

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (IMBB)**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ
ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΤΩΝ
ΒΛΕΝΝΙΝΩΝ »**

ΜΠΑΡΙΤΑΚΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δρ. ΗΛΙΑΣ ΚΡΑΜΠΟΒΙΤΗΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1998

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήταν πολύ λίγο σε όλα εκείνα τα άτομα που στάθηκαν δίπλα μου προσφέροντάς μου την ηθική, φιλική, πνευματική αλλά και υλική συμπαράστασή τους. Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη χρωστώ στους δασκάλους μου Ηλία Κραμποβίτη και Αλέξη Ζαφειρόπουλο που πρώτοι με μύησαν στον αχανή κόσμο της Κυτταρικής Ανοσολογίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την τεχνικό Φανή Ανδρουλάκη για όλη την τεχνική βοήθεια που μου προσέφερε στο επίπονο πρόγραμμα των πειραμάτων μου, αλλά και όλους τους υπόλοιπους συνεργάτες μου όπως τη Χαρούλα Βλατά και τη Μαρία Σιουμπάρα.

Βαθύτατα υποχρεωμένη αισθάνομαι απέναντι στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Καρκίνου της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Κρήτης και ιδιαίτερα στην τεχνικό Αμαλία Ζαριανάκη για την προσφορά όλων των καρκινικών ιστών που χρησιμοποίησα και για την παροχή των τεχνικών της γνώσεων σε θέματα Ανοσοϊστοχημείας. Την ίδια εκτίμηση οφείλω και στον ειδικευόμενο Παθολογοανατόμο κ. Βίκτωρα Χανιώτη του ΠΕ.ΠΑ.ΓΝΗ για την ειδική επιστημονική εκτίμηση που έκανε στις χρώσεις μου και για την επιμέλεια της φωτογράφισης των τομών.

Τέλος ευχαριστώ το Ίδρυμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) για τη χρηματική μου υποστήριξη και πάνω απ' όλους τους γονείς μου και το σύντροφό μου για την αμέριστη ενθάρρυνση και συμπαράσταση που μου παρείχαν όλον αυτό τον καιρό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	I
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	II
ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ABSTRACT	IV
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Ανοσιακό σύστημα	1
1.1. Οντογένεση λεμφοκυτταρικού συστήματος	2
2. Χαρακτηριστικά λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών	3
2.1. T-κύτταρα	3
2.1.1. Επιλογή	5
2.1.2. Εξαγωγή στην περιφέρεια. Υποπληθυσμοί CD4+ λεμφοκυττάρων	6
2.1.3. Διαφοροποίηση TH σε TH1 και TH2	9
2.2. B κύτταρα	12
2.2.1. Ωρίμανση B λεμφοκυττάρων	12
2.2.2. Ωρίμανση συγγένειας (Affinity maturation), Αλληλομορφικός αποκλεισμός (Allelic exclusion)	14
2.2.3. Γένεση Ποικιλομορφίας Ανοσοσφαιρινών	16
2.2.4. Ενεργοποίηση B κυττάρων	18
2.2.4.1. Θυμο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση	18
2.2.4.2. Θυμο-ανεξάρτητη ενεργοποίηση B κυττάρων	22
2.2.5. Απόπτωση B κυττάρων	23
3. Παραγωγή αντι-αδενοκαρκινικών μονοκλωνικών αντισωμάτων	24
3.1. <i>Βλεννίνες</i>	24
3.2. <i>In vitro ανθρώπινη αντιγυνο-ειδική ανοσοποίηση</i>	28
ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	33
1. Κυτταρικές σειρές και θρεπτικά μέσα καλλιέργειας	33
2. Αντιγόνα	34
3. Αντισώματα	34
4. LLO-Me κατεργασία PBMC-Καθαρισμός Μφ	35
5. Επιλογή Τετανο-ειδικών δοτών	35
6. Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων	36
7. Πρωτογενής Ανοσοποίηση	36

8.	Δευτερογενής Ανοσοποίηση	36
9.	Συμπύκνωση ανοσοσφαιρινών	37
9.1.	Καθίζηση με θειικό αμμώνιο (NH_4SO_4)	37
9.2.	Συμπύκνωση μέσω διηθητικής μεμβράνης	37
10.	Καθαρισμός ανοσοσφαιρινών (IgG)	38
11.	ELISA	38
12.	FACs analysis	39
13.	Ανοσοϊστοχημεία	40
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
1.	Αξιολόγηση Δοτών	41
2.	Ενεργοποίηση T κυττάρων	43
3.	Πρωτογενής ανοσοποίηση	43
4.	Δευτερογενής ανοσοποίηση	45
4.1.	EBV μετασχηματισμός B κυττάρων	46
4.2.	Ανίχνευση ειδικών IgM και IgG ανοσοσφαιρινών κατά τη δευτερογενή ανοσοποίηση μετά το EBV	46
5.	Έλεγχος ειδικότητας των παραγόμενων IgG αντισωμάτων	58
5.1.	α -Muc3 αντίσωμα	58
5.2.	Πολύ-ειδικά (Polyspecific) αντισώματα	66
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

Abstract

The aim of this project was to answer to the question if it is possible to create an *in vitro* culture system of human B lymphocytes that will be able to react with “self antigens” producing IgG antibodies with high specificity and affinity for the antigen. We are trying to mimic, with the best way, the array of events which occurs inside the Germinal Centers during a natural humoral response. These events concern mainly the direct contact and interaction between the specific B and T cells which signal the isotype switch and the induction of somatic mutations to Ig genes inducing their affinity maturation.

The selected B cell antigen epitopes come, within synthetic procedures, from the well characterized VNTR regions of human mucins. These molecules show high levels of glycosylation and they are normally expressed in the mucus epithelium of many tissues such as the intestine. Sometimes, many types of cancer cells from adeno-carcinomas are characterized by an increased number of these mucins with different or absent glycosylation. Thus, the exposure of their protein skeleton in the surface of cancer cells, due to defective glycosylation, make these regions good targets for immunotherapy.

This approach, with the *in vitro* immunization system, showed production of a specific antibody against the Muc3 peptide with low density. This IgG antibody, was tested by ELISA assay and FACs analysis and showed a great specific inhibition with the soluble Muc3 peptide, and a specific intracellular binding on intestinal cancer cell lines, respectively. It was also tested on formalin-fixed tissue sections from adeno-carcinomas samples, by immunoperoxidase staining, where was found specific dim binding reaction only on malignant intestinal sections.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Βασικός στόχος αυτής της διατριβής ήταν μία απάντηση στο εάν μπορεί να στηθεί ένα *in vitro* σύστημα καλλιέργειας ανθρώπινων Β λεμφοκυττάρων ικανών να απαντούν σε αντιγόνα 'εαυτού' με την παραγωγή αντισωμάτων IgG ισοτύπου, υψηλής ειδικότητας και συγγένειας προς το αντιγόνο. Το σύστημα προσπαθήσαμε να το προσομοιάσουμε, κατά το βέλτιστο δυνατό τρόπο, με τη σειρά των γεγονότων που επιτελούνται μέσα στα βλαστικά κέντρα (Germinal centers) των δευτερογενών λεμφικών οργάνων κατά τη διάρκεια μιας φυσιολογικής χυμικής ανοσιακής απάντησης. Τα γεγονότα αυτά αφορούν κυρίως την άμεση επαφή και αλληλεπίδραση των ειδικών Β και Τ κυττάρων που σηματοδοτούν την αλλαγή ισοτύπου και την επαγωγή σωματικών μεταλλαγών στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, προκαλώντας αύξηση της συγγένειας πρόσδεσής τους στα αντιγόνα (affinity maturation).

Οι επιλεγμένοι για την ανοσοποίηση Β αντιγονικοί επίτοποι προήλθαν, μέσα από συνθετικές διαδικασίες, από τις καλά μέχρι σήμερα χαρακτηρισμένες VNTR περιοχές των ανθρώπινων βλεννινών. Αν και η εμφάνιση αυτών των μορίων θεωρείται φυσιολογική στα βλεννώδη επιθήλια πολλών ιστών (self antigens) όπως για παράδειγμα του εντέρου, σε πολλούς τύπους αδενοκαρκινωμάτων έχει σημειωθεί αύξηση της έκφρασής τους με παράλληλη αλλαγή, τροποποίηση ή ακόμα και απουσία της γλυκοζυλίωσής τους. Ως εκ τούτου, η έκθεση του πρωτεϊνικού σκελετού αυτών των μορίων, ως αποτέλεσμα της ελαττωματικής τους γλυκοζυλίωσης, τα κάνει αρκετά ευάλωτους στόχους για ανοσοθεραπεία.

Η προσέγγιση αυτού του θέματος, μέσω του *in vitro* συστήματος ανοσοποίησης, έδωσε με χαμηλή, αλλά όχι αμελητέα συχνότητα, ειδικό αντίσωμα εναντίον του Muc3 πεπτιδίου. Το αντίσωμα αυτό, IgG ισοτύπου, ανέστειλε ειδικά το αντίστοιχο διαλυτό αντιγόνο, έδειξε με FACs ανάλυση ειδική ενδοκυτταρική χρώση σε καρκινικές σειρές παχέως εντέρου που εκφράζουν το παραπάνω πεπτίδιο, καθώς επίσης παρουσίασε και ασθενική αλλά ειδική πρόσδεση σε αντίστοιχα δείγματα καρκινικών ιστών (formalin fixed sections) χρησιμοποιώντας ανοσοιστοχημικές μεθόδους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανοσιακό σύστημα

Η παρουσία εξειδικευμένου συστήματος άμυνας για τη φυσική προστασία του οργανισμού από τους εξωτερικούς μολυσματογόνους παράγοντες, είναι χαρακτηριστικό όλων των σπονδυλωτών. Όσο το ζώο ανέρχεται στη ζωολογική κλίμακα τόσο το σύστημα εμφανίζεται περισσότερο πολύπλοκο με μηχανισμούς ιδιαίτερα ευαίσθητους στα περιβαλλοντικά βλαβερά ερεθίσματα και με ικανότητα μεγαλύτερης εξειδίκευσης απέναντι στα αίτια ενεργοποίησής του. Εξελικτικά λοιπόν έχουμε φτάσει στη δημιουργία και την παρουσία ενός πλήρους ανοσιακού συστήματος στον άνθρωπο και τα ανώτερα θηλαστικά με ιδιότητες “μνήμης” και “μάθησης” που τα καθιστά ικανά να αναγνωρίζουν, εξουδετερώνουν και απομακρύνουν κάθε ουσία –εξωγενούς ή ενδογενούς προελεύσεως- που χαρακτηρίζεται “ξένη” προς αυτά. Το σύνολο των μηχανισμών εκείνων που εξασφαλίζουν τα παραπάνω καλείται ανοσία.

