



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής



Μ.Π.Σ. “Κυτταρικής κ Γενετικής Αιτιολογίας, Διαγνωστικής κ Θεραπευτικής των
Ασθενειών του Ανθρώπου”

Μεταπτυχιακή διατριβή

Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού CD40 στον θάνατο
καρκινικών κυττάρων

Επιβλέπων: Δρ. Αριστείδης Ηλιόπουλος

Εξεταστής: Δρ. Γεώργιος Σουρβίνος

Ανδρέας Ζαραγκούλιας

Ηράκλειο 2008-2009

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Ηλιόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστούμε, αλλά και για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξή του σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Annelies για το χρόνο που αφιέρωσε και την ιδιαίτερη προσπάθειά της για τη σωστή καθοδήγησή μου σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Ομολογώ ότι μου δίδαξε αρκετά πράγματα, από τα οποία χαρακτηριστικά ήταν η οργάνωση και η πειθαρχία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου (Λίνα, Σοφία, Κατερίνα, Δήμητρα, Μαρία, Άρη) για οποιαδήποτε βοήθειά τους, αλλά και για την ευχάριστη παρέα τους και φυσικά τον “Dimis” για τις ατελείωτες «ώρες παιδιού» που μοιραστήκαμε. Τέλος, ευχαριστώ τα «παιδιά της πτέρυγας» από τα εργαστήρια των Δρ. Καρδάση, Δρ. Στουρνάρα και Δρ. Παπακωνσταντή για την άψογη συνεργασία τους. Φυσικά δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες οικογένεια και φίλους που με στηρίζουν διαρκώς, ο καθένας με το δικό του τρόπο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας CD40 αποτελεί μέλος της TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) υπερ-οικογένειας και εκφράζεται σε πλήθος καρκίνων όπως λευχαιμίες, λεμφώματα και καρκινώματα. Διάφορες μέχρι τώρα πειραματικές και κλινικές μελέτες προτείνουν ότι το CD40 σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να αξιοποιηθεί για τη θεραπεία κατά του καρκίνου. Στα πλαίσια αυτά λοιπόν, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χρήση λιποσωμάτων ως μέσο μεταφοράς του CD40L γονιδίου σε καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα δεν ήταν επιτυχημένα, αλλά αυτό δε σημαίνει ότι η χρήση λιποσωμάτων ως μέσο μεταφοράς αποτελεί λάθος στρατηγική. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της καταστολής του αντι-αποπτωτικού μορίου Akt στον κυτταρικό θάνατο, δείχνοντας ότι κάτι τέτοιο ίσως θα μπορούσε να συνδυαστεί με τον CD40L στα πλαίσια κάποιας αντικαρκινικής συνδυαστικής θεραπείας. Ακόμη, εξετάστηκε η άμεση αντικαρκινική δράση τόσο του μεμβρανικού CD40L όσο και του εκκρινόμενου τριμερούς stCD40L και τα αποτελέσματα άφησαν υποσχέσεις καθώς υπήρχε ένα πλεονέκτημα του εκκρινόμενου stCD40L, όπου δε δρα μόνο σε γειτονικά κύτταρα όπως ο μεμβρανικός CD40L, αλλά μπορεί να δράσει πολλαπλώς σε όλο το μικροπεριβάλλον του όγκου. Τέλος, μελετήθηκε η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων μετά από μόλυνσή τους με αδενοϊό που εξέφραζε τον CD40L, καθώς τα DCs θα μπορούσαν να έχουν άμεση αντικαρκινική δράση μέσω του CD40L, αλλά και έμμεση δράση μέσω της επαγωγής ανοσολογικών αντικαρκινικών αποκρίσεων. Όλα τα παραπάνω θέτουν απλώς τις βάσεις για περαιτέρω *in vitro* και κυρίως *in vivo* πειράματα, που θα διευκρινίσουν καλύτερα το ρόλο του CD40 σηματοδοτικού μονοπατιού στη θεραπεία κατά του καρκίνου.

SUMMARY

CD40 is a member of tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily that is expressed in a variety of cancers such as leukaemias, lymphomas and carcinomas. Different experimental and clinical studies till day suggest that CD40 pathway can be useful in cancer therapy. At this point, in the present work we studied the liposome delivery of CD40L gene in carcinoma cells. The results was not successful, but this doesn't mean that liposomes as a delivery system is a bad strategy. Secondly, we evaluated the effect of Akt knock-down in cell survival of carcinoma cells and we saw that maybe in the future we could use the Akt knock-down together with CD40L as a combinatorial therapeutic approach. Moreover, we examined in vitro the direct anti-tumor effect of transmembrane CD40L and of secreted trimeric CD40L, and the results were promising because there was an advantage of secreted trimeric CD40L, as it doesn't interact only nearby with some cells, but also it can interact with many cells in the whole tumor microenvironment. Finally, we evaluated the DC maturation following adenovirus transduction with CD40L, as DCs could have direct anti-tumor effect by CD40L, and also indirect immune-mediated anti-tumor effect. In conclusion, all the above studies just put some first bases for farther in vitro and mostly in vivo experiments, that will elucidate the CD40 pathway role in cancer treatment.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 CD40 υποδοχέας.....	5
1.2 CD40L/CD154 προσδέτης.....	6
1.3 CD40 σηματοδότηση.....	7
1.4 Βιολογικές λειτουργίες της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L.....	8
1.5 Το CD40 μονοπάτι στη θεραπεία του καρκίνου.....	10
1.6 Στόχοι της εργασίας.....	14
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες.....	15
2.2 Μέτρηση κυτταρικής επιβίωσης (MTT assay)	17
2.3 Κυτταρομετρία ροής (FACS)	18
2.4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου.....	18
2.5 Τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών.....	19
2.6 Παρασκευή δενδριτικών κυττάρων (DC preparation)	21
2.7 Πολλαπλασιασμός, καθαρισμός και τιτλοποίηση των ανασυνδυασμένων αδenoϊών....	21
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.1 Αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης hCD40L μετά από χρήση λιποσωμάτων.....	24
3.2 Μελέτη της επίδρασης της καταστολής (knock-down) του αντι-αποπτωτικού σηματοδοτικού μορίου Akt, με χρήση Akt antisense in-vitro.....	27
3.3 Μελέτη της άμεσης επίδρασης των mCD40L και stmCD40L σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά στον κυτταρικό θάνατο in vitro.....	28
3.4 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DC maturation).....	30
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 CD40 υποδοχέας

1.1.1 Γενικά

Ο CD40 αποτελεί μέλος της TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) υπερ-οικογένειας και είναι ένας γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας με τέσσερις TNFR – Cys επαναλήψεις, αλλά χωρίς DD (death domain) όπως έχουν άλλοι TNF υποδοχείς. Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές, ως τύπου I μεμβρανική πρωτεΐνη και ως εκκρινόμενη. Η πρωτεΐνη CD40 υπάρχει ως μονομερές των 48KDa ή ως ομοδιμερές. Ο CD40 συμμετέχει στη σηματοδότηση με τη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών συναρμογής της TRAF (TNF receptor-associated factor) οικογένειας, όπως TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, και TRAF6¹.

1.1.2 Έκφραση

Ο υποδοχέας ανακαλύφθηκε αρχικά το 1986 ως ένας μάρτυρας επιφανείας των Β λεμφοκυττάρων, που προκαλεί κυτταρικό πολλαπλασιασμό των Β ενεργοποιημένων κυττάρων². Ωστόσο, ο CD40 δεν εκφράζεται στα Β κύτταρα, αλλά εκφράζεται στα μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, νευρικά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα του θύμου. Επιπλέον, χαμηλή έκφραση του CD40 εντοπίζεται στη βασική πλευρά του ανθρώπινου πλακώδους πολύστιβου επιθηλίου, και του φυσιολογικού ωθηθικού και μαστικού επιθηλιακού ιστού. Εκτός από το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης, ο CD40 εκφράζεται επίσης και σε κακοήθεις ιστούς. Έτσι, ο CD40 εμφανίζεται σε πλήθος αιματολογικών κακοηθειών, όπως σε non-Hodgkin's και Hodgkin's λεμφώματα, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL), πολλαπλό μύελωμα και οξεία μυελογενής λευχαιμία (AML). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα CD40 εκφράζονται σε καρκινώματα του ρινοφάρυγγα, ουροδόχου κύστεως, τραχήλου της μήτρας και ωθήκης. Επίσης, κάποιες μελέτες έδειξαν έκφραση του CD40 σε μελανώματα και σαρκώματα μαλακού ιστού³.

1.1.3 Απουσία CD40

Η απουσία της έκφρασης του CD40 μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές καταστάσεις. Οι CD40 μεταλλαγές είναι υπεύθυνες για μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, που

ονομάζεται HIGM3 (hyper-IgM immunodeficiency type 3)⁴. Αυτή η διαταραχή χαρακτηρίζεται από ανικανότητα των B κυττάρων να υποβληθούν σε αλλαγή ισοτύπου και να προκαλέσουν μια ειδική ανοσολογική απόκριση, καθώς επίσης κι από ανικανότητα διαμόρφωσης του βλαστικού κέντρου.

1.2 CD40L/CD154 προσδέτης

1.2.1 Γενικά

Ο CD40L αποτελεί μέλος της TNF υπερ-οικογένειας και εμφανίζεται σε δύο μορφές, ως τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη και ως διαλυτή εκκρινόμενη πρωτεΐνη. Η διαλυτή μορφή προέρχεται μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της διαμεμβρανικής μορφής¹. Ο CD40L σχηματίζει ομοτριμερές και έτσι διαβιβάζει το σήμα. Ο τριμερής CD40L προκαλεί τον τριμερισμό του διαμεμβρανικού CD40 υποδοχέα, ως μέρος του σηματοδοτικού καταρράκτη που προκαλεί η αλληλεπίδραση CD40/CD40L⁵.

1.2.2 Έκφραση

Ο CD40L εκφράζεται σε ενεργοποιημένα, αλλά όχι σε ανενεργά T λεμφοκύτταρα και περιορίζεται κυρίως στα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Επίσης, ο CD40L συναντάται στην επιφάνεια μιας μικρής μερίδας CD8⁺ T κυττάρων. Ωστόσο, ο CD40L δεν εντοπίζεται μόνο στα T λεμφοκύτταρα, αλλά και στα B λεμφοκύτταρα και B κυτταρικές σειρές, καθώς και σε πρωτογενή ιστιοκύτταρα και στις ανάλογες κυτταρικές σειρές, σε βασεόφιλα και ηωσινόφιλα, NK κύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια^{1,6}. Επίσης, τα αιμοπετάλια εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες CD40L και αποτελούν την κύρια πηγή διαλυτού CD40L στην κυκλοφορία⁷.

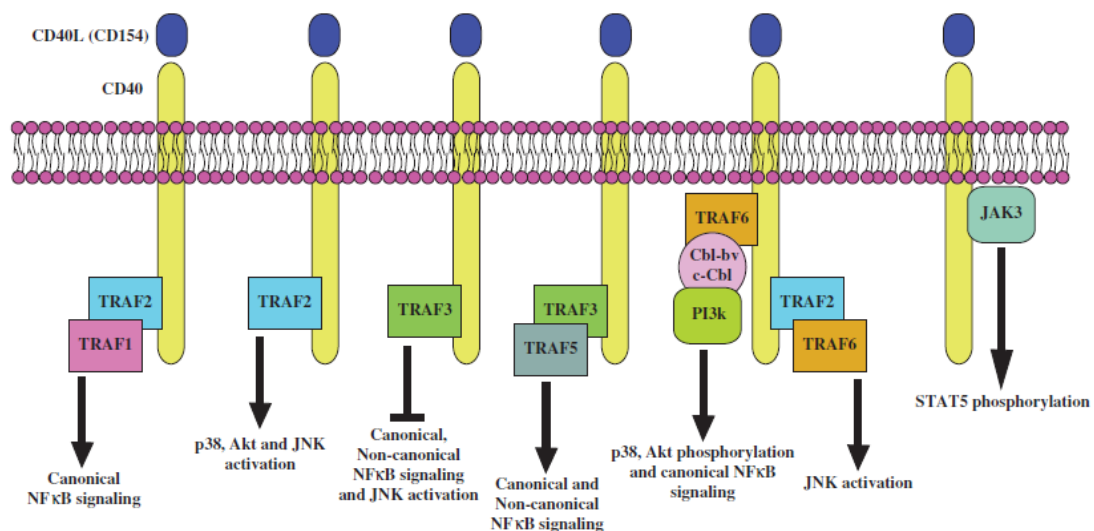
1.2.3 Απουσία CD40L/CD154

Η απουσία της έκφρασης του CD40L είναι η αιτία ενός X-συνδεδεμένου συνδρόμου ανοσοανεπάρκειας, που ονομάζεται HIGM1 (Hyper IGM type 1) σύνδρομο ή XHIM. Οι ασθενείς με HIGM1 σύνδρομο έχουν ανωμαλίες στο CD40L γονίδιο που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα X. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από ελαττωματική ισοτυπική αλλαγή ανοσοσφαιρίνης, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα IgM στον ορό, και στην έλλειψη όλων των άλλων ισοτύπων. Η διαταραχή συνήθως εμφανίζεται κατά τη νηπιακή ηλικία με

υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Οι ασθενείς είναι επιρρεπείς σε ευκαιριακές λοιμώξεις, όπως *Pneumocystis jirovecii* πνευμονία και έντονη διάρροια εξαιτίας *Cryptosporidium parvum* λοίμωξης. Συνηθισμένες είναι επίσης και αιματολογικές διαταραχές, όπως ουδετεροπενία, θρομβοκυτταροπενία και αναιμία⁸. Παρά την αντικατάσταση των ανοσοσφαιρινών ενδοφλεβίως, το προσδόκιμο ζωής είναι σύντομο με μια συχνότητα θανάτου περίπου στο 10% πριν την ενηλικίωση. Η μέση επιβίωση των ασθενών που δεν έχουν υποστεί αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών είναι λιγότερη από 25 χρόνια⁹.

