργασία.

Τέλος, να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μαρία και Φιλάρετο, που όλα αυτά τα χρόνια στηρίζουν τις επιλογές μου και αποτελούν τους πιο ένθερμους υποστηρικτές της προσπάθειάς μου.

Ευχαριστώ τον Παύλο και όλους τους φίλους, που στάθηκαν στο πλευρό μου όλη αυτή τη χρονιά και υπήρξαν ένα διασκεδαστικό διάλειμμα από την καθημερινότητα.

Ξεχωριστό ευχαριστώ στη Luna μου, που η διακριτική ύπαρξή της στη ζωή μου, με έκανε να μην ξεχνάω τα βασικά χαρακτηριστικά του

επιστήμονα, την επιμονή, την εκ φύσεως περιέργεια, την εντιμότητα και την ταπεινότητα.

Αγνή Βιτσιώτη, Ηράκλειο 2021

‘Η ζωή είναι μια κατάσταση ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών.’

Yoshinori Ohsumi, (1945-), Κυτταρικός Βιολόγος

6) Βιβλιογραφία

- Almand, B., et al. (2001). "Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer." **166**(1): 678-689.
- ATHANASSAKIS, I., et al. (1995). "Placental Tissue From Human Miscarriages Expresses Class II HLA-DR Antigens." **34**(5): 281-287.
- Athanassakis, I., et al. (1999). "Analysis of the endocytic pathway upon intracellular transport of IgG molecules through Fc receptors." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 143-154.
- Bach, J. P., et al. (2008). "Role of MIF in inflammation and tumorigenesis." Oncology **75**(3-4): 127-133.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer **4**(7): 540-550.
- Balkwill, F. (2004). "The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4." Seminars in Cancer Biology **14**(3): 171-179.
- Benes, P., et al. (2008). "Cathepsin D--many functions of one aspartic protease." Crit Rev Oncol Hematol **68**(1): 12-28.
- Bernhagen, J., et al. (2007). "MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment." Nat Med **13**(5): 587-596.
- Bifulco, C., et al. (2008). "Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor." Curr Pharm Des **14**(36): 3790-3801.
- Binsky, I., et al. (2007). "IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival." **104**(33): 13408-13413.
- Bloom, B. R. and B. Bennett (1966). "Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity." Science **153**(3731): 80-82.
- Blum, J. S., et al. (2013). "Pathways of antigen processing." Annu Rev Immunol **31**: 443-473.
- Brändén, C.-I. and J. Tooze (1999). Introduction to protein structure. New York, Garland Pub.

- Bucala, R. (1996). "MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response." Faseb j **10**(14): 1607-1613.
- Bucala, R. and I. Shachar (2014). "The integral role of CD74 in antigen presentation, MIF signal transduction, and B cell survival and homeostasis." Mini Rev Med Chem **14**(14): 1132-1138.
- Busch, R., et al. (2005). "Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression." Immunol Rev **207**: 242-260.
- Busillo, J. M. and J. L. Benovic (2007). "Regulation of CXCR4 signaling." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 952-963.
- Calandra, T. and T. Roger (2003). "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity." Nature Reviews Immunology **3**(10): 791-800.
- Castino, R., et al. (2002). "Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas." Int J Cancer **97**(6): 775-779.
- Chabot, D. J., et al. (2000). "N-Linked Glycosylation of CXCR4 Masks Coreceptor Function for CCR5-Dependent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates." **74**(9): 4404-4413.
- Chen, X. and P. E. Jensen (2004). "The expression of HLA-DO (H2-O) in B lymphocytes." Immunol Res **29**(1-3): 19-28.
- Choi, N. M., et al. (2011). "Regulation of major histocompatibility complex class II genes." Current opinion in immunology **23**(1): 81-87.
- Conroy, H., et al. (2010). "Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link." Qjm **103**(11): 831-836.
- Curran, E. K., et al. (2017). "Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma." Trends Immunol **38**(7): 513-525.
- De Kouchkovsky, I. and M. Abdul-Hay (2016). "'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'." Blood Cancer J **6**(7): e441.
- Deininger, M. W., et al. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." Blood **96**(10): 3343-3356.