Τα ερεθίσματα που αναγνωρίζονται από το ανοσιακό σύστημα ως “ξένα”, προκαλούν την ενεργοποίησή του, η οποία εκδηλώνεται με μία σειρά φαινομένων που αποτελούν τη μη ειδική και την ειδική ανοσιακή απάντηση. Η πρώτη εκδηλώνεται κυρίως με κινητοποίηση φαγοκυτταρικών στοιχείων ενώ η δεύτερη – ιδιαίτερα ειδική – χαρακτηρίζεται από μία σειρά χημικών και κυτταρικών φαινομένων που τη διαχωρίζουν σε χυμική και κυτταρική ανοσιακή απάντηση αντίστοιχα. Τόσο η χυμική, όσο και η κυτταρική ανοσιακή απάντηση ασκούνται από ένα εξειδικευμένο σύστημα το λεμφικό, με την παραγωγή ειδικών κυτταρικών προϊόντων, όπως αντισώματα, λεμφοκίνες και χυμοκίνες στην πρώτη περίπτωση και ευαισθητοποιημένων κυττάρων στη δεύτερη.

Η άριστη οργάνωση του λεμφικού συστήματος με την έντονα αναπτυγμένη ειδικότητα και μνήμη απαιτεί ετερογένεια, τόσο στους συστατικούς του πληθυσμούς κυττάρων όσο και στα σημεία προέλευσης και τα επί μέρους στάδια διαφοροποίησής τους. Τα κύτταρα τα οποία λαμβάνουν μέρος στην ανοσιακή απάντηση είναι τα λεμφοκύτταρα (B και T), αλλά σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος των μακροφάγων (Mφ) και άλλων συνοδευτικών κυττάρων όπως των ‘killers’ (K) και ‘Natural killers’ (NK) κυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα όπως και τα άλλα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα πολυδύναμο μητρικό

κύτταρο (stem cell). Τα μητρικά κύτταρα υφίστανται σειρά διαφοροποιήσεων και ανάλογα με το μικροπεριβάλλον που έγινε η διαφοροποίηση μετατρέπονται σε T ή B λεμφοκύτταρα. Το μικροπεριβάλλον αυτό απαντά στα λεμφοεπιθηλιακά πρωτογενή όργανα (μυελός οστών, θύμος αδένας) και στις διαφορετικές μοίρες (θυμο-εξαρτώμενες και θυμο-ανεξάρτητες περιοχές) των δευτερογενών λεμφικών οργάνων (λεμφοζήδια, λεμφαδένες και σπλήνα) στα θηλαστικά. Η σχέση των παραπάνω οργάνων είναι στενή και άρρηκτη δεδομένου του γεγονότος ότι τα δεύτερα εφοδιάζονται από τα πρώτα με τα προϊόντα διαφοροποίησης του πολυδύναμου μητρικού κυττάρου προκειμένου να επιτελέσουν την τελική ωρίμανση και πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων παρουσία αντιγόνου (Ag), καθώς και τη διοχέτευσή τους στο αίμα.

Έτσι μπορούμε να πούμε ότι μόνο τα δευτερογενή όργανα συμμετέχουν άμεσα στην εκδήλωση της ανοσιακής απάντησης, ενώ ο ρόλος των πρωτογενών συνίσταται στην έμμεση τροφοδοσία του ανοσιακού συστήματος με ώριμα, μη ενεργά (naïve) κύτταρα.

1.1. Οντογένεση λεμφοκυτταρικού συστήματος

Περιγράφοντας συνοπτικά την οντογένεση των λεμφοκυττάρων ξεκινάμε με την παρουσία του πολυδύναμου μητρικού κυττάρου (stem cell) στο λεκιθικό σάκο κατά τη 2^η με 3^η εβδομάδα της κύησης. Την 6^η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής πραγματοποιείται διαφοροποίηση του παραπάνω κυττάρου σε κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς και μετανάστευση αυτών στο ήπαρ όπου και παραμένουν μέχρι το τέλος της κύησης. Η τελική μεταφορά και εγκατάστασή τους στο μυελό των οστών παρατηρείται μετεμβρυικά και το σημείο αυτό γίνεται η περιοχή προμήθειας όλων των πρόδρομων κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος. Ειδικά για τα λεμφοκύτταρα κάποιοι από τους παραπάνω κυτταρικούς πληθυσμούς - κάτω από την επίδραση τοπικών παραγόντων - διαφοροποιούνται επιπλέον σε δεσμευμένα για το B λεμφοκυτταρικό σύστημα προγονικά κύτταρα (προ-B κύτταρα) και σε δεσμευμένα για το T λεμφοκυτταρικό σύστημα προγονικά κύτταρα (προ-θυμοκύτταρα). Τα προγονικά αυτά κύτταρα ανάλογα με το μονοπάτι στο οποίο έχουν δεσμευτεί διοχετεύονται στο μικροπεριβάλλον κατάλληλου λεμφικού οργάνου (π.χ. θύμος για τα T , θύλακας Fabricius στα πτηνά ή αντίστοιχος ιστός –μυελός οστών- στον άνθρωπο για τα B), όπου θα

γίνει μία ώριμη διαφοροποίησή τους υπό την επίδραση άλλων χημικών τοπικών παραγόντων.

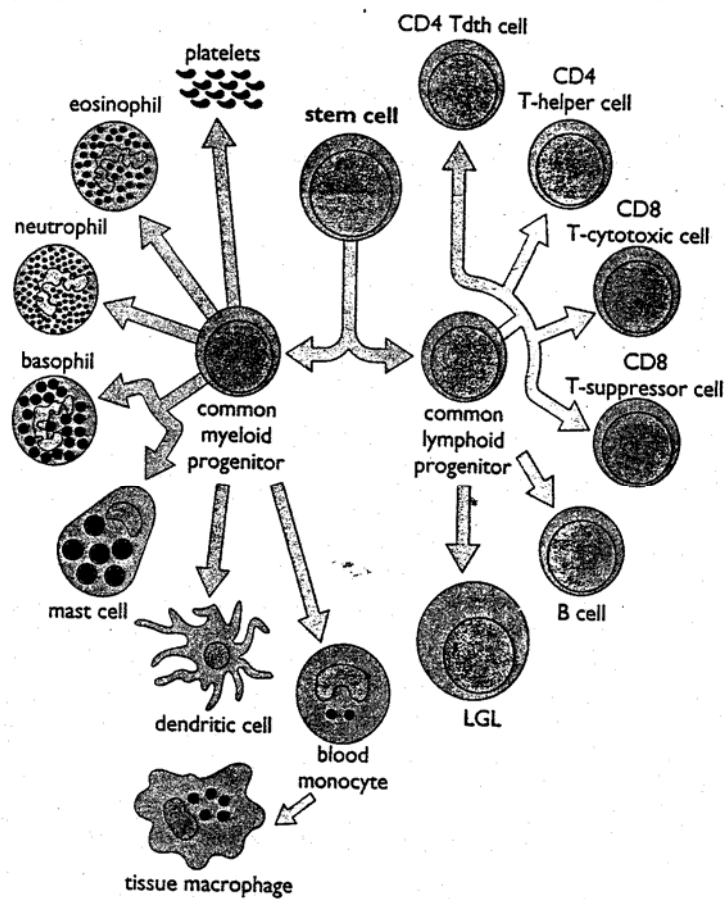
Η τελική ωρίμανση και πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων οργανώνεται μετά τη μεταφορά τους στις κατάλληλες μοίρες των περιφερειακών λεμφικών οργάνων - υπό την επίδραση αντιγόνου - τα οποία σε τελευταία ανάλυση θα αποδώσουν πλέον στην κυκλοφορία τον ώριμο πληθυσμό των T και B λεμφοκυττάρων για να συμμετάσχει στην ανοσιακή απάντηση (Εικ.1).

2. Χαρακτηριστικά λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών

2.1. T – κύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούνται από διακριτούς υποπληθυσμούς που είναι αρκετά διαφορετικοί στις λειτουργίες τους και στα πρωτεϊνικά τους προϊόντα αν και όλα εμφανίζονται μορφολογικά όμοια. Μία τάξη των λεμφοκυττάρων αποτελούν τα T λεμφοκύτταρα. Χαρακτηριστικό όλων των T κυττάρων είναι το ότι εκφράζουν το CD3 μόριο και δεν παράγουν αντισώματα. Οι αντιγονικοί τους υποδοχείς (T cell Receptor,TCR), είναι μεμβρανικά μόρια διαφορετικά μεν αλλά δομικά σχετιζόμενα με τα αντισώματα.

Η παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων δεικτών στην επιφάνεια τους τα διαφοροποιεί σε επιμέρους ομάδες που αντανακλούν στο λειτουργικό τους ρεπερτόριο και στις χαρακτηριστικές εκκριτικές τους ιδιότητες. Έτσι με βάση την έκφραση του CD4 επιφανειακού μορίου διακρίνουμε τους T-βοηθούς (TH), ενώ η έκφραση του CD8 μορίου χαρακτηρίζει τους κυτταροτοξικούς (Tc) και καταστολείς (Ts) T-λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Τόσο τα βοηθητικά, όσο και τα κυτταρολυτικά T-κύτταρα έχουν μία ασυνήθιστη ειδικότητα για τα αντιγόνα : αναγνωρίζουν αντιγονικούς επίτοπους που είναι σε σύνδεση με μόρια του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) που εκφράζονται στην επιφάνεια συνοδών κυττάρων όπως των μακροφάγων (Mφ). Ως αποτέλεσμα, αυτά τα T-κύτταρα αναγνωρίζουν και αντιδρούν με επιφανειακά συνδεδεμένα και όχι με διαλυτά αντιγόνα.