1.3 CD40 σηματοδότηση

Οι φυσιολογικές επιπτώσεις της CD40 σηματοδότησης είναι πολύπλευρες, αλλά και βιολογικά αντιτιθέμενες, καθώς εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων που εκφράζουν CD40 και από το μικροπεριβάλλον στο οποίο παρέχεται το σήμα. Για παράδειγμα, η CD40-CD40L αλληλεπίδραση επάγει ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων, αλλά προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Όπως και σε κάποια άλλα μέλη της οικογένειας των TNF υποδοχέων, έτσι και η CD40 σηματοδότηση διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό μέσω μίας πολύπλοκης σειράς καθοδικών μορίων προσαρμογέων, παρά μέσω έμφυτων κινάσων ή ενεργότητας μεταγωγής σήματος της CD40 κυτταροπλασματικής



Survival, maturation, proliferation, production of inflammatory cytokines, expression of costimulatory molecules, development of GC B cells, immunoglobulin isotype switching, somatic hypermutation of the immunoglobulin and formation of long-lived plasma cells and memory B cells.

Εικόνα 1.1: CD40 σηματοδότηση.

ουράς. Σαν συνέπεια της CD40 σηματοδότησης, ενεργοποιείται ένας αριθμός καλά χαρακτηρισμένων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων του NF-κB, p38MAPK, JNK, Jak3, μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής, και των PI3K μονοπατιών¹⁰ (Εικόνα 1.1). Ακολούθως, αυτά τα μονοπάτια ρυθμίζουν μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης, που είναι από μόνες τους εκτεταμένες, δυναμικές και ποικίλες. Είναι γνωστό ότι ο CD40 συνεργάζεται με, και κάποιες φορές απαιτεί, άλλα εξωκυττάρια σήματα, τα οποία είτε επάγουν την επικάλυψη καθοδικών μονοπατιών, είτε ενσωματώνουν άλλα. Έχουν γίνει προσπάθειες χαρακτηρισμού της γενικότερης ενοποίησης και ρύθμισης της CD40 σηματοδότησης και γονιδιακής έκφρασης¹⁰. Ωστόσο, παραμένει ανολοκλήρωτη η πλήρης εκτίμηση του CD40 κυκλώματος, στο επίπεδο των βιολογικών συστημάτων. Έτσι χρειάζονται μελέτες κυρίως σε πρωτογενή κύτταρα παρά σε Β λεμφοκύτταρα, σε πρωτογενή κακοήθη κύτταρα παρά σε μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές, και σε ζωικά μοντέλα.

1.4 Βιολογικές λειτουργίες της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L

1.4.1 Χυμική ανοσία

Κατά την έναρξη μίας θυμο-εξαρτώμενης χυμικής ανοσολογικής απόκρισης, απαιτείται η CD40 σηματοδότηση από τα Β κύτταρα για την παραγωγή υψηλού τίτλου ειδικού αντισώματος και για την ανάπτυξη χυμικής ανοσολογικής μνήμης. Η πρόσδεση του CD40 που εκφράζεται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων από αντιγόνο Β κυττάρων, από το CD40L που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα CD4⁺ Τ κύτταρα, είναι χρήσιμη για την έναρξη και την εξέλιξη μιας θυμο-εξαρτώμενης χυμικής ανοσολογικής απόκρισης. In vitro, η πρόσδεση του CD40 προκαλεί διακυτταρική προσκόλληση των Β κυττάρων, διαρκή πολλαπλασιασμό, επέκταση, διαφοροποίηση και αλλαγή ισοτύπου αντισώματος^{2,11-13}. In vivo, η πρόσδεση του CD40 απαιτείται για τη διαμόρφωση και εξέλιξη βλαστικού κέντρου, καθώς επίσης για την αλλαγή ισοτύπου και ωρίμανση της ειδικότητας του αντισώματος, διαδικασιών που είναι χρήσιμες για την παραγωγή Β κυττάρων μνήμης και πλασματοκυττάρων μακράς διάρκειας ζωής¹⁴⁻¹⁶. Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L μέσω της χρήσης αντισωμάτων παρεμπόδισης ή η γενετική αφαίρεση του CD40L ή του CD40 καταργούν ολοκληρωτικά την θυμο-εξαρτώμενη χυμική ανοσία¹¹.

1.4.2 Κυτταρική ανοσία

Ενώ αρχικά πιστεύονταν ότι ο ρόλος της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L είναι σημαντικός μόνο στη ρύθμιση της θυμο-εξαρτώμενης ανοσίας, τελικά διαπιστώθηκε ότι είναι εξίσου σημαντικός και στην ανάπτυξη της κυτταρικής ανοσίας. Υπάρχουν αδιαμφισβήτητες μαρτυρίες που δείχνουν ότι η ανάπτυξη κάποιων κυτταρικών ανοσολογικών αποκρίσεων απαιτούν την αλληλεπίδραση CD40/CD40L¹⁷. Αυτό αποδεικνύεται κυρίως από το ρόλο του ζεύγους προσδέτη-υποδοχέα στην ανάπτυξη κυτταροτοξικών Τ κυττάρων έναντι όγκων, ιών και ξένων αντιγόνων^{18,19}, και το ρόλο του στην ανάπτυξη μιας σειράς Τ κυτταρο-εξαρτώμενων αυτοάνοσων νοσημάτων²⁰.

1.4.3 Απόπτωση και πολλαπλασιασμός

Ο CD40 μπορεί να επηρεάσει τόσο τα προ-αποπτωτικά όσο και τα αντι-αποπτωτικά γονίδια που εμπλέκονται είτε στο ενδογενές είτε στο εξωγενές μονοπάτι²¹. Στα φυσιολογικά και κάποια κακοήγη Β κύτταρα, η πρόσδεση του CD40 προκαλεί τη ραγδαία διάσωση των κυττάρων από την απόπτωση, ένα φαινόμενο στο οποίο παρατηρείται αυξανόμενη έκφραση των bcl-xL, A20, και Bfl-1, καθένα από τα οποία βρίσκεται καθοδικά της ενεργοποίησης του NFκB από τον CD40²²⁻²⁵. Η έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης survivin επίσης επάγεται από τον CD40 σε κάποια κύτταρα²⁶. Αντιθέτως, ο CD40 μπορεί να επάγει την απόπτωση σε μαστικά καρκινικά κύτταρα μέσω αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης Bax και σε άλλα κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με μέλη της οικογένειας TNF²⁷⁻³¹. Επίσης, τα γονίδια στόχοι του CD40 ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κάποια κύτταρα, και τουλάχιστον στα Β κύτταρα, φαίνεται να το κάνουν μέσω ρύθμισης της επιβίωσης³². Για παράδειγμα, η CD40 σηματοδότηση στα Β κύτταρα αυξάνει την έκφραση και ενεργοποίηση της CDK4 και CDK6 και μειώνει την έκφραση του αναστολέα της CDK, p27Kip-1^{33,34}. Άλλα σημαντικά γονιδιακά παράγωγα που επηρεάζονται από τη CD40 σηματοδότηση είναι τα Pim-1, c-Myc, Fas και telomerase³⁵⁻³⁸ και αυτό γίνεται συνήθως σε συνεργασία με δεύτερα σήματα όπως η πρόσδεση αντιγόνου-υποδοχέα στα Β κύτταρα.

1.5 Το CD40 μονοπάτι στη θεραπεία του καρκίνου

1.5.1 Γενικά

Η πρώτη συσχέτιση του CD40L/CD154 με ανθρώπινη ασθένεια ήταν πριν ακόμη την ανακάλυψη του προσδέτη, όταν ο CD40 ανακαλύφθηκε ως αντιγόνο σε καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως, παράλληλα με την ταυτοποίησή του ως υποδοχέα των B κυττάρων³⁹⁻⁴¹. Συγκεκριμένα, η ικανότητα του CD40L να προάγει ή να εμποδίζει την απόπτωση ανέπτυξε έντονα το ενδιαφέρον για τη χρήση αυτού του μορίου ως θεραπευτικού στόχου. Έτσι, αναπτύχθηκαν δυο στρατηγικές: μια που στοχεύει στην αναστολή της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L, ώστε να περιορίσει τη μιτογόνο δράση του CD40L σε λεμφώματα και άλλα καρκινικά κύτταρα, και μια δεύτερη προσέγγιση που εφαρμόζει είτε την εξωγενή παροχή του CD40L, είτε επάγει την ενδογενή έκφρασή του, ώστε να προκαλέσει άμεσο κυτταρικό θάνατο ή να αυξήσει την ευαισθησία σε απόπτωση μέσω CD95⁴². Τέλος, το μεγάλο εύρος έκφρασης του CD40 σε φυσιολογικά υγιή κύτταρα εξηγεί την εκτεταμένη έκφρασή του σε μια ποικιλία καρκινικών όγκων. Έτσι, αναφορές έχουν δείξει ότι ο CD40 εκφράζεται σε μια πληθώρα καρκίνων, τόσο στον ποντικό όσο και στον άνθρωπο⁴³⁻⁴⁸, όπου έχουν αναφερθεί αναλυτικότερα παραπάνω στην παράγραφο 1.1.2.

1.5.2 Άμεση αντι-ογκογόνος δράση των CD40/CD40L

Όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά B κύτταρα, έτσι και σε κάποια κακοήγη B κύτταρα, η πρόσδεση του CD40 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών παραγόντων όπως Bcl-XL, A20, Bfl-1, survivin και cFLIP. Αυτοί οι παράγοντες προστατεύουν το κύτταρο από απόπτωση, η οποία επάγεται από αποπτωτικούς παράγοντες όπως αφαίρεση ορού, IgM, anti-Fas, TRAIL ή DNA-damaging παράγοντες^{22-25,49}. Έχει προταθεί ότι η σταθερή χαμηλή δέσμευση του CD40 μπορεί να διευκολύνει την καρκινική κυτταρική αύξηση. Μελέτες σε κύτταρα από non-Hodgkin's λεμφώματα, Burkitt's λεμφώματα και CLL έχουν δείξει ότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του CD40L και παρατείνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω ενός αυτοκρινούς μονοπατιού. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του CD40L προστατεύουν αυτά τα κύτταρα από απόπτωση⁵⁰⁻⁵². Πρόσφατα, CD40-θετικές βιοψίες από ανθρώπινο καρκίνο του μαστού έδειξαν να συν-εκφράζουν CD40L και ότι αυτό είχε ογκογόνο δράση *in vitro*⁴⁰. Επιπλέον, η παράλληλη έκφραση του CD40 και του προσδέτη του, σε αθανατοποιημένα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού, της κινητικότητας και της μεταστατικότητας⁴⁰. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το νεόπλασμα χρησιμοποιεί

το CD40/CD40L μονοπάτι ανεξάρτητα από το ανοσοποιητικό σύστημα, έτσι ώστε να διατηρήσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης. Επιπλέον, μέσω της έκφρασης του ζεύγους υποδοχέα/προσδέτη, οι όγκοι είναι ικανοί να χειρίζονται τα T κύτταρα και τα APCs, έτσι ώστε να συνεισφέρουν στη δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

Αντίθετα, η παροδική ενεργοποίηση του CD40 σε καρκινώματα και κάποιες κακοήθειες B κυττάρων οδηγεί σε άμεση αναστολή του πολλαπλασιασμού και απόπτωση. Τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, η θεραπεία των Burkitt's λεμφώματος, πρωτοπαθούς μεγάλου βαθμού B λεμφώματος και κυττάρων πολλαπλού μυελώματος, με CD40L οδηγεί στη μείωση του πολλαπλασιασμού αυτών των καρκινικών κυττάρων^{53,54}. Η διέγερση του CD40 επάγει σε κύτταρα καρκινώματος την απόπτωση μέσω αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης Bax και διαμεμβρανικών κυτταροτοξικών προσδετών της οικογένειας TNF, όπως FasL, TNF, και TRAIL^{27,30}. Η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου από τον CD40L φαίνεται να συμβαίνει ακόμα και όταν μπλοκάρεται η πρωτεϊνσύνθεση, υποδηλώνοντας ότι η παραγωγή αντι-αποπτωτικών παραγόντων μπορεί να υπερिσχύσει της επαγωγής κυτταρικού θανάτου που σηματοδοτείται από τον CD40L^{55,56}. Η διέγερση του CD40L *in vitro*, σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως και ωθηκής, οδηγεί σε αναστολή της αύξησης και σε αυξημένη ευαισθησία στην απόπτωση, που επάγονται από αντι-νεοπλασματικά φάρμακα, TNF-α, Fas, και ceramide⁵⁶. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και σε *in vivo* συστήματα, όπου ο CD40L, μόνος του ή σε συνδιασμό με χημειοθεραπεία, μπορούσε να αναστείλει σημαντικά την αύξηση μεταφτευμένων όγκων μαστού ή ωθηκής και να προσφέρει γενικότερη επιβίωση. Έτσι, η ενεργοποίηση του CD40L μπορεί να έχει μια άμεση αντι-ογκογόνο δράση σε αρκετούς όγκους, ακόμη και απουσία πρόσθετων ανοσολογικών αποκρίσεων και κυττάρων. Έχει μελετηθεί η άμεση κυτταροτοξική δράση του CD40L σε όγκους που εκφράζουν CD40, χρησιμοποιώντας ανοσο-κατασταλμένα ποντίκια, όπου παρατηρήθηκε ότι η αναστολή αύξησης σε καρκίνωμα μαστού και σε B λέμφωμα^{27,54} μπορεί να συμβεί απουσία ενός πλήρους ανοσοποιητικού συστήματος.