- Denzin, L. K. and P. Cresswell (1995). "HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading." Cell **82**(1): 155-165.
- Devaiah, B. N. and D. S. Singer (2013). "CIITA and Its Dual Roles in MHC Gene Transcription." Front Immunol **4**: 476.
- Dietlin, T. A., et al. (2007). "Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion." J Leukoc Biol **81**(5): 1205-1212.
- Edwards, D., et al. (2008). The cancer degradome: Proteases and cancer biology.
- Feher, J. (2012). 5.3 - White Blood Cells and Inflammation. Quantitative Human Physiology (Second Edition). J. Feher. Boston, Academic Press: 507-515.
- Feng, Y., et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-877.
- Fortin, J.-S., et al. (2013). "Exposing the Specific Roles of the Invariant Chain Isoforms in Shaping the MHC Class II Peptidome." **4**(443).
- Fujinaga, M., et al. (1995). "Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin." Protein Sci **4**(5): 960-972.
- Goldsby, R. A. and R. A. Goldsby (2003). Immunology. New York, W.H. Freeman.
- Guce, A. I., et al. (2013). "HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism." Nature structural & molecular biology **20**(1): 90-98.
- Guda, M. R., et al. (2019). "Pleiotropic role of macrophage migration inhibitory factor in cancer." American journal of cancer research **9**(12): 2760-2773.
- Guo, Q., et al. (2019). Chapter One - Translation of cancer immunotherapy from the bench to the bedside. Advances in Cancer Research. X.-Y. Wang and P. B. Fisher, Academic Press. **143**: 1-62.
- Hafner, A., et al. (2019). "The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate." Nature Reviews Molecular Cell Biology **20**(4): 199-210.
- Hartenstein, V. (2006). "Blood cells and blood cell development in the animal kingdom." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 677-712.

- Hesselgesser, J., et al. (1998). "Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity." J Immunol **160**(2): 877-883.
- Hoffman, R. and B. K. Marcellino (2020). Bone Marrow Microenvironment in Health and Disease. Encyclopedia of Bone Biology. M. Zaidi. Oxford, Academic Press: 1-11.
- Hofmann, M. W., et al. (1999). "The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains." J Biol Chem **274**(51): 36153-36158.
- Inda, M.-D.-M., et al. (2014). "Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature." Cancers **6**(1): 226-239.
- Jabbour, E. and H. Kantarjian (2018). "Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring." Am J Hematol **93**(3): 442-459.
- Jankauskas, S. S., et al. (2019). "Evolving complexity of MIF signaling." Cellular Signalling **57**: 76-88.
- Joffre, O. P., et al. (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." Nature Reviews Immunology **12**(8): 557-569.
- Jung, H., et al. (2008). "Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity." J Biol Chem **283**(29): 20383-20396.
- Kenderian, S. S., et al. (2015). "CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia." Leukemia **29**(8): 1637-1647.
- Kindt, N., et al. (2016). "Involvement of macrophage migration inhibitory factor in cancer and novel therapeutic targets." Oncol Lett **12**(4): 2247-2253.
- Koch, N., et al. (1982). "Ia invariant chain detected on lymphocyte surfaces by monoclonal antibody." Nature **299**(5884): 644-645.
- Kraemer, S., et al. (2011). "MIF-chemokine receptor interactions in atherogenesis are dependent on an N-loop-based 2-site binding mechanism." Faseb j **25**(3): 894-906.
- Krockenberger, M., et al. (2008). "Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D." J Immunol **180**(11): 7338-7348.

- Kropshofer, H., et al. (1996). "Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM." Embo j **15**(22): 6144-6154.
- Lacy, M., et al. (2018). "Identification of an Arg-Leu-Arg tripeptide that contributes to the binding interface between the cytokine MIF and the chemokine receptor CXCR4." Scientific Reports **8**(1): 5171.
- Landsverk, O. J., et al. (2009). "MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain." Scand J Immunol **70**(3): 184-193.
- Leng, L., et al. (2003). "MIF signal transduction initiated by binding to CD74." The Journal of experimental medicine **197**(11): 1467-1476.
- Lich, J. D. and J. P. Y. Ting (2007). "CATERPILLER (NLR) family members as positive and negative regulators of inflammatory responses." Proceedings of the American Thoracic Society **4**(3): 263-266.
- Liljedahl, M., et al. (1996). "HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport." Embo j **15**(18): 4817-4824.
- Lindstedt, R., et al. (1995). "The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif." Immunity **3**(5): 561-572.
- Lu, T., et al. (2011). "Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice." J Clin Invest **121**(10): 4015-4029.
- Lue, H., et al. (2007). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity." Oncogene **26**(35): 5046-5059.
- Marciniszyn, J., et al. (1976). "Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin." Journal of Biological Chemistry **251**(22): 7088-7094.
- Marks, M. S., et al. (1990). "Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens." J Cell Biol **111**(3): 839-855.
- Marks, M. S., et al. (1995). "A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments." J Cell Biol **131**(2): 351-369.
- Matsunaga, J., et al. (1999). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF)--its role in catecholamine metabolism." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **45**(7): 1035-1040.