Εικ. 1. Τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Διαφοροποίηση του μητρικού πολυδύναμου κυττάρου σε ανοσοαρμόδια T και B λεμφοκύτταρα. (από το βιβλίο των Norman Staines, Jonathan Brostoff, Keith James 'Introducing Immunology' Second Edition).

Το CD4 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με MW 55.000 που εκφράζεται στην επιφάνεια τόσο των θυμοκυττάρων όσο και των ώριμων περιφερειακών T-κυττάρων. Ο CD4⁺(CD8⁻) T-λεμφοκυτταρικός υποπληθυσμός αναγνωρίζει τον αντιγονικό επίτοπο σε συνεργασία με τάξης II μόρια του MHC μέσω του επιφανειακού υποδοχέα και γενικά έχει ένα βοηθητικό φαινότυπο. Λειτουργικά το CD4 μόριο πιστεύεται ότι παίζει ένα ρόλο στην αναγνώριση και ενεργοποίηση των T-κυττάρων μέσω της εξωκυτταρικής του πρόσδεσης σε μη πολυμορφικές περιοχές των τάξης II μορίων και της ενδοκυτταρικής του πρόσδεσης στην protein tyrosine kinase p56^{lck} (Michelle *et al.*, 1996).

2.1.1. Επιλογή

Οι πολλαπλές διαδικασίες επιλογής που υφίστανται τα T κύτταρα στο θύμο είναι απαραίτητες για την εξασφάλιση της μη εισόδου στην περιφέρεια κυττάρων με κυτταρικούς υποδοχείς (TCRs) που αναγνωρίζουν και αντιδρούν με αντιγόνα του εαυτού ή που έχουν χάσει τη λειτουργική τους ικανότητα.

Συγκεκριμένα ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό των διπλο-θετικών (CD4⁺CD8⁺) T κυττάρων εμφανίζουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, δηλαδή υποδοχείς με υπέρμετρη συγγένεια για τα συμπλέγματα MHC-πεπτίδιο του εαυτού οπότε ενεργοποιούνται κατάλληλοι αποπτωτικοί μηχανισμοί για καταστροφή τους (αρνητική επιλογή). Μολονότι και η θετική και η αρνητική επιλογή εξαρτώνται από TCR μεσολαβούμενα σινιάλα, τα μέσα με τα οποία το θυμοκύτταρο αντιλαμβάνεται αυτά τα σινιάλα, ώστε να οδηγηθεί σε επιβίωση ή θάνατο δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητά.

Όπως πρόσφατα έχει αναφερθεί (Geenen *et al.*, 1998) η μοίρα των αναπτυσσομένων T λεμφοκυττάρων στο θύμο επηρεάζεται από πολυάριθμους τύπους πεπτιδικών αντιδράσεων μέσα στο κυτταρικό θυμικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα πεπτίδια νευροενδοκρινικής φύσεως συντίθενται και κατεργάζονται στον παραπάνω χώρο παίζοντας όντως διπλό ρόλο και στην ανάπτυξη του περιφερικού ρεπερτορίου T λεμφοκυττάρων και στο θάνατο των εαυτό-αντιδρώντων T κυττάρων. Πειραματικά δεδομένα (Vacchio *et al.*, 1998) δείχνουν τα γλυκοκορτικοειδή να επάγουν αρνητική επιλογή θυμοκυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε μικρότερες μπορούν και ανταγωνίζονται TCR-μεσολαβούμενα αποπτωτικά σινιάλα επιτρέποντας την επιβίωση T υβριδωμάτων

και θυμοκυττάρων. Αναστολή της τοπικής βιοσύνθεσης γλυκοκορτικοειδών σε καλλιέργειες θύμων από τρασγενωμικά ποντίκια στον TCR έδωσε αξιοσημείωτες μεταβολές στην διαδικασία επιλογής και διαφοροποίησης των θυμοκυττάρων.

Ακόμη παραπέρα, αλλαγή στο επίπεδο έκφρασης του επιφανειακού μορίου CD45 που αποτελεί υποδοχέα της φωσφατάσης της τυροσίνης και του οποίου η ενεργότητα απαιτείται για την ανάπτυξη των θυμοκυττάρων και τη μετάδοση σήματος μέσω του TCR φαίνεται (Wallace *et al.*, 1997) ότι μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στην θυμική επιλογή.

Εξαιρέσεις του επιλεκτικού κανόνα διαφοροποίησης και επιβίωσης των T λεμφοκυττάρων αποτελούν κάποια από τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα (π.χ. εντερικά) τα οποία δυναμικά εκφράζουν TCRs με συγγένεια για πεπτιδία εαυτού. Η παραπάνω παρατήρηση προτείνει ότι η επιλογή των T κυττάρων μέσα στο επιθήλιο ίσως διαφέρει από τη θυμική επιλογή (κύτταρα εξωθυμικής προέλευσης) αν και πρόσφατες ενδείξεις φανερώνουν την απουσία αντιδραστικότητας αυτών των κυττάρων (Beagley *et al.*, 1998).

2.1.2. Εξαγωγή στην περιφέρεια. Υποπληθυσμοί CD4⁺ λεμφοκυττάρων

Το σχέδιο της λεμφοκυτταρικής κυκλοφορίας και μετανάστευσης *in vivo* από το θύμο στην περιφέρεια είναι μία σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει παροδικές αλλαγές των λεμφοκυττάρων που επάγονται μέσω της αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο. Τα γεγονότα αυτά αφορούν τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά, το συνδυασμό λεμφοκινών που αυτά είναι ικανά να παράγουν, τις απαιτήσεις ενεργοποίησής τους και την ευαισθησία τους σε αποπτωτικά ερεθίσματα.

Τα παρθενικά (naïve) TH λεμφοκύτταρα - άμεσα προερχόμενα από το θυμικό περιβάλλον σε μη διεγερσιμη και διαφοροποιημένη κατάσταση - ανακυκλώνονται συνεχώς μέσα σε ολόκληρο τον ξενιστή κατευθυνόμενα να αντιδράσουν με τα ειδικά αντιγόνα τα οποία είναι προγραμματισμένα να αναγνωρίσουν. Ο επιφανειακός φαινότυπος των CD4⁺ naïve κυττάρων είναι CD45RA⁺, ενώ σήματα ενεργοποίησης προερχόμενα από ένα συνδυασμό κυτοκινών (IL-2, TNF-α, και Il-6), σε απουσία διέγερσης του TCR υποδοχέα, μπορούν να ενεργοποιήσουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σ' ένα διχασμένο φαινότυπο με στοιχεία κοινά μεταξύ naïve και T κυττάρων

μνήμης (Unutmaz *et al.*, 1995). Ακόμα παραπέρα η ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων με anti-CD3 μονόκλωνο αντίσωμα απέδωσε παραγωγή ενός ευρέως φάσματος κυτοκινών ,έκφραση του CD40 ligand αλλά ανικανότητα παροχής βοήθειας σε B κύτταρα για παραγωγή ανοσοσφαιρινών [Unutmaz *et al.*, 1995 (b)].

Μετά την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο παρουσία Mφ η κυκλοφορία των TH αλλάζει αρχίζοντας πρώτα με την παγίδευση των αντιδρώντων T κυττάρων [κύτταρα επηρεαστές (effector cells)] στους λεμφατικούς ιστούς όπου η συγκέντρωση αντιγόνου είναι μεγάλη. Μεταγενέστερα τα αντιδρώντα στο αντιγόνο κύτταρα (effector cells) συνοδευόμενα από μη ειδικά T κύτταρα και μονοκύτταρα κατευθύνονται στις θέσεις εντόπισης του αντιγόνου με αποτέλεσμα μία τοπική φλεγμονώδη απάντηση (Daily, 1998). Κύριο χαρακτηριστικό των effector cells, είναι η επαγωγή υψηλών ρυθμών πολλαπλασιασμού τους, ως απάντηση στην αναγνώριση του αντιγόνου, η οποία κυρίως μεσολαβείται από αυτοκρινή μονοπάτια, που έχουν να κάνουν με παραγωγή κυτοκινών και έκφραση επιφανειακών υποδοχέων για αυτές τις κυτοκίνες. Το αποτέλεσμα αυτής της αυξητικής απάντησης είναι η εξάπλωση αντιγόνο-ειδικών T κυττάρων τα οποία είναι απαραίτητα σε μεγάλους αριθμούς προκειμένου να χειριστούν τα ξένα αντιγόνα.

Η δράση των λεμφοκινών που εκκρίνονται από τα effector cells δεν περιορίζεται μόνο πάνω στα ίδια τα CD4⁺ κύτταρα αλλά και σε πληθώρα άλλων όπως στα B, στα Mφ, σε άλλα T, σε φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα κ.α. Το μοντέλο λειτουργίας τους έχει να κάνει με ποικίλες επιδράσεις που προάγουν και ρυθμίζουν τις χημικές και κυτταρο-μεσολαβητικές ανοσιακές απαντήσεις και τις καταστάσεις φλεγμονής.