Συνοπτικά, η ενεργοποίηση του CD40 μπορεί να επάγει τη λειτουργία ποικίλων καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων τόσο προ-αποπτωτικών όσο και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Είναι φανερό ότι η επίδραση της άμεσης διέγερσης του CD40 σε κακοήθειες εξαρτάται από την κατάσταση διαφοροποίησης των διεγερμένων κυττάρων και από τον τύπο της κακοήθειας⁵⁷.

1.5.3 Έμμεση δράση των CD40/CD40L μέσω επαγωγής αντι-ογκογόνου ανοσίας

Ο CD40 είναι ένας πιθανός ενεργοποιητής του ανοσολογικού συστήματος και έτσι η αλληλεπίδραση CD40/CD40L στα ανοσοποιητικά κύτταρα έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την εμπλοκή της στην ανάπτυξη προστατευτικής αντι-ογκογόνου ανοσίας. Η πρώτη σχετική μελέτη έδειξε ότι η θεραπεία με αντι-CD40L μονοκλωνικά αντισώματα προκαλούσε αναστολή της παραγωγής προστατευτικών ανοσολογικών αποκρίσεων και παρεμπόδιζε τη θεραπευτική δράση των πιθανών αντικαρκινικών εμβολίων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση ποντικών με έλλειψη CD40. Αυτά τα ποντίκια ήταν ανίκανα να παράγουν μια προστατευτική αντι-ογκογόνο ανοσολογική απόκριση μετά από μια προστατευτική αγωγή μέσω εμβολιασμών⁵⁸.

Σύμφωνα με το γεγονός ότι ο CD40L ήταν σημαντικός για την επαγωγή προστατευτικής αντι-ογκογόνου ανοσίας, προσμένονταν ότι τα αντι-CD40 αντισώματα αγωνιστές, θα αποτελούσαν δραστικά έκδοχα για την επαγωγή αντι-ογκογόνου ανοσίας. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα CD40 αντισώματα αγωνιστές προκαλούσαν CTL αποκρίσεις, που ήταν ικανές να εξαφανίσουν όγκο σε ένα σύστημα λεμφώματος. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η πρόσδεση του CD40 μπορούσε να ξεπεράσει την περιφερική CTL ανοχή που επάγονταν από πεπτίδια, και να αυξήσει τη δραστηριότητα των αντικαρκινικών εμβολίων⁵⁹⁻⁶¹. Ωστόσο, η χρήση του CD40 ως μοναδικού αγωνιστή για την επαγωγή ανοσίας παρέμενε αμφίβολη.

Αρκετές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η διέγερση του CD40 μπορεί να ενισχύσει τις αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων (DC)⁶². Η ενεργοποίηση των DCs με CD40 αγωνιστές οδηγεί σε αυξημένη επιβίωσή τους, έκκριση των IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α και MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α). Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση του CD40 αυξάνει την έκφραση συν-διεγερτικών μορίων όπως MHC-II, LFA-3, CD80 και CD86 και προάγει την αντιγόνο-παρουσίαση και την ενεργοποίηση πρώτα των Th και έπειτα των CTL⁵⁷. Ωστόσο, η μοναδική χρήση ενός αντι-CD40 αντισώματος αγωνιστή επιταχύνει την εξάλειψη των ειδικών για τον όγκο CTL, απουσία εμβολιασμού με αντιγόνο, σε ένα σύστημα ποντικού με μελάνωμα⁶³. Θεραπευτικές αγωγές που χρησιμοποιούν τις εξαρτώμενες από τον CD40 IFN-αποκρίσεις οδηγούν σε αποτελεσματική πρώιμη αντικαρκινική δραστηριότητα, ενώ η θεραπεία με CD40 αγωνιστή μόνο του εμποδίζει την ανάπτυξη ειδικών για τον όγκο T κυττάρων⁴¹. Είναι ξεκάθαρο ότι η έντονη ανάπτυξη της επίκτητης ανοσίας βασίζεται στη συνεργασία τόσο της

έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας, και για αυτό εκτιμήθηκε η συνεισφορά των TLR αγωνιστών στη διέγερση της επίκτητης ανοσίας από τον CD40. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η συνδυαστική χρήση CD40 και TLR αγωνιστών επάγει υψηλές συχνότητες ειδικών αντικαρκινικών T κυττάρων και παρέχει αποτελεσματική θεραπεία σε έναν αριθμό καρκινικών μοντέλων. Μια αύξηση στη συχνότητα των αντιδρώντων με τον όγκο CD8⁺ T κυττάρων, που διηθούν αποτελεσματικά το όργανο που φέρει τον όγκο, οδηγεί στην παραγωγή πιθανών ειδικών αντικαρκινικών CD8⁺ T κυττάρων μνήμης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι μελλοντικές, βασιζόμενες στον CD40, αντικαρκινικές μέθοδοι πρέπει να περικλείουν ενεργοποιητές τόσο του έμφυτου όσο και του επίκτητου ανοσολογικού συστήματος⁶⁴.

Έχουν γίνει μελέτες που χρησιμοποιούν την πρόσδεση του CD40 για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου, πραγματοποιώντας γονιδιακή μεταφορά του CD40L γονιδίου σε DCs και καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση του CD40L σε μια μικρή αναλογία των καρκινικών κυττάρων ήταν αρκετή για να προκαλέσει μια μακράς διάρκειας συστημική αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση σε ποντίκια, που έχει δειχθεί ότι είναι εξαρτώμενη από CTLs⁶⁵. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η πρόσδεση του CD40 μπορεί να παρακάμψει την απαίτηση των CD4⁺ T κυττάρων κατά τη διάρκεια ανοσοποίησης από DCs, που είναι γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν αντιγόνο μελανώματος⁶⁶. Άλλες γονιδιακές θεραπείες ήταν επιτυχημένες σε καρκινικά μοντέλα ποντικού, όπως η *ex vivo* μεταφορά του ιού είτε σε DCs είτε σε όγκους με τη χρήση ανασυνδιασμένων αδενοϊών που εκφράζουν CD40L. Αυτή η προσέγγιση έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε συγγενικά καρκινικά μοντέλα ορθοκολικού καρκινώματος, καρκινώματος του πνεύμονα και μελανώματος^{67,68}. Είναι πιθανό η αποκλειστική θεραπεία με CD40 να είναι αποτελεσματική σε αυτά τα μοντέλα γιατί το αδενοϊκό σύστημα μεταφοράς παρέχει το επιπλέον απαραίτητο TLR σήμα που οδηγεί στην ανάπτυξη της θεραπευτικής ανοσίας.

1.6 Στόχοι της εργασίας

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι επιγραμματικά οι εξής:

- 1) Αξιολόγηση των λιποσωμάτων ως προς την αποτελεσματικότητά τους να μεταφέρουν ένα πλασμίδιο στα κύτταρα, το οποίο θα εκφράζει σε αυτά το επιθυμητό γονίδιο.
- 2) Καταστολή του αντι-αποπτωτικού σηματοδοτικού μορίου Akt, με τη χρήση Akt1 antisense και μελέτη της επίδρασης αυτής στον κυτταρικό θάνατο.
- 3) Άμεση επίδραση του μεμβρανικού mCD40L και του εκκρινόμενου τριμερούς stmCD40L, με ή χωρίς συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά, στον κυτταρικό θάνατο, με χρήση του συστήματος των ανασυνδυασμένων αδενοϊών.
- 4) Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων μετά από μόλυνσή τους με αδενοϊούς που εξέφραζαν mCD40L και stmCD40L.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

2.1.1 Συντήρηση κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω: EJ (human bladder carcinoma), B16-F10 (mouse melanoma), B16-F10mCD40 (stable transfected with mCD40), AGE60 (human ovarian carcinoma) και Bro (human melanoma). Επίσης, για τον πολλαπλασιασμό, καθαρισμό και τιτλοποίηση των ανασυνδιασμένων αδενοϊών χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές 911 και AD-293. Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν και συντηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM+10% FCS ή RPMI+10%FCS, ενώ ειδικά για τα B16-F10mCD40 χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το αντιβιοτικό G418 (1mg/ml) ως μέσο επιλογής. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε κατάλληλο επωαστήρα με συνθήκες 37°C, 5%CO₂ και υγρή ατμόσφαιρα. Ανασύσταση (passaging) των κυτταρικών σειρών γινόταν όταν ο βαθμός συρροής στο πιάτο (confluency) έφτανε το 90%. Τα κύτταρα αφού ξεπλένονταν με διάλυμα PBS, επώαζονταν στους 37°C για 5min παρουσία διαλύματος τρυψίνης (trypsin+EDTA). Στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν (1200rpm/5min/θερμοκρασία δωματίου) και η πελέτα επαναδιαλυόταν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφερόταν τμήμα σε καινούργιο πιάτο με φρέσκο θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα τοποθετούνταν στον επωαστήρα για να επικολληθούν στο πιάτο και να αρχίζουν να αναπτύσσονται. Αποθέματα κυτταρικών σειρών διατηρούνταν σε κατάλληλο μέσο (συνήθως 50% DMEM, 40% FCS και 10% DMSO) στους -80°C. Το ξεπάγωμα των κυττάρων γινόταν με επώαση τους για 1min σε υδατόλουτρο 37°C και τοποθέτησή τους σε πιάτο με φρέσκο θρεπτικό μέσο, το οποίο ανανεωνόταν κάθε 48-72 ώρες.

2.1.2 Παροδική επιμόλυνση κυττάρων (transient transfection)

2.1.2.1 Lipofectamine™

Για την παροδική επιμόλυνση κυττάρων χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη (Invitrogen). Τα κύτταρα στρώνονταν σε 12-well πιάτο (EJ: 4x10⁴, B16-F10: 8x10⁴, AGE60: 4x10⁴) και την επόμενη μέρα αφού είχαν φτάσει σε βαθμό συρροής περίπου 30% επιμολύνονταν με το πλασμιδιακό DNA (συγκέντρωσης από 0.5-2 μg). Κατά την επιμόλυνση τοποθετούνταν σε

μια σειρά σωλήνων Eppendorf 100μl OptiMEM και 2.5μl Lipofectamine™ (5min/RT) και σε μια δεύτερη σειρά σωλήνων, 100μl OptiMEM και κατάλληλη συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA (0.5-2 μg). Το περιεχόμενο της δεύτερης σειράς μεταφερόταν στην πρώτη, το μίγμα των 200μl επωαζόταν για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφερόταν στα πιάτα με τα επιστρωμένα κύτταρα όπου προστίθενται 500μl OptiMEM. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 4-6hrs και στη συνέχεια προστίθενται 500μl θρεπτικού μέσου με 10% ορό (Full Media). Η επώαση συνεχιζόταν για 12-16hrs, το θρεπτικό ανανεωνόταν και μετά από άλλες 24hrs τα κύτταρα υφίστανται διάφορες διεργασίες.

2.1.2.2 Lipofectamine™ 2000

Η μέθοδος της Lipofectamine™ 2000 χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά για την επιμόλυνση των κυττάρων με Akt1 antisense καθώς ήταν η αποτελεσματικότερη μέθοδος μεταξύ των τριών μεθόδων που υπήρχαν στο εργαστήριο (Lipofectamine™ 2000, Lipofectamine™, si-IMPORTER). Τα κύτταρα στρώνονταν σε 24-well πιάτο (EJ: 4×10^4 , Bro: 5×10^4) και την επόμενη μέρα αφού είχαν φτάσει σε βαθμό συρροής περίπου 70% επιμολύνονταν με Akt1 antisense (150nM, 300nM, 450nM). Κατά την επιμόλυνση τοποθετούνταν σε μια σειρά σωλήνων Eppendorf 50μl OptiMEM και 1μl Lipofectamine™ 2000 για τα EJ κύτταρα, ενώ για τα Bro κύτταρα 50μl OptiMEM και 0.5μl Lipofectamine™ 2000 και σε μια δεύτερη σειρά σωλήνων, 50μl OptiMEM και κατάλληλη συγκέντρωση antisense (150nM, 300nM, 450nM). Το περιεχόμενο της δεύτερης σειράς μεταφερόταν στην πρώτη, το μίγμα των 100μl επωαζόταν για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφερόταν στα πιάτα με τα επιστρωμένα κύτταρα όπου προστίθενται 150μl OptiMEM. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 4hrs και στη συνέχεια το παραπάνω μίγμα αντικαθίστανται από 500μl θρεπτικού μέσου με 10% ορό (Full Media). Η επώαση συνεχιζόταν και 12-24-48hrs μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα υφίστανται διάφορες διεργασίες. Οι Akt antisense αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Akt1 antisense ("U antisense"): 5' GCCUctccatccctCCAA 3'

Akt1 antisense ("T antisense"): 5' GCCTctccatccctCCAA 3'

2.1.2.3 «Επιμόλυνση» με λιποσώματα (liposome "transfection")

Ειδικά λιποσώματα είχαν κατασκευαστεί από την εταιρεία NovosomAG έτσι ώστε να φέρουν μέσα στο καψίδιο τους ένα πλασμίδιο που να εκφράζει hCD40L. Τα κύτταρα στρώνονταν σε 12-well πιάτο (EJ: 4×10^4 , B16-F10: 8×10^4 , AGE60: 4×10^4) και την επόμενη

μέρα αφού είχαν φτάσει σε βαθμό συρροής περίπου 30% «επιμόλυνονταν» με τις διαφορετικές κατασκευές λιποσωμάτων. Κατά την «επιμόλυνση» απλώς προστίθενται στο ήδη υπάρχον θρεπτικό μέσο είτε 100μl κατάλληλης αραιώσης λιποσωμάτων (για τελική συγκέντρωση 100pM), είτε 200μl κατάλληλης αραιώσης λιποσωμάτων (για τελική συγκέντρωση 1nM). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C και 48hrs μετά την «επιμόλυνση» υφίστανται κατάλληλη διεργασία για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS).