- Maynadier, M., et al. (2013). "Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of Cathepsin D inhibitors: a potential target for cancer therapy." J Control Release **171**(2): 251-257.
- Mawhinney, L., et al. (2015). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enzymatic activity and lung cancer." Mol Med **20**(1): 729-735.
- Meyer-Siegler, K. L., et al. (2007). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence." Genes & Immunity **8**(8): 646-652.
- Mirella, G., et al. (2016). "Expression of MIF and CD74 in leukemic cell lines: correlation to DR expression destiny." Biological Chemistry **397**(6): 519-528.
- Miyazaki, T., et al. (1996). "Mice Lacking H2-M Complexes, Enigmatic Elements of the MHC Class II Peptide-Loading Pathway." Cell **84**(4): 531-541.
- Moriuchi, M., et al. (1999). "USF/c-Myc Enhances, While Yin-Yang 1 Suppresses, the Promoter Activity of CXCR4, a Coreceptor for HIV-1 Entry." **162**(10): 5986-5992.
- Moriuchi, M., et al. (1997). "Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry." J Immunol **159**(9): 4322-4329.
- Morris, P., et al. (1994). "An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules." Nature **368**(6471): 551-554.
- Murphy, P. M., et al. (2000). "International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors." **52**(1): 145-176.
- Nagaraj, S., et al. (2010). "Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells." J Immunol **184**(6): 3106-3116.
- Nakagawa, T., et al. (1998). "Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus." Science **280**(5362): 450-453.
- Neefjes, J., et al. (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-836.
- Nobre, C. C., et al. (2017). "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer." Pathol Oncol Res **23**(2): 235-244.
- Pantouris, G., et al. (2015). "An Analysis of MIF Structural Features that Control Functional Activation of CD74." Chem Biol **22**(9): 1197-1205.

- Papadimitriou, L., et al. (2008). "Characterization of intracellular HLA-DR, DM and DO profile in K562 and HL-60 leukemic cells." Molecular Immunology **45**(15): 3965-3973.
- Papadimitriou, L., et al. (2013). "DO α - β ⁺ expression in favor of HLA-DR engagement in exosomes." Immunobiology **218**(8): 1019-1025.
- Pierre, P., et al. (2000). "Invariant chain controls H2-M proteolysis in mouse splenocytes and dendritic cells." The Journal of experimental medicine **191**(6): 1057-1062.
- Porter, G. W., et al. (2011). "TLR agonists downregulate H2-O in CD8 α - dendritic cells." J Immunol **187**(8): 4151-4160.
- Rajasekaran, D., et al. (2016). "Macrophage Migration Inhibitory Factor-CXCR4 Receptor Interactions: EVIDENCE FOR PARTIAL ALLOSTERIC AGONISM IN COMPARISON WITH CXCL12 CHEMOKINE." J Biol Chem **291**(30): 15881-15895.
- Rakash, S. (2012). "Role of proteases in cancer: A review." Biotechnology and Molecular Biology Reviews **7**: 90-101.
- Ranella, A., et al. (2005). "Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells." Hum Immunol **66**(1): 43-55.
- Riberdy, J. M., et al. (1992). "HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides." Nature **360**(6403): 474-477.
- Riese, R. J., et al. (1996). "Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II-Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading." Immunity **4**(4): 357-366.
- Roche, P. A. and P. Cresswell (1990). "Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding." Nature **345**(6276): 615-618.
- Roche, P. A., et al. (1993). "Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(18): 8581-8585.
- Rodriguez, G. M. and S. Dimen (1995). "Destructive proteolysis by cysteine proteases in antigen presentation of ovalbumin." **25**(7): 1823-1827.

Röhn, T. A., et al. (2004). "Upregulation of the CLIP self peptide on mature dendritic cells antagonizes T helper type 1 polarization." Nat Immunol **5**(9): 909-918.