Συνοψίζοντας θα λέγαμε ότι μετά την αναγνώριση και αντίδραση του αντιγόνου με το ειδικό CD4⁺ T κύτταρο ακολουθεί μία σειρά αλληλοσχετιζόμενων βημάτων που περιλαμβάνουν:

- Γεγονότα πρώιμης μεταφοράς σήματος
- Μεταγραφική ενεργοποίηση πληθώρας γονιδίων
- Έκφραση νέων επιφανειακών μορίων
- Έκκριση κυτοκινών
- Επαγωγή μιτωτικής δραστηριότητας μέσω IL-2

Καθώς η ανοσιακή απάντηση φθίνει με τη πάροδο του χρόνου ένας καινούριος υποπληθυσμός CD4⁺ T κυττάρων αρχίζει να δημιουργείται τα λεγόμενα αντιγόνο-ειδικά κύτταρα μνήμης (effector memory cells) (Dailey, 1998). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τη γενιά των effector κυττάρων και αποτελούν τους φορείς της ανοσολογικής μνήμης. Η ανοσολογική μνήμη η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί ως η γρηγορότερη και δυνατώτερη ανοσιακή απάντηση ενός ζώου που έπεται μετά από επανέκθεση στο ίδιο αντιγόνο (Dutton *et al.*, 1998). Τα κύτταρα μνήμης εκφράζουν ένα διαφορετικό πρότυπο επιφανειακών δεικτών και αντιδρούν με πολλαπλούς τρόπους οι οποίοι είναι λειτουργικά διαφορετικοί απ' αυτούς των naïve κυττάρων. Τα ποντικίσια CD4⁺ κύτταρα είναι CD44^{high} παρουσιάζοντας χαμηλή έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης, όπως ο CD25 (IL-2R), ενώ τα ανθρώπινα memory κύτταρα είναι CD45RA⁻ CD45RO⁺. Σ' αντίθεση με τα naïve κύτταρα, τα κύτταρα μνήμης εκφράζουν ένα πλήρες φάσμα T εκκρινόμενων κυτοκινών εμφανίζοντας παράλληλα ικανότητα πόλωσης για έκκριση συγκεκριμένων τύπων κυτοκινών (TH1/TH2 pattern).

Οι απαιτήσεις των CD4 memory κυττάρων για ενεργοποίηση του πολ/σμού τους και της παραγωγής κυτοκινών δεν είναι τόσο αυστηρές όπως αυτή των naïve κυττάρων, αλλά συνδιέγερση και συνοδευτικές αλληλεπιδράσεις με τη γενική έννοια απαιτούνται για τις optimum απαντήσεις και για αντιδράσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου (Dutton *et al.*, 1998, Carter *et al.*, 1998). Οι ίδιες έρευνες υποστηρίζουν ότι απαιτούνται διαφορετικά σκαλοπάτια (threshold) ενεργοποίησης για παραγωγή των ποικίλων κυτοκινών με κλιμακούμενη σειρά αυξημένων απαιτήσεων που έχει ως εξής: IL-2 >> IFN-γ > IL-4.

Φαίνεται ότι τα CD4⁺ T κύτταρα μνήμης μπορούν να υπάρχουν σταθερά σε απουσία αντιγονικής διέγερσης (ερεθίσματος) και παραμένουν ως μη διαιρούμενα κύτταρα. Επαναδιέγερση με το ίδιο αντιγόνο μπορεί να εξαπλώσει τον συγκεκριμένο πληθυσμό σ' ένα καινούριο σταθερό και υψηλό επίπεδο δημιουργώντας παράλληλα ένα ξεχωριστό πληθυσμό CD44^{high} effector κυττάρων που μπορεί να απαιτείται για προστασία, καθώς ανταγωνισμός από άλλα αντιγόνα μπορεί να τον οδηγήσουν σ' ένα χαμηλότερο σταθερό επίπεδο. Πάντως δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα πώς και από πού προέρχονται όλα τα memory κύτταρα, αλλά όταν δημιουργηθούν ακολουθούν - σε σχέση με τους άλλους τύπους CD4⁺ T κυττάρων - διαφορετικά μονοπάτια κυκλοφορίας και

εγκατάστασης ρυθμιζόμενα από επιφανειακά προσδεδεμένα μόρια των οποίων η έκφραση με τη σειρά της επηρεάζεται από κυτοκίνες και το τοπικό λεμφατικό μικροπεριβάλλον (Dailey, 1998).

Επιπλέον *in vivo* αποτελέσματα (Bradley *et al.*, 1995) συγκλίνουν στο ότι τα CD4⁺ naïve και T κύτταρα μνήμης υφίστανται παράλληλη ανάπτυξη μετά τη διέγερση με το αντιγόνο εκκρίνοντας αρχικά κυρίως IL-2 και διαφοροποιούνται, ως απάντηση στις IL-4 και IL-2, σε πολωμένους effector υποπληθυσμούς.

2.1.3. Διαφοροποίηση TH σε TH1 και TH2

Τα TH effector κύτταρα τόσο του ποντικίσιου (Mosman *et al.*, 1986) όσο και του ανθρώπινου (Umetsu *et al.*, 1998, Rotteveel *et al.*, 1988) ανοσιακού συστήματος έχουν την τελευταία δεκαετία χαρακτηριστεί να ανήκουν σε δύο λειτουργικά διακριτούς T κυτταρικούς υποπληθυσμούς (TH1 και TH2) οι οποίοι είναι ικανοί να ασκούν βοηθητική δράση στην πολυκλωνική διαφοροποίηση των B κυττάρων, αλλά διαφέρουν αισθητά στην ικανότητα πρόκλησης κυτταροτοξικής απάντησης, στην παραγωγή διαφόρων κυτοκινών και στις απαιτήσεις πολ/σμού τους. Ο πολωμένος φαινότυπος των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων δεν εκφράζεται σε naïve T κύτταρα αλλά δείχνει να επάγεται στα πρώτα λεπτά που ακολουθούν την ενεργοποίηση των T κυττάρων (Rubbi *et al.*, 1996).

Ανάλυση αυτών των υποπληθυσμών έχει υποδηλώσει ότι τα TH1 λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IL-2, IFN- γ , TNF α / β και λεμφοτοξίνη, ενώ οι TH2 κλώνοι IL-4, IL-5, IL-10 και IL-3, ενώ δύο άλλα μόρια παράγονται αποκλειστικά από τον TH2 υποπληθυσμό και αφορούν έναν αυξητικό παράγοντα των μαστοκυττάρων (mast cells) διαφορετικό από την IL-3 και ένα αυξητικό παράγοντα των T κυττάρων διακριτό από την IL-2. Υψηλό επίπεδο έκφρασης του επιφανειακού μορίου CD28 εντοπίστηκε (Rotteveel *et al.*, 1988) σε ανθρώπινους κλώνους της TH2 σειράς σ' αντίθεση με τα TH1 στα οποία το συγκεκριμένο μόριο απαντά σε χαμηλά επίπεδα.

Λειτουργικά οι TH1 κλώνοι (φλεγμονώδη κύτταρα) είναι υπεύθυνοι για τις κυτταροτοξικές ανοσιακές απαντήσεις και τις αντιδράσεις αργοπορημένου τύπου υπερευαισθησίας (Delayed Type Hypersensitivity). Η υψηλότερη κυτταροτοξική ενεργότητα των TH1 σε σχέση με τα TH2 δεν περιορίζεται από

ένα συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού στόχου και είναι ανεξάρτητη του σταδίου ενεργοποίησης των TH1 κυττάρων (Chang *et al.*, 1990). Σ' αντίθεση τα TH2 (ρυθμιστικά κύτταρα) ασκούν βοηθητική δράση στην έκκριση ανοσοσφαιρινών (Igs) κατά τις χυμικές αποκρίσεις. Στην ουσία και οι δύο κυτταρικοί τύποι μπορούν να παρέχουν βοήθεια στα B κύτταρα, αλλά η φύση αυτής της βοήθειας διαφέρει αισθητά (Mosman *et al.*, 1986, Rotteveel *et al.*, 1988). Παρόλα αυτά η απλή διχοτόμηση των ανθρωπίνων TH κυττάρων σε TH1 και TH2 υποπληθυσμούς με βάση το πρότυπο έκκρισης λεμφοκινών φαίνεται ότι δεν αντανακλά όλη την αλήθεια αφού αξιόπιστες μελέτες (Umetsu *et al.*, 1988, Wong *et al.*, 1988, Fitch *et al.*, 1988), έχουν αποδείξει την ύπαρξη ενός επιπρόσθετου υποπληθυσμού ο οποίος εκκρίνει παράλληλα IL-4 και IFN- γ .

Οι παραπάνω λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί ανταποκρίνονται επίσης διαφορετικά και στις ανοσορυθμιστικές διαδικασίες. Και οι δύο TH κλώνοι μπορούν να πολ/στούν σε διέγερση με εξωγενή IL-2 αλλά η IL-4 αποκλειστικά επάγει πολ/στική απάντηση μόνο σ' αυτούς τους πληθυσμούς που παράγουν IL-4. Η IFN- γ αναστέλλει τον πολ/σμό των TH2 κλώνων, αλλά δεν επηρεάζει καθόλου την αύξηση των TH1. Αντίθετα όταν δόθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις anti- CD3 mAb (Gajewski *et al.*, 1990) παρατηρήθηκε ακριβώς το αντίθετο φαινόμενο, ενώ επιπρόσθετα η φύση του αντιγόνου προκάλεσε αναστολή στην έκκριση λεμφοκινών ειδικά σε κάποιο υποπληθυσμό π.χ. η choeratoxin στον TH1 σε αντίθεση με τον TH2. Αυτή η επιλεκτική ανασταλτική επιρροή πάνω στους δύο υποπληθυσμούς προτείνει ότι ίσως να χρησιμοποιούνται διαφορετικοί μηχανισμοί μετάδοσης σήματος σχετιζόμενων με τους TCRs για την γονιδιακή έκφραση των λεμφοκινών. Συνοψίζοντας, τα δεδομένα (Fitch *et al.*, 1988, Gajewski *et al.*, 1990) προτείνουν ότι η συνδυασμένη επιρροή των κυτοκινών, η φύση και η ένταση του TCR ερεθίσματος μπορούν να καθορίσουν ποιος κυτταρικός τύπος θα αντιπροσωπευτεί σε μεγαλύτερη συχνότητα κατά τη διάρκεια συγκεκριμένης ανοσολογικής κατάστασης.

Ο χαρακτηρισμός του TCR που εκφράζεται σε TH1 και TH2 αντιγόνο-ειδικά κύτταρα με απευθείας προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του mRNA και του γενωμικού τόπου, έδειξε ότι και τα δύο είδη κυττάρων χρησιμοποιούν τους ίδιους TCRs (Reiner *et al.*, 1993).