2.1.2.4 Μεταγωγή ανασυνδιασμένων αδενοϊών σε κύτταρα (virus transduction)

Τα B16-F10mC40 κύτταρα στρώνονταν είτε σε 12-well πιάτο (4×10^4 /well) είτε σε 96-well πιάτο (10^4 /well) και την επόμενη μέρα αφού είχαν φτάσει σε βαθμό συρροής περίπου 30% ήταν έτοιμα για μεταγωγή. Κατά τη μεταγωγή αφαιρούνταν το πλήρες θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C για 90min με θρεπτικό μέσο απουσία ορού (serum-free medium, SFM). Στη συνέχεια αφαιρούνταν αυτό το θρεπτικό και προστίθονταν φρέσκο θρεπτικό (SFM) μαζί με κατάλληλη συγκέντρωση αδενοϊού (MOI 500, MOI 2000). Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C παρουσία του ιού για 3hrs. Κατόπιν ο ιός αφαιρούνταν και προστίθονταν θρεπτικό μέσο με 2% ορό. Τα κύτταρα συνέχιζαν να επωάζονται στους 37°C και 48hrs μετά τη μεταγωγή του ιού υφίστανται κατάλληλη διεργασία για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS) ή μέτρηση κυτταρικής επιβίωσης με MTT.

2.2 Μέτρηση κυτταρικής επιβίωσης (MTT assay)

Η MTT ανάλυση είναι στην πραγματικότητα μία μέτρηση της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων, άρα και κατ' επέκταση μία μέτρηση κυτταρικής επιβίωσης.

Για τα πειράματα που έγιναν με το Akt1 antisense σε EJ κύτταρα, το MTT έγινε ως εξής. Τα κύτταρα ήταν σε 24-well πιάτο και 48hrs μετά την «επιμόλυνσή» τους αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε 1ml/well φρέσκου θρεπτικού μαζί με MTT διάλυμα, συγκέντρωσης 0.5mg/ml. Τα κύτταρα συνέχισαν να επωάζονται στους 37°C για 1-2hrs μέχρι να παρατηρηθούν μωβ ιζήματα. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά με σύριγγα το υπερκείμενο, προστέθηκε 0.5ml DMSO και αναδεύτηκε μέχρι να γίνει ομοιογενές. Τέλος, μεταφέρθηκαν 200μl σε 96-well πιάτο και ακολούθησε μέτρηση σε φωτόμετρο ELISA στα 550nm (for dual at 655nm).

Για τα πειράματα που έγιναν με τους αδενοϊούς σε B16-F10mCD40 κύτταρα, το MTT έγινε ως εξής. Τα κύτταρα ήταν σε 96-well πιάτο και 48hrs μετά τη μεταγωγή του ιού αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκαν 100μl/well φρέσκου θρεπτικού μαζί με MTT διάλυμα, συγκέντρωσης 100μg/ml. Τα κύτταρα συνέχισαν να επωάζονται στους 37°C για περίπου 1hr μέχρι να παρατηρηθούν μωβ ιζήματα. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά με σύριγγα το υπερκείμενο, προστέθηκαν 200μl DMSO και αναδεύτηκαν μέχρι να γίνει ομοιογενές. Τέλος, ακολούθησε μέτρηση σε φωτόμετρο ELISA στα 550nm (for dual at 655nm).

2.3 Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Τα κύτταρα ήταν σε 12-well πιάτο και αφού ξεπλένονταν με διάλυμα PBS, επωάζονταν στους 37°C για 5min παρουσία διαλύματος τρυψίνης (trypsin+EDTA). Στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν (1200rpm/5min/RT) και η πελέτα επαναδιαλυόταν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C ως εναιώρημα για 20min ώστε να επανέλθουν στη φυσιολογική τους κατάσταση και κατόπιν φυγοκεντρούνταν (1500rpm/10min/RT) και η πελέτα επαναδιαλυόταν σε 50μl κρύου διαλύματος PBS με 10% ορό. Στη συνέχεια προστίθονταν 2μl anti-human CD40L-FITC (BD Pharmingen, Cat.No.555699)/well ή 0.4μl APC anti-mouse CD40L (eBioscience, Cat.No.17-1541-81)/well (αναλόγως το πείραμα) και επωάζονταν για 45min ή 1hr αντιστοίχως στους 4°C στο σκοτάδι. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις με PBS+10%FCS με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις (1500rpm/10min/RT) και τέλος η πελέτα επαναδιαλύονταν σε 0.5ml διαλύματος PBS με 2%PFA και τα δείγματα ήταν έτοιμα για μέτρηση σε κατάλληλο μηχάνημα για FACS.

2.4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου

Στα πειράματα όπου έγινε μεταγωγή του αδενοϊού σε B16-F10mCD40 κύτταρα πραγματοποιήθηκε "Cell Death Detection" ELISA (Roche, Cat.No. 11 544 675 001), μία μέθοδος ποσοτικοποίησης της απόπτωσης, καθώς βασίζεται στην ανίχνευση συμπλόκων τμημάτων DNA μαζί με ιστόνες, μετά από λύση των κυττάρων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας.

2.5 Τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών

2.5.1 Απομόνωση ολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (WCL extract)

Τα πιάτα απομακρύνονταν από τον επωαστήρα και αμέσως μεταφέρονταν σε πάγο. Τα κύτταρα ξεπλένονταν δύο φορές με κρύο διάλυμα 1xPBS και στη συνέχεια προστίθενται στο πιάτο κατάλληλη ποσότητα (100μl/well για 24-well πιάτο) διαλύματος RIP με αναστολείς πρωτεασών (1mM Na_3VO_4 , 1μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Leupeptin). Τα κύτταρα αποκολλιόνταν με τη βοήθεια ξύστρου και το μίγμα διάλυμα λύσης-κύτταρα μεταφερόταν σε σωλήνα Eppendorf. Ακολουθούσε επώαση στον πάγο για 10min και στη συνέχεια φυγοκέντρηση (13000rpm/10min/4°C). Το υπερκείμενο συλλεγόταν και ακολουθούσε υπολογισμός της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης και χρήση του σε περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες όπως αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

2.5.2 Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Η ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης γινόταν με τη μέθοδο Bradford και υπολογιζόταν με τη βοήθεια σπεκτροφωτόμετρου (Jenway). Αρχικά κατασκευαζόταν μια πρότυπη καμπύλη με βάση γνωστές συγκεντρώσεις μιας πρωτεΐνης όπως η αλβουμίνη. Σε νερό στήλης διαλυόταν (1:5 v/v) αντιδραστήριο BioRad (Bio-Rad) και σε 1ml από το διαλυμένο αντιδραστήριο προστίθενται 20μl από το κάθε standard. Υπολογιζόταν η οπτική πυκνότητα (OD) στα 595nm με τη χρήση πλαστικών κυβεττών (Plastibrand) και φτιαχνόταν μια πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια της οποίας υπολογιζόταν μια εξίσωση (π.χ. $y=0,0627x-0,0786$ με $R^2=0,98$). Στη συνέχεια προστίθενται 5μl από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα σε 1ml διαλυμένου αντιδραστηρίου και μετρίοταν η OD που αντικαθιστούσε την τιμή y στην εξίσωση. Η τιμή x δίνει την ποσότητα της πρωτεΐνης σε μg/5μl.

2.5.3 Στύπωμα κατά Western

Τα δείγματα αναλύονταν με SDS-PAGE αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% (for Akt protein) ή 15% (for CD154 protein). Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι η Mini-PROTEAN 3 cell Apparatus (BioRad) και η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 120V για 90min. Ακολουθούσε η μεταφορά των πρωτεϊνών (transfer) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.2μm (BioTrace). Η μεταφορά έγινε στη συσκευή Mini Trans-Blot (BioRad) και διαρκούσε 90min στα 400mA. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωαζόταν για 1hr (θερμοκρασία δωματίου) σε 5% άπαχο γάλα (Regilait) διαλυμένο σε TBS/T 0.1%,

ξεπλενόταν μια φορά σε TBS/T 0.1% για 5min και επωαζόταν με πρωτεΐον αντίσωμα στους 4⁰C για 12-16hrs. Έπειτα ξεπλενόταν 3 φορές για 10min με TBS/T 0.1% και επωαζόταν για 1hr (θερμοκρασία δωματίου) με δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο σε HRP. Η εμφάνιση του στυπώματος γινόταν με τη χρήση αντιδραστηρίων ECL (Amersham) και φιλμ αυτοραδιογραφίας (Fujifil) και η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Kodak X-OMAT 1000 (Kodak).

Εκτός από SDS-PAGE αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιήθηκε και ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (native) για την ανίχνευση τριμερούς μορφής της εκκρινόμενης πρωτεΐνης CD40L. Βέβαια επειδή η πρωτεΐνη ήταν εκκρινόμενη στο υπερκείμενο διάλυμα των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ειδικός συμπυκνωτής (filter concentrator, Millipore Cat.No.UFC9-003), με δυνατότητα συμπύκνωσης μέχρι και 15 φορές. Οι διαδικασίες που διέφεραν από την SDS-PAGE ήταν οι παρακάτω. Η κύρια διαφορά ήταν ότι στα διαλύματα που χρησιμοποιούνταν απουσίαζε οτιδήποτε αποδιατακτικό όπως SDS και β-mercaptoethanol. Επίσης αντί για SDS, χρησιμοποιήθηκε Coomassie G-250 ώστε οι πρωτεΐνες να αποκτήσουν κάποιο αρνητικό φορτίο και να είναι δυνατή η ηλεκτροφόρησή τους. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε ειδικός protein marker (Amersham, Cat.No. 17-0445-01), η ανίχνευση του οποίου γινόταν με χρώση εκείνου του τμήματος gel με Coomassie R-250 για 30min και ακολουθούσε fast και slow destaining. Τέλος, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γινόταν ολονυκτίως στους 4⁰C για 2hrs στα 100V και στη συνέχεια στα 6mA (~60V) μέχρι τέλους και η μεταφορά πρωτεϊνών (transfer) γινόταν για 3hrs στα 200mA στους 4⁰C.

Πρωτεύοντα αντισώματα

- A) mouse monoclonal anti-CD154 (E-8) (Santa Cruz, Cat.No. sc-74448) 1:500
- B) rabbit polyclonal anti-Akt1/PKBα (Upstate, Cat.No. 07-416) 1:600
- Γ) anti-Actin (Sigma) 1:2000

Δευτερεύοντα αντισώματα

- A') goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz, Cat.No. sc-2005) 1:10000
- B') anti-rabbit-HRP (Chemicon) 1:100000
- Γ') anti-mouse-HRP (Chemicon) 1:10000

2.6 Παρασκευή δενδριτικών κυττάρων (DC preparation)

Αρχικά, απομονώθηκαν BMDM (Bone Marrow Derived Monocytes) κύτταρα από τα οστά των ποδιών ποντικού BL6 WT ηλικίας 6-8 εβδομάδων. Στη συνέχεια στρώθηκαν σε 6-well πιάτο 3×10^6 /well κύτταρα σε ειδικό θρεπτικό μέσο R10, παρουσία 10% ορού, 25ng/ml IL-4 και 50ng/ml GM-CSF. Οι παράγοντες αυτοί είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση των BMDMs σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (immature DCs). Η διαδικασία της διαφοροποίησης διαρκούσε 7 μέρες και τη 2^η και 4^η μέρα το θρεπτικό μέσο αντικαθιστούταν με φρέσκο. Μετά το πέρας των 7 ημερών τα ανώριμα πλέον DCs ήταν έτοιμα για επιμόλυνση (transduction) με τους αδενοϊούς RAd-mCD40L και RAd-stmCD40L σε MOI 100, 200 και 500. Τα κύτταρα από το 6-well πιάτο συλλέγονταν με τη χρήση ειδικού ξύστρου (scraper), χωρίς τρυψινοποίηση. Η διαδικασία της επιμόλυνσης γινόταν σε 24-well πιάτο με 5×10^5 /well κύτταρα σε θρεπτικό R10 απουσία ορού και διαρκούσε 2hrs. Μετά τις 2hrs το θρεπτικό αντικαθιστούταν με R10 παρουσία 10% ορού και μετά από 72hrs τα κύτταρα επεξεργάζονταν για ανάλυση FACS. Λόγω αυξημένης ευαισθησίας των DCs τα κύτταρα δε μονιμοποιήθηκαν με 2%PFA, αλλά αναλύθηκαν με FACS αμέσως μετά την επεξεργασία τους. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δείκτες διαφοροποίησης, των ανώριμων σε ώριμα DCs, CD80 (α-CD80-FITC, eBioscience, cat.no.110801) και CD86 (α-CD86-FITC, eBioscience, cat.no.110862), ο δείκτης γενικότερης ανίχνευσης ανώριμων και ώριμων δενδριτικών κυττάρων CD11c (α-CD11c-PE, eBioscience, cat.no.120114). Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και κάποια αντισώματα για την αφαίρεση του θορύβου (background) όπως το Armenian Hamster IgG Isotype Control FITC (eBioscience, cat.no.114888) και το Armenian Hamster IgG Isotype Control PE (eBioscience, cat.no.124888).