Rosado Jde, D. and M. Rodriguez-Sosa (2011). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections." Int J Biol Sci **7**(9): 1239-1256.

Rosengren, E., et al. (1996). "The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction." Mol Med **2**(1): 143-149.

Saultz, J. N. and R. Garzon (2016). "Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review." J Clin Med **5**(3).

Schröder, B. (2016). "The multifaceted roles of the invariant chain CD74-More than just a chaperone." Biochim Biophys Acta **1863**(6 Pt A): 1269-1281.

Schwartz, V., et al. (2009). "A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4." FEBS Letters **583**(17): 2749-2757.

Shen, Y. C., et al. (2012). "The cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) acts as a neurotrophin in the developing inner ear of the zebrafish, *Danio rerio*." Dev Biol **363**(1): 84-94.

Shi, X., et al. (2006). "CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex." Immunity **25**(4): 595-606.

Sillaber, C., et al. (2003). "Chronic myeloid leukemia: pathophysiology, diagnostic parameters, and current treatment concepts." Wien Klin Wochenschr **115**(13-14): 485-504.

Simpson, K. D., et al. (2012). "Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment." J Immunol **189**(12): 5533-5540.

Sloan, V. S., et al. (1995). "Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR." Nature **375**(6534): 802-806.

Steimle, V., et al. (1994). "Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA." Science **265**(5168): 106-109.

Szymańska, K. and S. Park (2019). Chronic Myelogenous Leukemia: Pathology, Genetics, Diagnosis, and Treatment. Encyclopedia of Cancer

(Third Edition). P. Boffetta and P. Hainaut. Oxford, Academic Press: 418-424.

Tillmann, S., et al. (2013). "Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis." *4*(115).

Ting, J. P. and J. Trowsdale (2002). "Genetic control of MHC class II expression." *Cell* **109** **Suppl**: S21-33.

Tong, X., et al. (2015). "Macrophage migration inhibitory factor -173G/C gene polymorphism increases the risk of renal disease: a meta-analysis." *Nephrology (Carlton)* **20**(2): 68-76.

Umezawa, H., et al. (1970). "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes." *J Antibiot (Tokyo)* **23**(5): 259-262.

van Luijn, M. M., et al. (2009). "Impaired antigen presentation in neoplasia: basic mechanisms and implications for acute myeloid leukemia." *Immunotherapy* **2**(1): 85-97.

Wegner, S. A., et al. (1998). "Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1." *J Biol Chem* **273**(8): 4754-4760.

Wu, S. P., et al. (2006). "Macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms and the clinical expression of scleroderma." *Arthritis Rheum* **54**(11): 3661-3669.

Wu, X., et al. (2009). "Regulating the Activity of Class II Transactivator by Posttranslational Modifications: Exploring the Possibilities." **29**(21): 5639-5644.

Yaddanapudi, K., et al. (2013). "Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor." *J Immunol* **190**(6): 2984-2993.

Yoon, T., et al. (2012). "Mapping the HLA-DO/HLA-DM complex by FRET and mutagenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(28): 11276.

Youn, J. I., et al. (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* **181**(8): 5791-5802.

Zhang, T., et al. (2000). "Pepstatin A-Sensitive Aspartic Proteases in Lysosome Are Involved in Degradation of the Invariant Chain and Antigen-Processing in Antigen Presenting Cells of Mice Infected with *Leishmania major*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**(2): 693-701.

Zhang, X., et al. (2013). "Macrophage migration inhibitory factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem/precursor cells through Wnt/ β -catenin signal pathway." Int J Biol Sci **9**(10): 1108-1120.

Zlotnik, A. (2006). "Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis." Contrib Microbiol **13**: 191-199.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

Ιστοσελίδες

<https://www.cancer.gov>

<https://www.slideshare.net/sreerajsree/major-histocomatibility>

<https://www.ask4biology.com/major-histocompatibility-complex-mhc/>

<https://www.leukemia-cell.org/atlas>

<https://www.atcc.org/products/ccl-243>

<https://www.atcc.org/products/ccl-240>

<https://www.rcsb.org/3d-view/1PSO/1>

<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>

[https://smhs.gwu.edu/flow-cytometry/sites/flow-cytometry/files/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec\(1\).pdf](https://smhs.gwu.edu/flow-cytometry/sites/flow-cytometry/files/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec(1).pdf)

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01101594