Ένα λεπτό σημείο το οποίο μελετήθηκε εκτενώς από τους Sad και Mosman ήταν το εάν οι παραπάνω κυτταρικοί πληθυσμοί που έχουν διακριτές

δυνατότητες εξειδικευμένης παραγωγής κυτοκινών αντιπροσωπεύουν διαφορετικές κυτταρικές σειρές ή εάν αυτές προέρχονται από τον ίδιο μη πολωμένο T κυτταρικό πρόγονο. Κατά τη διάρκεια συνδυασμένης χορήγησης anti-IFN- γ και TGF- β (αναστέλλει την ανάπτυξη των TH2 κυττάρων) σε CD4⁺ σπληνικά T κύτταρα από ποντίκι παρατηρήθηκε πολ/σμός ενός κυτταρικού πληθυσμού που παρήγαγε IL-2, αλλά όχι IFN- γ , IL-4 ή IL-5 σε επαναδιέγερση. Αυτά τα IL-2 εκκριτικά T κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα CD45RB και MEL14 και υψηλά επίπεδα CD44. Οι παραπάνω κυτταρικοί κλώνοι απομονώθηκαν και μετά από καλλιέργεια διαπιστώθηκε ότι αποκτούσαν την ικανότητα έκκρισης TH1 ή TH2 κυτοκινών όταν επαναδιεγείρονταν σε παρουσία TGF- β ή IL-4 αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι και οι δύο CD4⁺ κυτταρικοί υποπληθυσμοί μπορούν να προέρχονται από ένα διδύναμο CD4⁺ T κυτταρικό πρόγονο με ικανότητα παραγωγής IL-2 (Sad *et al.*, 1994). Παράλληλα άλλα *in vitro* πειράματα με μεγάλες καλλιέργειες κυττάρων (Street *et al.*, 1990) δείχνουν ότι το είδος ανοσοποίησης των ποντικιών από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα 'απαντητές' επηρεάζουν ισχυρά τον τύπο του TH κλώνου που τελικά παίρνουμε, σε αντίθεση με την πηγή των διεγερμένων κυττάρων η οποία έχει πολύ μικρότερη επιρροή. Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η δέσμευση των TH κυττάρων σε TH1 ή TH2 φαινότυπο λαμβάνει χώρα κυρίως *in vivo*.

Αν και επικρατεί μεγάλη σύγχυση όσο αφορά τα κριτήρια με τα οποία επιλέγεται η πολωμένη πορεία διαφοροποίησης του προγονικού TH κυττάρου φαίνεται ότι 4 ρυθμιστικά φαινόμενα (Gajewski *et al.*, 1989) ρυθμίζουν διαφορετικά την ενεργοποίηση των TH1 και TH2 κλώνων:

- Το είδος των λεμφοκινών που βρίσκονται στον εκάστοτε χώρο για π.χ. η παρουσία IFN- γ κατά τη διάρκεια της ανοσιακής απάντησης μπορεί να επιφέρει επιλεκτική εξάπλωση T κυττάρων με TH1 φαινότυπο.
- Διαφορετικοί APC πληθυσμοί φαίνεται να ενεργοποιούν διαφορετικά τους TH1 και TH2 κλώνους. Σπληνικά B κύτταρα (ως APCs) δείχθηκε να διεγείρουν το βέλτιστο πολλαπλασιασμό των TH2 κυττάρων αλλά όχι των TH1 σε αντίθεση με τα Mφ/δενδριτικά όπου παρατηρήθηκε το αντίστροφο φαινόμενο. Αφού και οι δύο τύποι APCs διεγείρουν λεμφοκυτταρική παραγωγή σε καθένα από τους δύο υποπληθυσμούς, υπάρχει το ενδεχόμενο της παρουσίας TH1 και TH2 ειδικών αυξητικών συμπαραγόντων.

- Υψηλές δόσεις anti-CD3 mAb αναστέλουν τον IL-2-εξαρτώμενο πολ/σμό των TH1 κλώνων αλλά όχι και των TH2. Αφού η ενεργοποίηση με anti-CD3 mAb πιστεύεται ότι μιμείται την αντιγονική διέγερση αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η συγκέντρωση του αντιγόνου μπορεί να παίζει ένα ρόλο στον καθορισμό του TH κυτταρικού τύπου που θα επικρατήσει σε μία συγκεκριμένη ανοσολογική κατάσταση.
- Η συσχέτιση της αναστολής του πολ/σμού των TH1 κλώνων μετά από χορήγηση υψηλής δόσης anti-CD3 με αυξημένη απάντηση για Ca⁺⁺ των TH1 σε σχέση με τα TH2 προσδίδει επιπλέον ενδείξεις για διαφορετικούς μηχανισμούς μετάδοσης σήματος μέσω του TCR υποδοχέα ανάμεσα στους δύο κυτταρικούς κλώνους.

2.2. B κύτταρα

2.2.1. Ωρίμανση B λεμφοκυττάρων

Όλα τα B λεμφοκύτταρα (CD19) μέσα στο μυελό των οστών προέρχονται από ένα (stem cell) μητρικό πολυδύναμο κύτταρο το οποίο δεν έχει την ικανότητα παραγωγής ανοσοσφαιρίνης . Ο πρώτος (πιο πρώιμος) κυτταρικός τύπος που συνθέτει ένα ανιχνεύσιμο Ig γονιδιακό προϊόν περιέχει κυτοπλασματικές μ βαριές αλυσίδες (heavy chains) (H) αποτελούμενες από μεταβλητές (V) και σταθερές (C) περιοχές. Αυτό το κύτταρο καλείται pre-B λεμφοκύτταρο και βρίσκεται μόνο σε αιμοποιητικούς ιστούς, όπως ο μυελός των οστών και το εμβρυϊκό σπυκώτι. Ο τύπος αυτός κυττάρου δεν εκφράζει μεμβρανική IgM, αφού η επιφανειακή έκφραση ανοσοσφαιρίνης απαιτεί σύνθεση και των βαρέων και των ελαφρών αλυσίδων (light chains) (L) και ως εκ τούτου τα pre-B κύτταρα δεν μπορούν να αναγνωρίσουν ή να απαντήσουν σ' ένα αντιγόνο. Οι κυτταροπλασματικές μ (H) αλυσίδες είναι δυνατό να συνδέονται με άλλες μη ανοσοσφαιρικές πρωτεΐνες των οποίων η κυριότερη λειτουργία είναι ίσως να εμποδίσουν την αποδόμηση νεοσυντιθέμενων βαρέων αλυσίδων και να προωθήσουν την έκφραση του Ig μορίου στην επιφάνεια του κυττάρου.

Στο επόμενο διακριτό στάδιο της ωρίμανσης των B κυττάρων παράγονται οι κ ή λ ελαφριές αλυσίδες. Αυτές συνδέονται με τις μ H αλυσίδες και κατόπιν τα IgM συμπλέγματα εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια όπου λειτουργούν ως

ειδικοί υποδοχείς για τα αντιγόνα. Αυτά τα B κύτταρα τα οποία φέρουν επιφανειακή IgM και τα οποία προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών καλούνται ανώριμα B λεμφοκύτταρα (immature B lymphocytes) λόγω του ότι δεν πολ/ζονται και δε διαφοροποιούνται ως απάντηση σε αντιγόνα. Στην πραγματικότητα η αλληλεπίδρασή τους με αντιγόνα, όπως αντιγόνα του εαυτού, μπορεί να οδηγήσει σε 'ανέργεια' ή σε σταμάτημα έκφρασης της L αλυσίδας παρά σε ενεργοποίησή της.

Έχοντας αποκτήσει μία ολοκληρωμένη Ig και ως εκ τούτου μία ειδικότητα τα B κύτταρα μεταναστεύουν έξω από το μυελό των οστών και μπορεί να βρεθούν στην περιφερειακή κυκλοφορία και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπου εκεί συνεχίζουν να ωριμάζουν ακόμα και σε απουσία αντιγονικής διέγερσης. Τα ώριμα B κύτταρα συνεκφράζουν μ και δ βαριές αλυσίδες σε σύνδεση με την πρωτογενή κ ή λ αλυσίδα και ως συνέπεια παράγουν και τους δύο τύπους των αντίστοιχων μεμβρανικών Igs δηλ. IgM και IgD .

Οι παραπάνω Igs έχουν την ίδια V περιοχή και συνεπώς την ίδια αντιγονική ειδικότητα και θεωρούνται ικανοί απαντητές στα αντιγόνα. Είναι πιθανό μερικά B κύτταρα να αποκτούν λειτουργική ικανότητα σε αντιγονική διέγερση χωρίς να εκφράζουν IgD. Μολονότι αυτό το στάδιο ωρίμανσης δεν απαιτεί παρατεταμένη έκθεση στο αντιγόνο, πιστεύεται ότι αν αυτά τα B λεμφοκύτταρα δεν αλληλεπιδράσουν με αντιγόνο πεθαίνουν επιβιώνοντας μόνο τρεις με τέσσερις ημέρες . Όταν τα ώριμα B κύτταρα διεγείρονται από αντιγόνο ή άλλα σήματα λέγονται ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται παράγοντας ένα συνεχώς αυξανόμενο ποσοστό της ειδικής Ig σε εκκριτική μορφή ενώ παράλληλα παρατηρείται σταδιακή ελάττωση της έκφρασης της αντίστοιχης μεμβρανικής μορφής. Κατόπιν ενεργοποιημένα B κύτταρα υφίστανται αλλαγή ισotyπου της βαριάς αλυσίδας (heavy chain class isotype switching) και αρχίζουν να εκφράζουν βαριές αλυσίδες διαφορετικές από μ και δ τάξης όπως για παράδειγμα γ , α ή ϵ .