2.7 Πολλαπλασιασμός, καθαρισμός και τιτλοποίηση των ανασυνδυασμένων αδενοϊών

2.7.1 Πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού των αδενοϊών πραγματοποιείται σε 3 διαδοχικά στάδια, στα οποία αυξάνονται σταδιακά το μέγεθος της κυτταρικής καλλιέργειας και ο τίτλος του ιού που θα παραχθεί στο τέλος. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα AD-293, τα οποία γενικώς διατηρούνταν σε θρεπτικό DMEM παρουσία 10% ορού. Στη συνέχεια όταν τα κύτταρα ήταν έτοιμα (~75-85% confluent) μολύνονταν με τον ανασυνδυασμένο

αδενοϊό με 5-10 FFU ανά κύτταρο, σε πολύ λίγο (ώστε να καλύπτονται οριακά τα κύτταρα) θρεπτικό DMEM παρουσία 2% ορού για 2hrs. Μετά τις 2hrs συμπληρώνονταν θρεπτικό μέσο και μετά από 2-3 μέρες όταν παρουσιαζόταν ικανοποιητικό CPE (cytopathic effect), όπου δηλαδή πάνω από 50% των κυττάρων ήταν στρογγυλεμένα και ξεκολλημένα, αυτά συλλέγονταν με ξύστρο (scraping) και λύνονταν με διαδικασία παγώματος/ξεπαγώματος ώστε να απελευθερωθεί ο ιός και να γίνει η τιτλοποίησή του. Ο ιός διατηρούταν στους -80°C σε διάλυμα 100mM Tris-HCl pH 8.0, παρουσία 4% σουκρόζης.

2.7.2 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Η παραπάνω διαδικασία όμως ήταν αρκετή μόνο για in vitro πειράματα. Επειδή όμως απώτερος στόχος ήταν να γίνουν in vivo πειράματα, ο ιός έπρεπε να καθαριστεί επιπλέον με τη διαδικασία της διαβαθμισμένης συγκέντρωσης CsCl, κατά την οποία τοποθετούνται σε ειδικό σωλήνα (ultra-clear Beckman tube, cat.no.344058) δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις CsCl μαζί με το διάλυμα που περιείχε τον ιό (10mM Tris-HCl pH7.9). Στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση (25000rpm, 2hrs, 4°C) σε ειδική υπερ-φυγόκεντρο (Sorvall AH-629). Μετά τη φυγοκέντρηση, ο ιός συγκεντρωνόταν σε έναν δακτύλιο μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων CsCl και συλλέγονταν (1-3 ml) προσεκτικά και σε στείρες συνθήκες με σύριγγα (18G). Προκειμένου να αφαιρεθεί το CsCl, ακολουθούσε διαπίδυση. Έτσι, ο ιός φορτώνονταν σε ειδική κασέτα (Slide-A-Lyser cassette, 10K, 0.3-5ml, Pierce) με σύριγγα (20G) και ακολουθούσε ολονύκτια διαπίδυση σε 500-800 ml διάλυμα διαπίδυσης (10mM Tris-HCl pH7.9, 2mM MgCl₂, 4% sucrose). Το διάλυμα στις πρώτες 2hrs αντικαθιστούνταν με φρέσκο. Τέλος ο ιός συλλέγονταν από την κασέτα με σύριγγα (20G) και ήταν έτοιμος για τιτλοποίηση και αποθήκευσή του στους -80°C.

2.7.3 Τιτλοποίηση ανασυνδυασμένων αδενοϊών (FFU assay)

Για την τιτλοποίηση των ιών χρησιμοποιήθηκαν 911 κύτταρα και πιάτα διαμέτρου 35mm τα οποία ήταν επικαλυμμένα με κολλαγόνο. Όταν τα κύτταρα ήταν έτοιμα (~90-95% confluent) μολύνονταν με διαδοχικές αραιώσεις (από 10⁴ έως 10⁷) του ιού σε 1ml θρεπτικό DMEM παρουσία 10% ορού για 2hrs και στη συνέχεια αφαιρούταν το θρεπτικό που περιείχε τον ιό και τοποθετούνταν 2ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού. Μετά από 2 μέρες καλλιέργειας στους 37°C, τα κύτταρα επεξεργάζονταν κατάλληλα και βιάφονταν με αντίσωμα που αναγνώριζε ιϊκή πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, μετά από μονιμοποίηση των κυττάρων με 4%PFA, τα κύτταρα επώάζονταν (1hr, RT) πρώτα με ειδικό για την ιϊκή πρωτεΐνη Ad-hexon-5 αντίσωμα (Millipore, cat.no.MAB8052) και στη συνέχεια επώάζονταν

(1hr, RT) με το δευτερεύων αντίσωμα (Invitrogen, cat.no.O-6380). Τέλος, μετρούνταν σε μικροσκόπιο φθορισμού τα κύτταρα που φθόριζαν πράσινο και υπολογίζονταν ο τίτλος του ιού ως εξής:

$$X \text{ (average of 20 squares)} \times 200 \text{ (squares per dish)} \times 10^5 \text{ (virus dilution)} = \text{ffu/ml}$$

(FFU: Fluorescence Forming Unit)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης hCD40L μετά από χρήση λιποσωμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές (ως προς το μέγεθος και τις ιδιότητες) κατασκευές λιποσωμάτων που έφεραν στο καψίδιό τους πλασμίδιο που εκφράζει hCD40L και μελετήθηκε με FACS η έκφραση της πρωτεΐνης hCD40L στις κυτταρικές σειρές EJ (human bladder carcinoma), B16-F10 (mouse melanoma) και AGE60 (human ovarian carcinoma) (Πίνακας 3.1).

		EJ		B16-F10		AGE60	
		hCD40L %	MFI	hCD40L %	MFI (positive)	hCD40L %	MFI (positive)
1	not transfected NO antibody	1,6	0,917	1,2	1,33	1,9	1,65
2	formulation 1 (Nov719d017)	0,6	0,979	0,4	1,39	2,4	1,65
3	formulation 2 (Nov722d037)	0,4	0,962	0,5	1,32	1,5	1,77
4	formulation 3 (Nov769d002)	0,9	1,01	0,9	1,28	5,4	1,36
5	formulation 4 (Nov770d002)	1,1	0,886	0,9	1,32	2,8	1,46
6	formulation 5 (Nov756d003)	0,3	1,14	1,7	1,27	4,3	1,5
7	formulation 6 (Nov116d060)	0,5	0,983	0,4	1,27	1,7	1,49
8	formulation 7 (Nov048d018)	1,2	0,981	0,6	1,27	5,1	1,57
9	formulation 8 (Nov757d005)	0,9	1,08	1	1,3	3,8	1,4
10	formulation 9 (Nov764d003)	2,7	1,01	1	1,26	4,8	1,41
11	formulation 10 (Nov771d001)	0,8	1	0,5	1,41	1,3	1,33
12	lipofectamin transfected with plasmid	42,2	1,34	67,6	2,74	75	1,96

Πίνακας 3.1: Ανάλυση FACS 48hrs μετά την επιμόλυνση των κυττάρων. Συγκέντρωση λιποσωμάτων: 100pM/well. Συγκέντρωση πλασμιδίου στην επιμόλυνση με λιποφεκταμίνη: 0,5μg. Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και με συγκέντρωση λιποσωμάτων 1nM/well και τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια. (MFI: ένταση φθορισμού)

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι για όλες τις κατασκευές λιποσωμάτων δεν υπήρχε κάποια έκφραση της πρωτεΐνης hCD40L τόσο ως προς το ποσοστό των κυττάρων που την εξέφραζαν, όσο και ως προς την ένταση φθορισμού (MFI).

Για το λόγο αυτό παραγγέλθηκαν και κάποιες ακόμη λιποσωμικές κατασκευές που είχαν επιπλέον στη μεμβράνη τους τον προσδέτη Transferrin (Tf ligand), με σκοπό την

αποτελεσματικότερη ενδοκύττωσή τους μέσω του υποδοχέα Transferrin (TfR), έναν υποδοχέα που έχουν όλα τα κύτταρα για την πρόσληψη σιδήρου από το περιβάλλον τους και την διατήρηση της ομοιόστασής τους. Έτσι ελέγχθηκε με τον ίδιο τρόπο η αποτελεσματικότητα των νέων λιποσωμάτων ως προς την ενδοκύττωσή τους και την έκφραση του CD40L στα κύτταρα. Το συγκεκριμένο πείραμα όμως έγινε και σε συνδιασμό με τη χρήση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου Fluorouracil (5-FU), καθώς έχει βρεθεί ότι το 5-FU προκαλεί μορφολογικές αλλαγές στις κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν την πρόσληψη λιποσωμάτων από τα κύτταρα (Πίνακας 3.2).

			hCD40L %	MFI (total)	MFI (positive)
A	1	EJ not transfected	2	0,299	1,1
	2	EJ lipofectamin transfected with pShuttle-CMV-hCD40L	44,9	0,768	1,6
	3	EJ transfected with formulation 1 (Nov757d011-Tf)	0,9	0,267	1,27
	4	EJ transfected with formulation 2 (Nov764d007-Tf)	3,4	0,375	1,19
	5	EJ transfected with formulation 3 (Nov759d020)	1,5	0,279	1,22
	6	EJ transfected with formulation 4 (Nov774d003-Tf)	1,1	0,296	1,2
B	1	EJ not transfected	2	0,46	1,22
	2	EJ lipofectamin transfected with pShuttle-CMV-hCD40L	67	1,11	1,68
	3	EJ transfected with formulation 1 (Nov757d011-Tf)	1,6	0,344	1,3
	4	EJ transfected with formulation 2 (Nov764d007-Tf)	7,8	0,563	1,18
	5	EJ transfected with formulation 3 (Nov759d020)	1,3	0,383	1,18
	6	EJ transfected with formulation 4 (Nov774d003-Tf)	0,4	0,282	1,26
C	1	EJ not transfected	1,7	0,207	0,872
	2	EJ lipofectamin transfected with pShuttle-CMV-hCD40L	55	0,676	1,21
	3	EJ transfected with formulation 1 (Nov757d011-Tf)	0,9	0,192	0,92
	4	EJ transfected with formulation 2 (Nov764d007-Tf)	6,1	0,292	0,834
	5	EJ transfected with formulation 3 (Nov759d020)	1,6	0,214	0,819
	6	EJ transfected with formulation 4 (Nov774d003-Tf)	1,7	0,259	0,998

Πίνακας 3.2: Ανάλυση FACS 48hrs μετά την επιμόλυνση EJ κυττάρων. **A)** Επιμόλυνση αποκλειστικά με τα λιποσώματα. **B)** Επιμόλυνση με τα λιποσώματα και ταυτόχρονης παρουσίας 50μM 5-FU. **C)** επώαση για 2hrs με 50μM 5-FU και ακόλουθη επιμόλυνση αποκλειστικά με τα λιποσώματα. Συγκέντρωση λιποσωμάτων: 100pM/well. Συγκέντρωση πλασμιδίου στην επιμόλυνση με λιποφεκταμίνη: 0,5μg. (MFI-total: συνολική ένταση φθορισμού, MFI-positive: ένταση φθορισμού μόνο από τα κύτταρα που εκφράζουν hCD40L)

Από τον Πίνακα 3.2-A φαίνεται ότι η έκφραση του hCD40L δεν άλλαξε σε σχέση με τον Πίνακα 3.1. Επίσης από τον Πίνακα 3.2-B/C φαίνεται ότι το 5-FU δεν προκάλεσε κάποια

αλλαγή στην έκφραση για το σύνολο των λιποσωμάτων, με εξαίρεση το positive control (επιμόλυνση με λιποφεκταμίνη) και το λιπόσωμα “Nov764d007-Tf”, όπου υπήρξε σημαντική βελτίωση της έκφρασης και κυρίως κατά την ταυτόχρονη παρουσία του 5-FU με τα λιποσώματα. Η βελτίωση αυτή ενώ ήταν σημαντική, παρέμενε εξαιρετικά χαμηλή ως προς το ποσοστό των κυττάρων και την ένταση φθορισμού και έτσι δε μπορούσε να θεωρηθεί αξιοποιήσιμη.

Τέλος, έγινε μια τελευταία προσπάθεια δοκιμάζοντας δύο διαφορετικές μεθόδους επιμόλυνσης (Πίνακας 3.3).

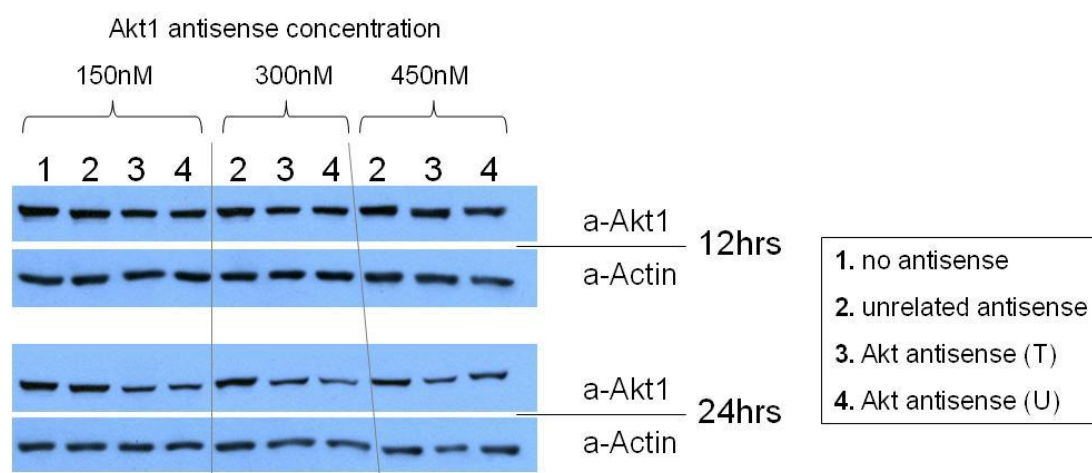
	A) in SFM (6 hours)	hCD40L %	MFI (total)	MFI (positive)
1	EJ not transfected (negative)	1,4	0,238	1,4
2	EJ lipofectamin transfected with pShuttle-CMV-hCD40L (positive)	69,6	1,09	1,78
3	EJ transfected with formulation 1 (Nov757d011-Tf)	2,9	0,212	0,999
4	EJ transfected with formulation 2 (Nov764d007-Tf)	7	0,299	0,947
5	EJ transfected with formulation 3 (Nov759d020)	2,1	0,224	0,96
6	EJ transfected with formulation 4 (Nov774d003-Tf)	3,5	0,249	1,04
	B) after trypsinization (30min in suspension+3h in SFM)			
7	EJ transfected with formulation 1 (Nov757d011-Tf)	3,3	0,231	0,942
8	EJ transfected with formulation 2 (Nov764d007-Tf)	3,1	0,236	0,911
9	EJ transfected with formulation 3 (Nov759d020)	1,9	0,206	0,908
10	EJ transfected with formulation 4 (Nov774d003-Tf)	1,9	0,2	0,877

Πίνακας 3.3: Ανάλυση FACS 48hrs μετά την επιμόλυνση EJ κυττάρων. **A)** Επιμόλυνση για 6hrs σε θρεπτικό απουσία ορού (SFM) και στη συνέχεια προσθήκη ορού. **B)** Επιμόλυνση για 30min σε εναιώρημα μετά από τρυψινοποίηση, στρώσιμο των κυττάρων με SFM για 3hrs και στη συνέχεια προσθήκη ορού. Συγκέντρωση λιποσωμάτων: 100pM/well. Συγκέντρωση πλασμιδίου στην επιμόλυνση με λιποφεκταμίνη: 0,5μg. (MFI-total: συνολική ένταση φθορισμού, MFI-positive: ένταση φθορισμού μόνο από τα κύτταρα που εκφράζουν hCD40L)

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.3 ήταν εξίσου αποθαρρυντικά. Η μόνη παρατήρηση ήταν ότι η βελτίωση έκφρασης στον Πίνακα 3.3-A ήταν παρόμοια με αυτή στον Πίνακα 3.2-B, αλλά ενώ ήταν σημαντική, όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν ήταν αξιοποιήσιμη.

3.2 Μελέτη της επίδρασης της καταστολής (knock-down) του αντι-αποπτωτικού σηματοδοτικού μορίου Akt, με χρήση Akt antisense in-vitro.

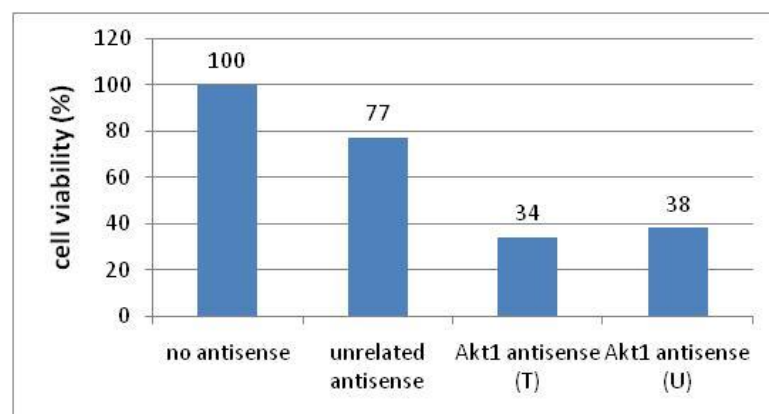
Αρχικά έγινε αξιολόγηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο της καταστολής του Akt1 μορίου μετά από επιμόλυνση των EJ (human bladder carcinoma) κυττάρων με human Akt1 antisense (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: SDS-PAGE σε 10% gel και western blot με a-Akt1 και a-Actin, 12hrs και 24hrs μετά την επιμόλυνση των κυττάρων.

Από την Εικόνα 3.1 φαίνεται ότι υπάρχει ελάττωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Akt1, η οποία αρχικά είναι ελάχιστη στις 12hrs και μετά αρκετά μεγαλύτερη στις 24hrs. Η ελάττωση αυτή φαίνεται να είναι ίδια και με τα δύο Akt1 antisense (3, 4) και σε όλες τις συγκεντρώσεις (150nM, 300nM, 450nM).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της καταστολής του Akt1 στη γενικότερη κυτταρική επιβίωση και φάνηκε ότι την μειώνει αρκετά (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: MTT assay 48hrs μετά την επιμόλυνση των EJ κυττάρων με Akt1 antisense συγκέντρωσης 150nM.

3.3 Μελέτη της άμεσης επίδρασης των mCD40L και stmCD40L σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά στον κυτταρικό θάνατο in vitro.

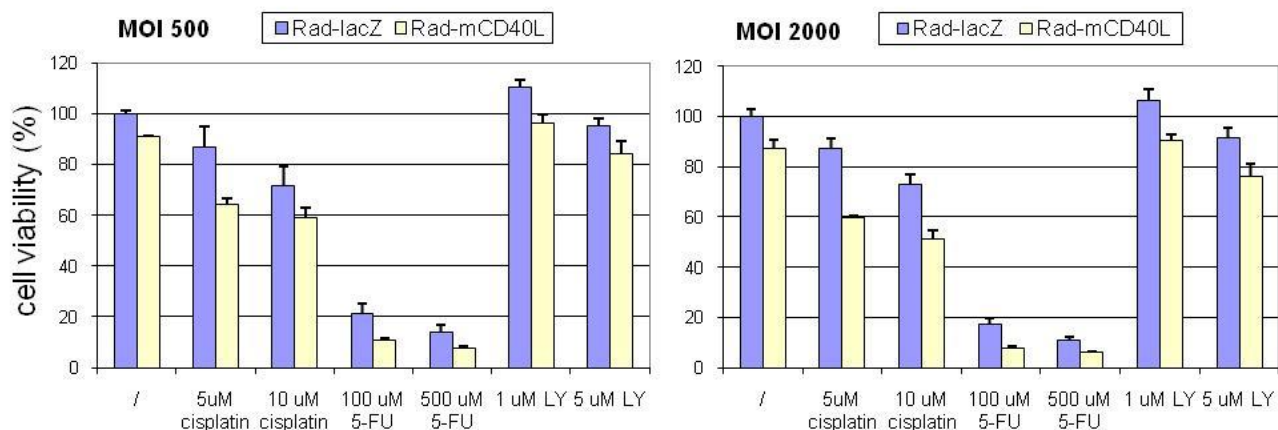
Έχοντας στο εργαστήριο ανίκανους να πολλαπλασιαστούν ανασυνδιασμένους αδενοϊούς (RAΔ) που εκφράζουν είτε το μεμβρανικό mCD40L είτε τον εκκρινόμενο τριμερή stmCD40L, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγωγής (transduction) των ιών αυτών σε B16-F10 mCD40 (mouse melanoma) κύτταρα τα οποία εκφράζουν σταθερά τον υποδοχέα mCD40 και 72hrs μετά τη μεταγωγή έγιναν διάφορα πειράματα ανάλυσης.

Αρχικά μελετήθηκε με ανάλυση FACS η έκφραση του μεμβρανικού mCD40L και παρατηρήθηκε αρκετά σημαντική διαφορά μεταξύ MOI-500 και MOI-2000 τόσο ως προς το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη, όσο και ως προς την ένταση φθορισμού (MFI) (Πίνακας 3.4).

			mCD40L %	MFI
1	B16-F10 mCD40	no infected - no antibody	0,12	36,94
2		Rad-lacZ MOI-500	0,15	20,45
3		Rad-lacZ MOI-2000	0,21	18,63
4		Rad-mCD40L MOI-500	55,76	516,4
5		Rad-mCD40L MOI-2000	90,35	1230

Πίνακας 3.4: Ανάλυση FACS 72hrs μετά τη μεταγωγή (transduction) των B16-F10mCD40 κυττάρων.

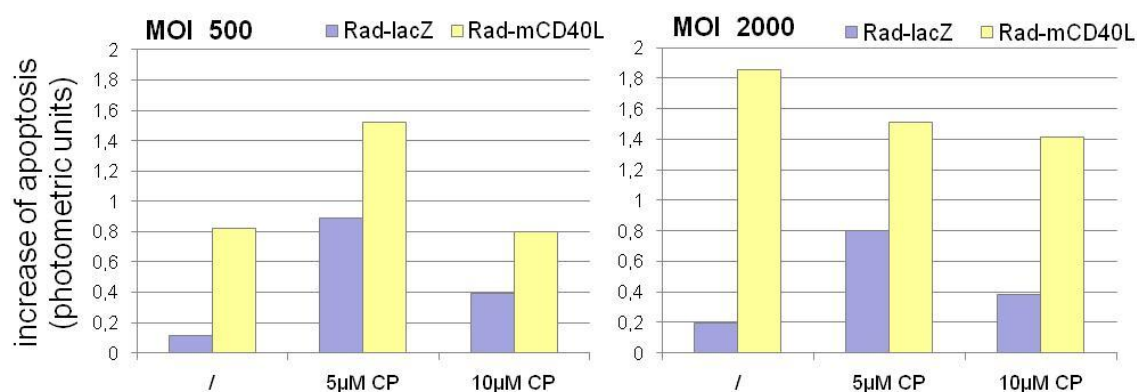
Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση MTT, όπου μελετήθηκε η επίδραση του mCD40L σε συνδυασμό με κάποια χημειοθεραπευτικά στην κυτταρική επιβίωση (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: MTT-assay 72hrs μετά τη μεταγωγή (transduction) των B16-F10mCD40 κυττάρων.

Από την Εικόνα 3.3 (MOI-500) φαίνεται γενικά ότι ο mCD40L σε σχέση με το LacZ έχει μία μικρή επίδραση στην κυτταρική επιβίωση (τάξεως περίπου 10%), τόσο μόνος του, όσο και παρουσία των χημειοθεραπευτικών. Αξιοπρόσεκτη είναι όμως η επίδραση του mCD40L παρουσία 5μM cisplatin (τάξεως 22%). Όσον αφορά την ταυτόχρονη χρήση των χημειοθεραπευτικών σε σχέση με τον mCD40L μόνο του, το LY294002 δεν έχει καμία απολύτως επίπτωση στην επιβίωση, το 5-FU έχει τεράστια επίπτωση καθώς μειώνει την επιβίωση κατά 80% περίπου και το cisplatin έχει μια μέτρια επίπτωση της τάξεως του 30-35%. Συγκριτικά τώρα με τα δύο διαφορετικά MOI που χρησιμοποιήθηκαν, στο MOI-2000 ισχύουν ακριβώς οι ίδιες παρατηρήσεις με το MOI-500 που αναφέρθηκαν παραπάνω, με τη διαφορά ότι ο mCD40L μαζί με τη χρήση χημειοθεραπευτικών έχει ελάχιστα μεγαλύτερη επίδραση (τάξεως 3-8%) στην κυτταρική επιβίωση.

Με την ανάλυση MTT όμως, φάνηκε η επίδραση του mCD40L και των χημειοθεραπευτικών στο γενικότερο κυτταρικό θάνατο που μπορεί να προήλθε είτε από απόπτωση είτε από νέκρωση. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί πιο εξειδικευμένα η επίδραση αυτή, πραγματοποιήθηκε ειδική “Cell Death Detection” ELISA, που ανιχνεύει αποκλειστικά το μέγεθος της κυτταρικής απόπτωσης (Εικόνα 3.4).

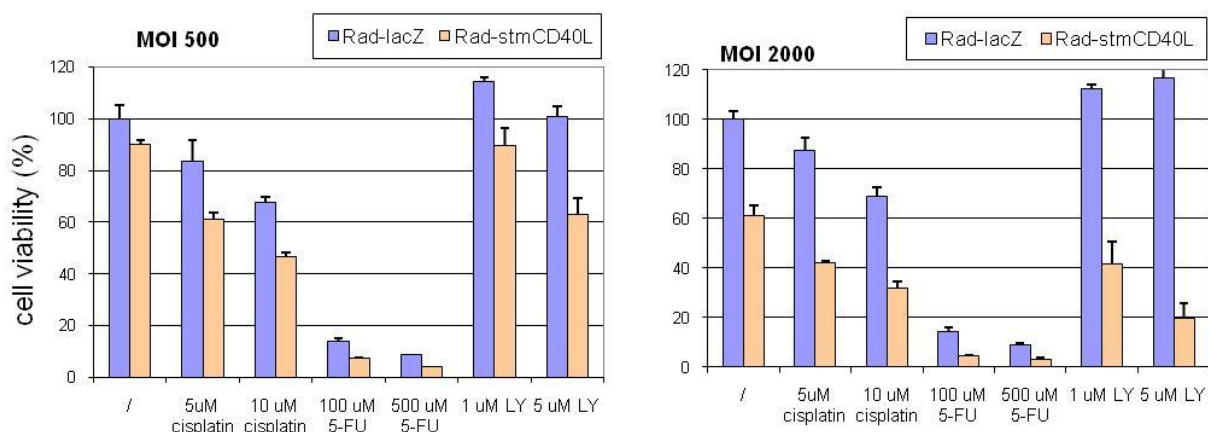


Εικόνα 3.4: “Cell Death Detection” ELISA 72hrs μετά τη μεταγωγή (transduction) των B16-F10mCD40 κυττάρων.