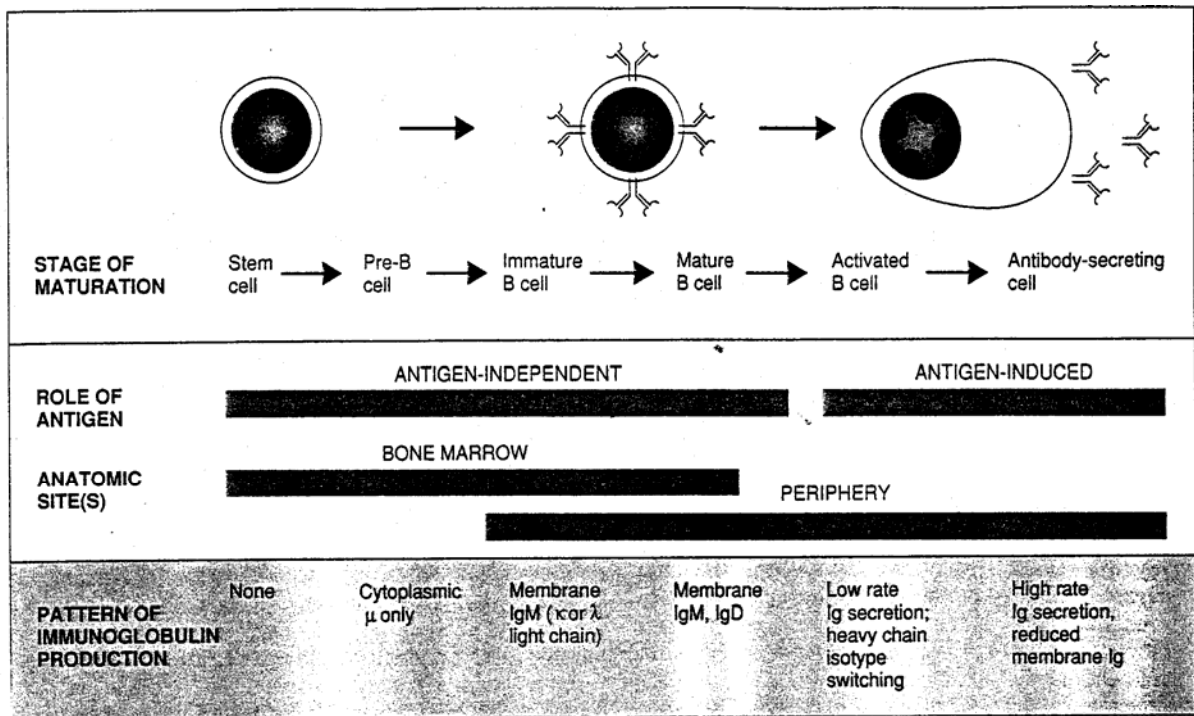
Άλλα ενεργοποιημένα B μπορεί να μην εκκρίνουν αντίσωμα αλλά διατηρούνται ως κύτταρα μνήμης εκφράζοντας μόνο μεμβρανικές Igs. Τα κύτταρα μνήμης επιζούν για εβδομάδες ή μήνες χωρίς περαιτέρω αντιγονική διέγερση και κυκλοφορούν ενεργά μέσα στο αίμα, στη λέμφο και τα λεμφοειδή όργανα. Η διέγερση των κυττάρων μνήμης από αντιγόνο οδηγεί τελικά σε μία δευτερογενή ανοσιακή απάντηση. Τα κύτταρα μνήμης γενικά εκφράζουν Igs μόρια των

οποίων οι συγγένειες για τα αντιγόνα είναι υψηλότερες απ' αυτές των μη διεγερμένων προγονικών κλώνων. Η επαγόμενη από το αντιγόνο διαφοροποίηση των ώριμων κυττάρων ή των κυττάρων μνήμης συμβάλλει στην ανάπτυξη των εκκριτικών Β κυτταρικών μορφών, μερικά από τα οποία μπορεί μορφολογικά να προσδιοριστούν ως πλασματοκύτταρα. Στο αίμα και στους λεμφοειδείς ιστούς φυσιολογικών ατόμων η πλειοψηφία των Β κυττάρων είναι IgM^+ ή IgM^+IgD^+ (Εικ 2).

2.2.2. Ωρίμανση συγγένειας (Affinity maturation), Αλληλομορφικός αποκλεισμός (Allelic exclusion)

Μολονότι τα μέλη κάθε Β κυτταρικού κλώνου εκφράζουν την ίδια V περιοχή και ως εκ τούτου την ίδια αντιγονική ειδικότητα, ουσιαστικές αλλαγές μπορεί να λάβουν χώρα. Συγκεκριμένα, η μέση συγγένεια του εκκρινόμενου αντισώματος και της μεμβρανικής Ig ανοσοσφαιρίνης στα αντιγόνο-ειδικά Β λεμφοκύτταρα αυξάνεται, μετά από αντιγονική διέγερση και είναι ουσιαστικά υψηλότερη στη δευτερογενή παρά στη πρωτογενή απάντηση. Το φαινόμενο αυτό καλείται ωρίμανση συγγένειας (Affinity maturation) και είναι μια ιδιότητα των χυμικών ανοσιακών απαντήσεων σε πρωτεϊνικά αντιγόνα και προέρχεται από μικρές μεταλλάξεις (somatic mutations) στο DNA που κωδικοποιεί τις V περιοχές της Ig ξεχωριστών αντιγόνο-διεγερμένων Β λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε μία αύξηση της συγγένειας των ανοσοσφαιρινών που προέρχονται απ' αυτά τα κύτταρα. Δύο άλλα χαρακτηριστικά της παραγωγής ανοσοσφαιρινών από τα Β κύτταρα είναι αξιοσημείωτα:

- Κάθε Β κυτταρικός κλώνος και η προγονική του γενιά είναι ειδικοί μόνο για έναν αντιγονικό επίτοπο. Είναι ως εκ τούτου απαραίτητο για κάθε Β κύτταρο να εκφράζει στη διάρκεια της ζωής του μόνο ένα ζεύγος V γονιδίων που να αντιστοιχεί στη βαριά και ελαφριά αλυσίδα, παρόλο που όλα τα ετερόζυγα άτομα κληρονομούν 2 set Ig γονιδίων, ένα από τον κάθε γονέα. Η μονή ειδικότητα επιτυγχάνεται λόγω του ότι μόνο ένα από τα δύο πατρικά αλληλία της Ig εκφράζεται από το Β κυτταρικό κλώνο ήδη από τα πρώιμα στάδια ωρίμανσης. Το γεγονός αυτό ονομάζεται αλληλομορφικός αποκλεισμός (allelic exclusion) και είναι χαρακτηριστικό των αντιγονικών υποδοχέων και των Β και των Τ λεμφοκυττάρων.



Εικ. 2. Η ακολουθία γεγονότων ωρίμανσης και αντιγόνο-επαγόμενης διαφοροποίησης των B κυττάρων. (Από το βιβλίο των Abbas A., Lichtman A. και Pober J., 'Cellular and Molecular Immunology', 1991).

- Κάθε B κυτταρικός κλώνος παράγει είτε την κ είτε τη λ ελαφριά αλυσίδα (ποτέ και τις δύο) και μολονότι λαμβάνει χώρα heavy class switching μετά την ενεργοποίησή του, αλλαγή από την μία μορφή ελαφριάς αλυσίδας στην άλλη δεν πραγματοποιείται ποτέ κατά τη διάρκεια της ζωής του. Για τις ελαφριές αλυσίδες λοιπόν ισχύει αυτό που ονομάζουν ισοτυπικό αποκλεισμό της ελαφριάς αλυσίδας (light chain isotype exclusion) .

2.2.3. Γένεση Ποικιλομορφίας Ανοσοσφαιρινών

Πολλοί διαφορετικοί γενετικοί μηχανισμοί συμβάλλουν στη δημιουργία της μεγάλης ποικιλίας μεμβρανικών και εκκρινόμενων αντισωμάτων που απαντάται σε κάθε άτομο. Η εκτιμώμενη συνεισφορά κάθε ενός από αυτούς τους μηχανισμούς στο συνολικό ρεπερτόριο των ανοσοσφαιρινών αναφέρεται παρακάτω .

- Πολλαπλά germline γονίδια. Και οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες μπορούν να κωδικοποιούνται από πολλαπλά germline V γονίδια τα οποία έχουν διαφορετικές ακολουθίες και παράγουν Ig μόρια με διακριτές ειδικότητες . Λόγω του ότι τα D και J γονίδια κωδικοποιούν τμήματα των περιοχών πρόσδεσης του αντιγόνου πάνω στα αντισώματα, η χρησιμοποίηση διαφορετικών D και J γονιδίων επίσης συμβάλλει στη μεγάλη ποικιλία. Το μέγεθος της ποικιλότητας που δημιουργείται σε συγκεκριμένο Ig γονιδιακό τόπο συσχετίζεται με τον αριθμό των γονιδιακών υποπεριοχών σ' αυτό το γενετικό τόπο. Για παράδειγμα στα ποντίκια 90 με 95% των αντισωμάτων που παράγονται περιέχουν κ ελαφριές αλυσίδες, ενώ τα αντισώματα με λ αλυσίδες αναγνωρίζουν ένα αρκετά αυστηρό set αντιγόνων. Στα ποντίκια, ο λ γενετικός τόπος περιέχει μόνο 2 λειτουργικά V γονίδια. Στον άνθρωπο από την άλλη μεριά, οι κ και λ γενετικοί τόποι περιέχουν περίπου ίσους αριθμούς V γονιδίων και αντιπροσωπεύονται ισοδύναμα στα παραγόμενα αντισώματα με ομοιότητες στην ποικιλία που παρουσιάζουν.
- Συνδυαστική ποικιλία (Combinatorial diversity). Ο σωματικός ανασυνδυασμός στο DNA της Ig συμβάλλει στη γένεση ποικιλομορφίας αντισωμάτων με πολλούς τρόπους . Οι συνδυαστικές συνδέσεις διαφορετικών V, D και J γονιδιακών τμημάτων οδηγεί σ' ένα ευρύ δυναμικό για δημιουργία διαφορετικών ανοσοσφαιρικών ειδικοτήτων. Ο μέγιστος

δυνατός αριθμός συνδυασμών είναι το προϊόν του αριθμού των V, D (αν είναι παρόν) και J εξονίων σε κάθε τόπο. Λόγω της συνδυαστικής ποικιλότητας τα μόρια των ανοσοσφαιρινών δείχνουν τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία στις συνδέσεις των V και C (σταθερών) περιοχών και στις δύο τύπων αλυσίδες. Αυτές οι συνδέσεις σχηματίζουν την τρίτη υπέρ-μεταβλητή περιοχή ή CDR3, η οποία είναι το πιο σημαντικό τμήμα του Ig μορίου για την σύνδεση του αντιγόνου.