Από την Εικόνα 3.4 φαίνεται ότι το cisplatin χημειοθεραπευτικό από μόνο του (με lacZ) προκαλεί κάποια αύξηση της απόπτωσης και μάλιστα εντονότερη στα 5μM. Αυτή η αύξηση της απόπτωσης είναι ακριβώς η ίδια τόσο στο MOI-500, όσο και στο MOI-2000, δείχνοντας ότι οι οποιοσδήποτε διαφορές μεταξύ MOI-500 και MOI-2000 παρουσία του mCD40L δεν οφείλονται στην πιθανή τοξικότητα που προκαλεί η αυξημένη ποσότητα του ιού, αλλά

καθαρά στην επίδραση του mCD40L. Έτσι στο MOI-500, ο mCD40L από μόνος του προκαλεί σημαντική άμωση της απόπτωσης και ακόμα σημαντικότερη παρουσία 5μM cisplatin. Όμως στο MOI-2000, ο mCD40L από μόνος του προκαλεί αρκετά σημαντικότερη άμωση της απόπτωσης σχετικά με το MOI-500, ενώ παρουσία 5μM και 10μM cisplatin προκαλεί κάποια άμωση αλλά όχι τόσο μεγάλη όσο προκαλεί από μόνος του.

Με την ίδια λογική που μελετήθηκε ο mCD40L, εξετάστηκε στη συνέχεια και η επίδραση του εκκρινόμενου τριμερούς stmCD40L στην κυτταρική επιβίωση (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: MTT-assay 72hrs μετά τη μεταγωγή (transduction) των B16-F10mCD40 κυττάρων.

Η Εικόνα 3.5 εμφανίζει ακριβώς το ίδιο πρότυπο με την Εικόνα 3.3, με τη διαφορά ότι εδώ η επίδραση του stmCD40L μόνου του αλλά και μαζί με χημειοθεραπευτικά είναι αρκετά εντονότερη στο MOI-2000 σχετικά με το MOI-500 και επίσης έντονη κυρίως στο MOI-2000 είναι η επίδραση του χημειοθεραπευτικού LY294002 παρουσία του stmCD40L, από ότι μόνου του.

3.4 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DC maturation)

BMDMs (Bone Marrow Derived Monocytes) καλλιεργήθηκαν για μία εβδομάδα παρουσία IL4 και GM-CSF και διαφοροποιήθηκαν σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (immature DCs). Στη συνέχεια στα ανώριμα DCs έγινε μεταγωγή (transduction) με τους αδενοϊούς RAd-mCD40L και RAd-stmCD40L και μελετήθηκε με ανάλυση FACS η έκφραση του mCD40L/stmCD40L καθώς και κάποιων δεικτών ωρίμανσης των DCs (Πίνακας 3.5).

%	CD40L - APC	CD80 - FITC			CD86 - FITC			CD11c - PE	
MOI	100	100	200	500	100	200	500	200	500
RAd-lacZ	1,4	2,54	1,1	1,08	5,55	1,45	3	1,44	0,44
Rad-mCD40L	69,07	15,27	-	-	11,73	-	-	-	-
RAd-stmCD40L	42,03	20,09	11,13	7,47	12,88	16,91	10,92	6,96	3,86

Πίνακας 3.5: Ανάλυση FACS 72hrs μετά τη μεταγωγή (transduction) των ανώριμων DCs. (CD80 και CD86: δείκτες ωρίμανσης των DCs. CD11c: γενικότερος δείκτης των ανώριμων και ώριμων DCs)

Από τον Πίνακα 3.5, συγκρίνοντας τα διαφορετικά MOI με τα οποία έγινε η μεταγωγή, φαίνεται ότι το MOI-500 παρουσιάζει τη μικρότερη έκφραση των δεικτών CD80, CD86, CD11c και συγκρίνοντας τον mCD40L με τον stmCD40L στο MOI-100, φαίνεται ότι ο stmCD40L παρουσιάζει κάπως μεγαλύτερη έκφραση των δεικτών CD80 και CD86.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης hCD40L μετά από χρήση λιποσωμάτων.

Μετά τη χρησιμοποίηση διάφορων λιποσωμάτων που έφεραν πλασμίδιο έκφρασης του hCD40L, τα αποτελέσματα ήταν αποθαρρυντικά ως προς την έκφραση του CD40L σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι η χρήση λιποσωμάτων ως στρατηγική θεραπείας είναι λάθος. Αντιθέτως εάν με κάποιο τρόπο επιτευχθεί η αποτελεσματική εισαγωγή του πλασμιδίου στα κύτταρα μέσω λιποσωμάτων, πιθανώς να αποτελεί μία από τις καλύτερες μεθόδους μεταφοράς θεραπευτικών ουσιών, καθώς θα μπορούμε να χορηγήσουμε λιποσώματα σε ασθενείς χωρίς την παραμικρή πιθανότητα εμφάνισης παρενεργειών και ανεπιθύμητης ανοσολογικής απόκρισης, αφού τα λιποσώματα έχουν μία καθαρά λιπιδική σύσταση παρόμοια με αυτήν των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα κατασκευής λιποσωμάτων που θα φέρουν στη μεμβράνη τους ειδικά μόρια, τα οποία θα μπορούν να αναγνωρίζονται ειδικά από τους υποδοχείς των κυττάρων που θέλουμε να στοχεύσουμε, επιτυγχάνοντας έτσι αποτελεσματικότερη θεραπεία, μεταφέροντας τη θεραπευτική ουσία τοπικά στην πηγή του προβλήματος. Τέλος, χρησιμοποιώντας το χημειοθεραπευτικό 5-FU παράλληλα με τα λιποσώματα, παρατηρήθηκε σημαντική (αλλά όχι αξιοποιήσιμη) βελτίωση έκφρασης του CD40L στην περίπτωση ενός συγκεκριμένου λιποσώματος. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι έχει βρεθεί στο παρελθόν ότι το 5-FU βελτιώνει σημαντικά τη μεταφορά αδενοϊών σε κύτταρα μέσω λιποσωμάτων, προκαλώντας μορφολογικές αλλαγές στις λιπιδικές μεμβράνες⁶⁹. Η εύρεση αυτή είναι αρκετά υποσχόμενη, καθώς δείχνει ότι το 5-FU μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία των κυττάρων σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους, κάτι το οποίο μπορεί να φανεί αρκετά χρήσιμο στη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών σε αυτά.

4.2 Μελέτη της επίδρασης της καταστολής (knock-down) του αντι-αποπτωτικού σηματοδοτικού μορίου Akt, με χρήση Akt antisense in-vitro.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την καταστολή (knock down) του αντι-αποπτωτικού σηματοδοτικού μορίου Akt, μέσω της χρήσης Akt1 antisense, ήταν αρκετά ενθαρρυντικά, καθώς υπήρχε πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Akt1 και σημαντική μείωση της κυτταρικής επιβίωσης στα EJ (human bladder) καρκινικά κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι η καταστολή του Akt ίσως αποτελεί μία επιπλέον αξιόπιστη επιλογή που θα μπορούσε να συνδυαστεί με τη χρήση του CD40L και/ή κάποιων χημειοθεραπευτικών στα πλαίσια μίας αντικαρκινικής συνδυαστικής θεραπείας. Η άποψη αυτή ενισχύεται από ήδη υπάρχουσες μελέτες, που δείχνουν ότι το Akt είναι μονίμως ενεργοποιημένο σε πλήθος ανθρώπινων καρκίνων και η καταστολή του μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή προκαλεί την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα τόσο in vitro όσο και in vivo. Επίσης, οι μελέτες αυτές προτείνουν ότι σε συνδυαστικές θεραπείες η καταστολή του Akt θα μπορούσε να μειώσει τις απαιτούμενες δόσεις των άλλων φαρμάκων, μειώνοντας τις παρενέργειες και θα μπορούσε επίσης να υπερπηδήσει το εμπόδιο της ανοχής που υπάρχει σε ορισμένα φάρμακα, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τέλος, έχουν αναπτυχθεί ήδη κάποιες ουσίες που αναστέλλουν το Akt και βρίσκονται στη φάση I ή II κλινικών δοκιμών.

4.3 Μελέτη της άμεσης επίδρασης των mCD40L και stmCD40L σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά στον κυτταρικό θάνατο in vitro.

Μετά από μεταγωγή (transduction) των αδenoϊών που εκφράζουν είτε mCD40L είτε stmCD40L σε καρκινικά κύτταρα B16-F10 mCD40 (mouse melanoma), μελετήθηκε η επίδρασή τους στον κυτταρικό θάνατο. Όσον αφορά το μεμβρανικό mCD40L, το MTT-assay έδειξε ότι παρουσία του χημειοθεραπευτικού LY294002 δεν υπήρχε κάποια επιπλέον επίδραση, ενώ παρουσία του 5-FU υπήρχε μαζικός κυτταρικός θάνατος που ήταν ανεξάρτητος του mCD40L (Εικόνα 3.3). Αντίθετα όμως, στο συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό cisplatin, τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά, καθώς ήδη στη συγκέντρωση των 5μM προκαλούσε σαφώς περισσότερο κυτταρικό θάνατο, χωρίς αυτός να αυξάνεται ιδιαίτερα στη συγκέντρωση των 10μM. Επιπλέον, τα αποτελέσματα

ήταν σχεδόν ίδια τόσο στο MOI-500, όσο και στο MOI-2000, καθώς στο MOI-2000 ο κυτταρικός θάνατος αυξήθηκε απειροελάχιστα.

Στη συνέχεια, με την πραγματοποίηση εξειδικευμένης ELISA εξετάστηκε ο βαθμός συμμετοχής της απόπτωσης, στον κυτταρικό θάνατο που ανιχνεύτηκε αρχικά με MTT-assay (Εικόνα 3.4). Από την ELISA φάνηκε μία αύξηση της απόπτωσης στο MOI-500 σε συνδυασμό με 5μM cisplatin, η οποία όμως έπεφτε μετά από αύξηση του cisplatin στα 10μM. Στο MOI-2000 όμως, παρόλο που ο κυτταρικός θάνατος είναι σαφώς εντονότερος σε συνδυασμό με cisplatin από ότι μόνο με mCD40L, η απόπτωση δεν είναι. Αυτά τα φαινομενικά παράδοξα αποτελέσματα, θα μπορούσαν πιθανώς να εξηγηθούν με τη θεωρία ότι υπάρχει μία δυναμική ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων του CD40L και του χημειοθεραπευτικού, που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, είτε μέσω απόπτωσης, είτε μέσω νέκρωσης. Άρα, θα πρέπει να υπάρχει ένας ιδανικός συνδυασμός μεταξύ των δύο, που να οδηγεί στο μέγιστο δυνατό κυτταρικό θάνατο, κυρίως μέσω της απόπτωσης, αποφεύγοντας έτσι τις αρνητικές συνέπειες της νέκρωσης. Οπότε με βάση τα παραπάνω, ο συνδυασμός του RAd-mCD40L (MOI-500) μαζί με 5μM cisplatin έχει το καλύτερο επιθυμητό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά τώρα τον εκκρινόμενο τριμερή stmCD40L (Εικόνα 3.5), το MTT-assay στο MOI-500 ήταν αρκετά παρόμοιο με αυτό του mCD40L στο MOI-2000, με τη διαφορά ότι εδώ ο συνδυασμός με 10μM LY294002 προκαλούσε πλέον αρκετά ικανοποιητικό κυτταρικό θάνατο. Καθώς όμως το MOI αυξήθηκε στα 2000, ο κυτταρικός θάνατος αυξήθηκε εμφανέστατα στο σύνολο των περιπτώσεων, ακόμη και με τον stmCD40L μόνο του, πράγμα που δείχνει ότι η κύρια αιτία ήταν η αύξηση του stmCD40L και όχι τόσο κάποιος συνδυασμός με χημειοθεραπευτικό. Τέλος, ιδιαίτερα αξιοπρόσεκτη ήταν η επίδραση του stmCD40L σε συνδυασμό με 5μM και ακόμη περισσότερο με 10μM LY294002, ειδικά αν προσέξουμε ότι το LY294002 από μόνο του δεν προκαλούσε καθόλου κυτταρικό θάνατο. Βέβαια η πραγματοποίηση ειδικής για την ανίχνευση απόπτωσης ELISA, θα βοηθούσε καλύτερα στην κατανόηση αυτών των γεγονότων. Έτσι, συνολικά από όλα τα παραπάνω, την καλύτερη επίδραση στον κυτταρικό θάνατο φαίνεται να έχει ο εκκρινόμενος τριμερής stmCD40L στο MOI-2000, σε συνδυασμό με 10μM LY294002 ή με 5μM cisplatin.

Από όλα τα παραπάνω *in vitro* πειράματα, και μετά από βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων μετά από περισσότερες επαναλήψεις, καταλήγοντας έτσι σε κάποιο ή κάποιους ιδανικούς θεραπευτικούς συνδυασμούς, θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω η αντικαρκινική δράση των συνδυασμών αυτών *in vivo*. Συγκεκριμένα, θα μπορούσαμε να

ενέσουμε καρκινικά κύτταρα με ή χωρίς τον υποδοχέα CD40 (B16-F10mCD40 ή B16-F10) σε ποντίκια. Η ένεση θα μπορούσε να γίνει είτε υποδόρια προκαλώντας υποδόριους όγκους, είτε και ενδοφλεβίως προκαλώντας ταυτόχρονα μεταστάσεις. Στη συνέχεια, η θεραπεία θα μπορούσε να αποτελείται είτε από άμεση έγχυση των ανασυνδυασμένων αδενοϊών (RAd-mCD40L, RAd-stmCD40L) τοπικά στον όγκο (intratumoral), είτε από έγχυση αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (B16-F10mCD40 ή B16-F10) μετά από ex vivo μόλυνσή τους με τους προαναφερθέντες αδενοϊούς (RAd-mCD40L, RAd-stmCD40L), με ή χωρίς χημειοθεραπευτικά. Τέλος, μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα θα γινόταν αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των παραπάνω θεραπευτικών συνδυασμών και της προσφοράς τους στη γενικότερη επιβίωση των ποντικών.

4.4 Ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DC maturation)

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με FACS που έγινε μετά από μεταγωγή (transduction) των αδενοϊών RAd-mCD40L και RAd-stmCD40L σε ανώριμα DCs (Πίνακας 3.5), φάνηκε ότι στο υψηλότερο MOI-500 υπήρχε χαμηλότερη έκφραση των δεικτών, υποδηλώνοντας ίσως κάποια τοξικότητα της υψηλής συγκέντρωσης ιού, καθώς τα DCs χαρακτηρίζονται για την ευαισθησία τους. Επιπλέον, φαίνεται ότι ο εκκρινόμενος τριμερής stmCD40L προκαλεί κάπως καλύτερη ωρίμανση των DCs σε σχέση με το μεμβρανικό mCD40L, κάτι που συμφωνεί και με τα προηγούμενα αποτελέσματα που αναλύθηκαν στην παραπάνω ενότητα. Σκοπός της μεταγωγής (transduction) των αδενοϊών στα DCs in vitro, ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας των αδενοϊών να μολύνουν αλλά και ενεργοποιήσουν τα DCs, έτσι ώστε στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν σε in vivo πειράματα. Συγκεκριμένα, το γενικότερο πλάνο του in vivo πειράματος είναι ίδιο με αυτό που αναλύθηκε λεπτομερώς στην παραπάνω ενότητα, με τη διαφορά ότι ως θεραπεία θα μολύνονταν ex vivo ανώριμα DCs με τους αδενοϊούς RAd-mCD40L ή RAd-stmCD40L και στη συνέχεια θα εγχέονταν τοπικά στον όγκο (intratumoral). Η χρησιμοποίηση των DCs θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την απαιτούμενη δόση του αδενοϊού που εκφράζει mCD40L ή stmCD40L, καθώς τα DCs έχουν μείζον ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση και είναι ικανά να προκαλέσουν πλήθος ανοσολογικών αποκρίσεων καθώς και να αυξήσουν τοπικά την έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών, γεγονότα που μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην καταπολέμηση του όγκου. Έτσι, με αυτό τον τρόπο μπορούμε να

εκμεταλλευτούμε εκτός από την άμεση αντικαρκινική δράση του CD40L, και την έμμεση, μέσω δηλαδή του ανοσοποιητικού συστήματος.

4.5 Συμπέρασμα

Η μεγάλη εύρους έκφραση του CD40L, τόσο σε κανονικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα σε πλήθος ιστών, κάνει εμφανές το πόσο σημαντικός είναι ο ρόλος του σε ποικίλες κυτταρικές και ανοσολογικές διαδικασίες. Η κατανόηση του CD40 σηματοδοτικού μονοπατιού, σε χυμικό και κυτταρικό επίπεδο, θα οδηγήσει σημαντικά στη βελτίωση των θεραπειών για την καταπολέμηση του καρκίνου. Ωστόσο, παρά την αποτελεσματική απόκριση των όγκων σε CD40 αγωνιστές όπως έχει φανεί σε κάποιες αρχικές κλινικές μελέτες, η χρόνια εμπειρία από την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων έχει δείξει ότι για τη μέγιστη κλινική αποτελεσματικότητα απαιτείται συνδυασμός παραγόντων, που θα επιτίθενται στα καρκινικά κύτταρα σε πολλαπλά επίπεδα. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι χημειοθεραπευτικά, αντικαρκινικά εμβόλια, TLR αγωνιστές και άλλοι TNFR αγωνιστές. Έτσι, το CD40 μονοπάτι παρέχει μια επιπλέον επιλογή στη θεραπεία κατά του καρκίνου, όπου σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, αποτελεί μία ελκυστική επιλογή για μελλοντικές κλινικές μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*. 2000 Jan;67(1):2-17.
2. Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Jun;83(12):4494-8.
3. Eliopoulos AG, Young LS. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2004 Aug;4(4):360-7.
4. Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Oct 23;98(22):12614-9.
5. Fanslow WC, Srinivasan S, Paxton R, Gibson MG, Spriggs MK, Armitage RJ. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Seminars in immunology*. 1994 Oct;6(5):267-78.
6. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jan;58(1):4-43.
7. Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004 Jun 16;43(12):2319-25.
8. Lee WI, Torgerson TR, Schumacher MJ, Yel L, Zhu Q, Ochs HD. Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1881-90.
9. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1997 Jul;131(1 Pt 1):47-54.
10. Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, et al. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Feb 5;99(3):1497-502.
11. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology*. 1994;12:881-922.
12. Barrett TB, Shu G, Clark EA. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol*. 1991 Mar 15;146(6):1722-9.
13. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *The Journal of experimental medicine*. 1990 Dec 1;172(6):1861-4.
14. Foy TM, Durie FH, Noelle RJ. The expansive role of CD40 and its ligand, gp39, in immunity. *Seminars in immunology*. 1994 Oct;6(5):259-66.
15. Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *The Journal of experimental medicine*. 1994 Jul 1;180(1):157-63.
16. Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Nov 1;178(5):1567-75.

17. D'Orlando O, Gri G, Cattaruzzi G, et al. Outside inside signalling in CD40-mediated B cell activation. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2007;21(3-4):49-62.
18. Agarwal A, Newell KA. The role of positive costimulatory molecules in transplantation and tolerance. *Current opinion in organ transplantation*. 2008 Aug;13(4):366-72.
19. Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1083-8.
20. Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity*. 2004 Sep-Nov;37(6-7):457-64.
21. Dallman C, Johnson PW, Packham G. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis*. 2003 Jan;8(1):45-53.
22. Choi MS, Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB, Klaus GG. The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *European journal of immunology*. 1995 May;25(5):1352-7.
23. Sarma V, Lin Z, Clark L, et al. Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1995 May 26;270(21):12343-6.
24. Zhang X, Li L, Choe J, et al. Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cellular immunology*. 1996 Oct 10;173(1):149-54.
25. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Aug 3;96(16):9136-41.
26. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 May 1;97(9):2777-83.
27. Wingett DG, Vestal RE, Forcier K, Hadjokas N, Nielson CP. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast cancer research and treatment*. 1998 Jul;50(1):27-36.
28. Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos AG, Hubscher SG, Young LS, Adams DH. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Jan 18;189(2):441-6.
29. Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, et al. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *The EMBO journal*. 1999 Jun 1;18(11):3034-43.
30. Eliopoulos AG, Davies C, Knox PG, et al. CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Molecular and cellular biology*. 2000 Aug;20(15):5503-15.
31. Tong AW, Papayoti MH, Netto G, et al. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):691-703.
32. Harnett MM. CD40: a growing cytoplasmic tale. *Sci STKE*. 2004 Jun 15;2004(237):pe25.

33. Ishida T, Kobayashi N, Tojo T, Ishida S, Yamamoto T, Inoue J. CD40 signaling-mediated induction of Bcl-XL, Cdk4, and Cdk6. Implication of their cooperation in selective B cell growth. *J Immunol*. 1995 Dec 15;155(12):5527-35.
34. Han H, Nomura T, Honjo T, Tsubata T. Differential modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by negative signaling via the antigen receptor of B cells and positive signaling via CD40. *European journal of immunology*. 1996 Oct;26(10):2425-32.
35. Zhu N, Ramirez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA, Gold MR. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):744-54.
36. Schauer SL, Wang Z, Sonenshein GE, Rothstein TL. Maintenance of nuclear factor-kappa B/Rel and c-myc expression during CD40 ligand rescue of WEHI 231 early B cells from receptor-mediated apoptosis through modulation of I kappa B proteins. *J Immunol*. 1996 Jul 1;157(1):81-6.
37. Galibert L, Burdin N, de Saint-Vis B, et al. CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Jan 1;183(1):77-85.
38. Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood*. 1997 Feb 15;89(4):1299-307.
39. Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, et al. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *The Journal of experimental medicine*. 1997 Jun 16;185(12):2053-60.
40. Baxendale AJ, Dawson CW, Stewart SE, et al. Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene*. 2005 Nov 24;24(53):7913-23.
41. Berner V, Liu H, Zhou Q, et al. IFN-gamma mediates CD4+ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nature medicine*. 2007 Mar;13(3):354-60.
42. Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2000 Jul;32(7):687-93.
43. Tan J, Town T, Mori T, et al. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *The EMBO journal*. 2002 Feb 15;21(4):643-52.
44. Young LS, Dawson CW, Brown KW, Rickinson AB. Identification of a human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes. *International journal of cancer*. 1989 May 15;43(5):786-94.
45. Cooke PW, James ND, Ganesan R, Wallace M, Burton A, Young LS. CD40 expression in bladder cancer. *The Journal of pathology*. 1999 May;188(1):38-43.
46. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, Pfister H, Hess S. CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):4140-7.
47. Gallagher NJ, Eliopoulos AG, Agathangelou A, Oates J, Crocker J, Young LS. CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol*. 2002 Apr;55(2):110-20.
48. Agathangelou A, Niedobitek G, Chen R, Nicholls J, Yin W, Young LS. Expression of immune regulatory molecules in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas with prominent lymphoid stroma. Evidence for a functional interaction between epithelial tumor cells and infiltrating lymphoid cells. *The American journal of pathology*. 1995 Oct;147(4):1152-60.

49. Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Feb 19;193(4):447-58.
50. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, et al. A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity*. 2002 Jan;16(1):37-50.
51. Challa A, Eliopoulos AG, Holder MJ, et al. Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylke Burkitt lymphoma cells. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3411-8.
52. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2200-6.
53. Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Robillard N, Wijdenes J, Bataille R. CD11a-CD18 and CD102 interactions mediate human myeloma cell growth arrest induced by CD40 stimulation. *Cancer research*. 1996 Apr 15;56(8):1909-16.
54. Funakoshi S, Longo DL, Beckwith M, et al. Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood*. 1994 May 15;83(10):2787-94.
55. Hess S, Engelmann H. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Jan 1;183(1):159-67.
56. Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, et al. CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator. *Oncogene*. 1996 Nov 21;13(10):2243-54.
57. Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer gene therapy*. 2003 Jan;10(1):1-13.
58. Mackey MF, Gunn JR, Ting PP, et al. Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154. *Cancer research*. 1997 Jul 1;57(13):2569-74.
59. French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nature medicine*. 1999 May;5(5):548-53.
60. Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP, et al. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nature medicine*. 1999 Jul;5(7):774-9.
61. Sotomayor EM, Borrello I, Tubb E, et al. Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. *Nature medicine*. 1999 Jul;5(7):780-7.
62. van Mierlo GJ, den Boer AT, Medema JP, et al. CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Apr 16;99(8):5561-6.
63. Kedl RM, Jordan M, Potter T, Kappler J, Marrack P, Dow S. CD40 stimulation accelerates deletion of tumor-specific CD8(+) T cells in the absence of tumor-antigen vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Sep 11;98(19):10811-6.
64. Ahonen CL, Wasiuk A, Fuse S, et al. Enhanced efficacy and reduced toxicity of multifactorial adjuvants compared with unitary adjuvants as cancer vaccines. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3116-25.
65. Grossmann ME, Brown MP, Brenner MK. Antitumor responses induced by transgenic expression of CD40 ligand. *Human gene therapy*. 1997 Nov 1;8(16):1935-43.

66. Ribas A, Butterfield LH, Amarnani SN, et al. CD40 cross-linking bypasses the absolute requirement for CD4 T cells during immunization with melanoma antigen gene-modified dendritic cells. *Cancer research*. 2001 Dec 15;61(24):8787-93.
67. Kikuchi T, Crystal RG. Anti-tumor immunity induced by in vivo adenovirus vector-mediated expression of CD40 ligand in tumor cells. *Human gene therapy*. 1999 May 20;10(8):1375-87.
68. Kikuchi T, Moore MA, Crystal RG. Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):91-9.
69. Cabrele C, Vogel M, Piso P, et al. 5-Fluorouracil-related enhancement of adenoviral infection is Coxsackievirus-adenovirus receptor independent and associated with morphological changes in lipid membranes. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 28;12(32):5168-74.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (1lt)

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.44 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr

Adjust pH to 7.4 with HCl

Tris-Buffered-Saline (TBS) 10x (1lt)

Tris base	24.2 gr
NaCl	80 gr

Adjust pH to 7.4 with HCl

SDS Electrophoresis Buffer 5x (1lt)

Tris base	15.1 gr
Glycine	72.0 gr
SDS	5.0 gr

Transfer buffer 1x (1lt)

Tris base	3.94 gr
Glycine	15 gr
Methanol	200 ml

R10 medium (for DCs) (100ml)

RPMi 1640	97.7 ml
1% Pen/Strep	200 µl (500x)
0.1% Sodium pyruvate	1 ml (100x)
1% MEM	1 ml (100x)
1% β-mercapto-ethanol	100 µl (1000x)

Cell lysis buffer A (RIP) (250ml)

Tris base 1M pH 7.5	5 ml
NaCl 5M	7.5 ml
Triton X-100 100%	2.5 ml
EDTA 0.5M	0.5 ml

Protein Gel Sample Buffer

Tris base 1M	1 ml
SDS 10% (w/v)	8 ml
Glycerol	2 ml
B-mercaptoethanol	1 ml
Bromophenol blue	0.001 gr

Staining

Coomasie blue R-250 0,2%
in slow destaining buffer

Destaining (Fast/Slow)

Methanol	50% / 10%
Acetic Acid	10% / 10%
ddH ₂ O	40% / 80%