- Συνδετική ποικιλότητα (Junctional diversity). Ακόμα και το ίδιο set germline V, D και J γονιδιακών τμημάτων μπορεί να δημιουργήσει διαφορετικές αμινοξικές ακολουθίες στις συνδέσεις. Αυτοί οι επιπρόσθετοι συνδετική ποικιλότητα προέρχεται από διάφορους μηχανισμούς που έχουν να κάνουν με πολλαπλούς ανασυνδιασμούς στις περιοχές αυτές.
- Σωματικές μεταλλάξεις (Somatic mutations). Αλλαγές της ειδικότητας σύνδεσης του αντιγόνου ως αποτέλεσμα σωματικών μεταλλαγών σε V γονίδια μπορούν να αποτελέσουν υλικό για επιπρόσθετη ποικιλότητα .
- Συνδυασμοί των H και L πρωτεϊνικών προϊόντων. Εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε επίπεδο γονιδίων, ο συνδυασμός διαφορετικών H και L πρωτεϊνικών προϊόντων συμβάλλει επίσης στη γένεση ποικιλομορφίας λόγω του ότι η V περιοχή κάθε αλυσίδας συμμετέχει σε αντιγονική αναγνώριση .

Η έκφραση διαφορετικών germline V, D και J γονιδίων , οι συνδυαστικές V-J και V-D-J συνδέσεις, η συνδετική ποικιλότητα και οι διαφορετικές συνδέσεις H και L αλυσίδων συμβαίνουν όλες πριν την αντιγονική διέγερση. Αυτοί είναι οι υπεύθυνοι μηχανισμοί και για την ποικιλομορφία του πρωτογενούς ή naïve ρεπερτορίου B κυττάρων. Ως εκ τούτου σε πρωτογενείς ανοσιακές απαντήσεις σε αντιγόνα με πολλούς επίτοπους, πολλαπλοί αντιγονο-ειδικοί B κυτταρικοί κλώνοι που εκφράζουν διαφορετικά V γονίδια και V-J_(L) καθώς και V-D-J_(H) συνδυασμούς μπορεί να διεγερθούν . Αυτό μπορεί να δώσει αύξηση στα ειδικά αντισώματα με ένα ευρύ φάσμα συγγενειών για το αντιγόνο. Σε αντίθεση, η δευτερογενής ανοσιακή απάντηση στο ίδιο αντιγόνο επικρατείται από μόνο μερικούς κλώνους B κυττάρων που διεγέρθηκαν κατά την πρώτη ανοσοποίηση και οι οποίοι περιέχουν πολλαπλές σωματικές μεταλλάξεις στα V γονίδια των ανοσοσφαιρινών τους , ενώ παράλληλα τα παραγόμενα Igs παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια για τα ειδικά αντιγόνα. Ως αποτέλεσμα η δευτερογενής

απάντηση συχνά αποτελείται από πιο περιορισμένο πληθυσμό αντισωμάτων με υψηλότερη μέση συγγένεια για το αντιγόνο.

2.2.4. Ενεργοποίηση Β κυττάρων

2.2.4.1 Θυμο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση

Ως θυμο-εξαρτώμενα χαρακτηρίζονται τα αντιγόνα εκείνα των οποίων η αντίδραση με τα Β λεμφοκύτταρα για παραγωγή αντισώματος εξαρτάται άμεσα από ΤΗ κύτταρα, ενώ για να προκληθεί ανοσιακή απάντηση χρειάζονται τουλάχιστον 2 επίτοποι εκ των οποίων ο ένας θα διεγείρει τα Β λεμφοκύτταρα για παραγωγή αντισώματος και ο άλλος τα Τ. Παρεμβατική δράση σ' αυτό το σύστημα ενεργοποίησης έχουν κυτταρικοί πληθυσμοί (Μφ, δενδριτικά κύτταρα) γνωστοί ως 'παρουσιαστές αντιγόνων' (APCs), οι οποίοι κατεργάζονται τα αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους προσδεμένα με τα τάξης II μόρια του ΜHC προκειμένου το παραπάνω σύμπλεγμα να αναγνωριστεί από τον ειδικό TCR υποδοχέα κάποιου ΤΗ λεμφοκυτταρικού κλώνου.

Το ενεργοποιημένο Μφ παράγει IL-1 προκαλώντας ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων η οποία εκδηλώνεται με επιφανειακή έκφραση του IL-2 υποδοχέα με παραγωγή και έκκριση ενδογενούς IL-2 η οποία με τη σειρά της ενώνεται με τους υποδοχείς της (αυτοκρινής δράση) με αποτέλεσμα σύνθεση DNA , μίτωση και κυτταρική διαίρεση των ΤΗ κυττάρων . Το ενεργοποιημένο ΤΗ εκτός της IL-2 παράγει διάφορους παράγοντες , όπως τους BCGF (B cell growth factor) και BCDF (B cell differentiation factor) ο οποίος με την IL-1 και άλλους παράγοντες όπως ο TRF (T cell replacing factor) προκαλούν πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων και διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα που παράγουν αντίσωμα. Έτσι ο πολλαπλασιασμός των Τ λεμφοκυττάρων επιτελείται με μια σειρά βημάτων με τα οποία η αντίδραση αντιγόνου/ΜHC-CD3-TCR μεταφράζεται σε αντίδραση IL-2/IL-2R.

Ο πολλαπλασιασμός των Β κυττάρων πραγματοποιείται στα βλαστικά κέντρα των δευτερογενών λεμφατικών οργάνων τα οποία ουσιαστικά δεν υπάρχουν πριν την αντίδραση με το αντιγόνο. Στο χρόνο αυτό απαντούν αθροίσεις ώριμων μικρών Β λεμφοκυττάρων σχηματίζοντας οζίδια, τα πρωτογενή λεμφοζίδια. Όταν υπάρξει αντιγονικός ερεθισμός που διεγείρει τη χυμική ανοσία

σχηματίζονται στο κέντρο των λεμφοζιδίων τα βλαστικά κέντρα (GC) ή δευτερογενή λεμφοζίδια τα οποία συνιστώνται από μεγάλους πλέον ενεργοποιημένους B ανοσοβλάστες. Έτσι τα βλαστικά κέντρα αποτελούν τη θέση ωρίμανσης, διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των B λεμφοκυττάρων καθώς και τη θέση παραγωγής B μνημονικών κυττάρων τα οποία επιλεκτικά διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα .

Χρησιμοποιώντας επιφανειακούς markers συμπεριλαμβανομένων των IgD και CD38 πρόσφατες έρευνες (Liu YZ *et al.*, 1997) έδειξαν ότι, τα ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα από βλαστικά κέντρα αμυγδαλών μπορούν να ταξινομηθούν σε διακριτούς υποπληθυσμούς κάποιοι από τους οποίους φέρουν υψηλό επίπεδο σωματικών μεταλλαγών στα Ig V γονίδια, switch από C_m σε C_{delta} και επιλεκτική χρήση της λ αλυσίδας. Επίσης κοινό χαρακτηριστικό όλων των υποπληθυσμών ήταν η ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) πριν την πραγματοποίηση των σωματικών μεταλλαγών παρέχοντας ίσως ένα ικανό τρόπο για affinity maturation. Η ίδια έρευνα διαπίστωσε την παρουσία 2 τύπων APCs στα παραπάνω βλαστικά κέντρα:

- 1) Δενδριτικά (Follicular) κύτταρα τα οποία επιλέγουν υψηλής συγγένειας B κύτταρα και
- 2) ένα διαφορετικό καινούριο πληθυσμό δενδριτικών κυττάρων που ενεργοποιούν τα TH κύτταρα των βλαστικών κέντρων.

Οι παραγόμενες τόσο από τα Mφ όσο και από τα TH κύτταρα κυτοκίνες φαίνεται πως δεν αρκούν για μία αποτελεσματική ανοσιακή απάντηση. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες γίνεται λόγος για ανάγκη άμεσων κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και συνδέσεων μέσω επιφανειακών μεμβρανικών μορίων των συμμετεχόντων κυττάρων. Ιδιαίτερης κρίσιμης σημασίας για τις πρωτογενείς και δευτερογενείς θυμοεξαρτώμενες ανοσιακές αντιδράσεις θεωρείται η αλληλεπίδραση του επιφανειακού μορίου CD40 (της οικογένειας του TNF) των APCs με το φυσιολογικό γλυκοπρωτεϊνικό τύπου II δεσμευτή του CD40L ή gp139 (της οικογένειας του TNF) (Counderc *et al.*, 1998) που απαντά στην επιφάνεια των TH κυττάρων (Noelle, 1995, Cordon *et al.*, 1995). Επιτυχής σύνδεση αυτών των μορίων οδηγεί αρχικά σε ενεργοποίηση των TH κυττάρων και μετέπειτα σε παροχή βοήθειας των ενεργοποιημένων πλέον λεμφοκυττάρων στα B κύτταρα.

Μια πιθανή ακολουθία γεγονότων ξεκινάει με την πρόσληψη και την κατεργασία του αντιγόνου από το APC και ακολούθως την παρουσίασή του με τάξης II μόρια του MHC στα παύει Τ κύτταρα. Η αναγνώριση από τον TCR/CD3 σύμπλοκο έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του CD40L στα Τ κύτταρα. Ζευγάριμα του νεοσυντιθέμενου CD40L των TH κυττάρων με το CD40 μόριο της επιφάνειας του APC επιφέρει την έκφραση της συνδιεργετικής δραστηριότητας του APC (έκκριση κυτοκινών). Στο χρόνο αυτό το συνδιεγερτικό σινιάλο που παρέχεται από το APC λαμβάνεται από τα Τ κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης CD28/B7/CTLA-4 η οποία οδηγεί το Τ κύτταρο να εισέλθει σε μιτωτικό κύκλο και σε πλήρη ενεργοποίηση . Το ενεργοποιημένο πια TH μπορεί να προχωρήσει σε άμεση συνεργασία με Β κύτταρα μέσω μιας δεύτερης CD40/CD40L αλληλεπίδρασης, παρέχοντας στα Β κύτταρα τα βοηθητικά σινιάλα που χρειάζονται για αρχική ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, isotype switching και για δημιουργία memory Β κυττάρων με το σχηματισμό των βλαστικών κέντρων (Lipsky *et al.*, 1997, Brugnorn *et al.*, 1995, Noelle, 1995).

Σχετικά πρόσφατες έρευνες μελέτησαν την παρουσία συνδιεγερτικών Τ επιφανειακών μορίων τα οποία μπορούν παράλληλα να σχετίζονται με τη βοηθητική δράση των Τ πάνω στα Β. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, σύνδεση του CD28 με το Β7 δεσμευτή (CTLA-4) ή του CD28 μορίου μπορεί να δημιουργήσει συνδιεγερτικό σινιάλο παροχής βοήθειας από τα Τ για έκκριση ανοσοσφαιρινών από τα Β, το οποίο σχετίζεται και εξαρτάται μόνο μερικώς από την CD40/CD40L αλληλεπίδραση (Kwekkeboom *et al.*, 1994).

Στα ίδια συμπεράσματα απαραίτητης αλλά ανεξάρτητης παρουσίας και των δύο αλληλεπιδράσεων Β7/Β28 και CD40/CD40L για συνεργασία των Τ με τα Β καταλήγει και η εργασία των Wu *et al.*, 1995, ενώ παράλληλα ο Klaus και οι συνεργάτες του έδειξαν το 1994 ότι *in vitro* διέγερση των Τ κυττάρων με α-CD28 έδινε ενεργοποίηση Β κυττάρων μόνο παρουσία της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L προτείνοντας κάποιο αμοιβαίο ενισχυτικό μηχανισμό γι' αυτή την κυτταρική συνεργασία.

Παρόλα αυτά η έκφραση καθενός από τα παραπάνω συνδιεγερτικά μόρια φαίνεται να ελέγχεται και να ρυθμίζεται από αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Για παράδειγμα υπερ-ρύθμιση της έκφρασης του Β7 έχει δειχθεί *in vitro* να προέρχεται άμεσα από την επαφή Β κυττάρων με ενεργοποιημένα Τ ποντικίσια

υβριδώματα μέσω της CD40/CD40L αλληλεπίδραση χωρίς την απαίτηση σύνθεσης TCR με MHC-Ag (Jones *et al.*, 1996, Hollander *et al.*, 1996). Για την έκφραση του CD40L απαιτείται η μεταφορά 2 σινιάλων στα TH κύτταρα: ένα προερχόμενο από το TCR/CD3 σύμπλοκο και ένα δεύτερο από την αλληλεπίδραση των μορίων CD28 και B7 μεταξύ T και APC (de Boer M *et al.*, 1993). Επιπλέον η IL-12 κυτοκίνη παραγόμενη από τα APCs έχει δειχθεί να δρα συνεργατικά με τη B7/CD28 αλληλεπίδραση για τον ίδιο σκοπό. Τα κύτταρα στα οποία παρέχεται IL-12 εμφανίζεται περισσότερο αποδοτική στην προσφορά βοήθειας προς τα B (πολ/σμός, παραγωγή IgG) σε σχέση με τη διέγερση τους χωρίς παρουσία IL-12. Αυτή η βοηθητική ικανότητα μπλοκάρεται στην ύπαρξη α-CD40L mAb υποδηλώνοντας ότι η επίδραση της IL-12 πάνω στα B κύτταρα μεσολαβείται έμμεσα μέσω του CD40L (Peng *et al.*, 1998). Στα παραπάνω ευρήματα δε συνηγορούν τα αποτελέσματα των Ding *et al.*, 1995 σύμφωνα με τα οποία παρατήρησαν επαγωγή του CD40L σε ποντίκια χωρίς έκφραση CD28 μορίου.

Κάποια επίσης μονοπάτια μεταφοράς σήματος, όπως της P1 3 κινάσης, εμφανίζονται σημαντικά στην επαγωγή έκφρασης των κρίσιμων μορίων που αλληλεπιδρούν όπως για παράδειγμα του CD40L (Adgaard *et al.*, 1996).

Η σπουδαιότητα των CD40/CD40L και B7/CD28 αλληλεπιδράσεων στην έναρξη και ωρίμανση της χυμικής θυμο-εξαρτώμενης ανοσιακής απάντησης έχει καταγραφεί κυρίως μετά τη χρήση σε πειραματικές έρευνες μέσω των που μπλοκάρουν τις παραπάνω κυτταρικές διασυνδέσεις μεταξύ B και T κυττάρων. Έτσι ο σχηματισμός βλαστικών κέντρων (πολ/σμός και διαφοροποίηση B κυττάρων) ως απάντηση σε Td αντιγόνα αναστάληκε εντελώς μετά την χορήγηση anti-CD40L ή anti-B7.2 Abs με παράλληλη μείωση των επιπέδων παραγωγής αντισωμάτων καθώς και των άλλων συνοδών λειτουργιών των B κυττάρων (Nishioka *et al.*, 1994, Heinw *et al.*, 1995). Παρόλα αυτά φαίνεται πως οι συνδιεγερτικοί ρόλοι των CD40/CD40L και B7-2/CD28/CTL-4 διαφέρουν μέσα στα βλαστικά κέντρα: παροχή anti-CD40 μία εγκατεστημένη GC αντίδραση, ενώ mAb εναντίον του B7-2 καταστέλλει τις σωματικές μεταλλαγές των Ig μορίων και την είσοδο στη φάση δημιουργίας B κυττάρων μνήμης. Όταν όμως τα B κύτταρα μπουν στο μονοπάτι διαφοροποίησης για παραγωγή αντισώματος ούτε ο CD40L ούτε ο B7-2 θεωρούνται απαραίτητα για την μετέπειτα διαφοροποίηση και παρουσία τους (Hans *et al.*, 1995). Επίσης

και η παροχή anti-CD40 mAb ή της διαλυτής fusion ανθρώπινης πρωτεΐνης D40-FC μπλόκαρε ισχυρά με ειδικό τρόπο και τον πολ/σμό και την έκκριση Ig τόσο από τα ανθρώπινα όσο και από τα ποντικίσια B κύτταρα (Blanchard *et al.*, 1996), ενώ ποντικίσια CD40-/-B κύτταρα εμφανίστηκαν ανίκανοι παρουσιαστές αντιγόνου σε *in vitro* μελέτες με επακόλουθη επαγωγή ανοχής (απουσία πολ/σμού) απέναντι σε αλλοαντιγόνα (Hollander *et al.*, 1996).

Πολλές ανθρώπινες ασθένειες έχουν τη βάση τους σε ανωμαλίες που αφορούν το γενετικό τόπο του CD40L οι οποίες αντανάκλουν στο επίπεδο έκφρασης της CD40/CD40L αλληλεπίδρασης. Ασθενείς με X-linked hyper - IgM σύνδρομο (HIGMX-1) στο CD40L γονίδιο (απουσία έκφρασης λειτουργικής CD40L πρωτεΐνης) εμφανίζουν αδυναμία switch από IgM σε IgG, IgA και IgE προτείνοντας το σημαντικό ρόλο της CD40/CD40L αλληλεπίδρασης στο isotypic switching (Castigh *et al.*, 1995, Bajorathetal , 1995). Τα ίδια φαινόμενα παρατηρούνται και σε ποντίκια με CD40 γονίδιο τα οποία αποτυγχάνουν να υποστούν isotyping switching σε παρουσία θυμοεξαρτώμενου αντιγόνου αλλά απαντούν φυσιολογικά σε θυμό-ανεξάρτητα αντιγόνα.

Η ενισχυμένη ή η μη φυσιολογικά ρυθμιζόμενη έκφραση του CD40L τόσο σε γονιδιακό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο φαίνεται να ενοχοποιείται επίσης σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο ερυθρηματώδης λύκος, κατά τον οποίο μη φυσιολογικά συνδιεγερτικά σιγάλα επάγουν την παραγωγή παθογόνων αυτοαντισωμάτων (Datta *et al.*, 1997, Koshy *et al.*, 1996).

2.2.4.2. Θυμό-ανεξάρτητη ενεργοποίηση B κυττάρων

Ένας μικρός αριθμός αντιγόνων όπως δεξτράνη, φικόλη, μικροβιακοί πολυσακχαρίτες (LPS) με χαρακτηριστική δομή μπορούν να προκαλέσουν χυμική ανοσιακή απάντηση δηλαδή δέγερση B κυτταρικών πληθυσμών για έκκριση ανοσοσφαιρινών, χωρίς να απαιτούν παροχή βοήθειας από τα T κύτταρα. Τα αντιγόνα αυτά καλούνται θυμοανεξάρτητα και οι θεμελιώδεις διαφορές των αντιδράσεων που αυτά προκαλούν σε σχέση με τις θυμοεξαρτώμενες αντιδράσεις αφορούν κυρίως τα παρακάτω στοιχεία:

- Πολυκλωνική διέγερση των B κυττάρων
- Διέγερση για παραγωγή κυρίως IgM
- Αδυναμία πρόκλησης ανοσιακής μνήμης

Είναι προφανές ότι σ' αυτόν τον τύπο θυμο-ανεξάρτητης διέγερσης υπάρχει απουσία συνοδών (accessory) κυττάρων όπως Μφ καθώς και απαίτηση τάξης II μορίων του ΜHC για παρουσίαση του αντιγόνου των οποίων ο ρόλος είναι βασικός και απαραίτητος στις εκ του θύμου προερχόμενες απαντήσεις. Τα πιθανά μοντέλα εξήγησης του τρόπου δράσης των παραπάνω αντιγόνων είναι κυρίως δύο:

Cross – Linking

Η πολυμερής δομή αυτών των μορίων είναι σε θέση να κολλήσει στη μεμβράνη των Β λεμφοκυττάρων και τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή αντισωμάτων.

Διέγερση 2 διαφορετικών τύπων υποδοχέων

Αυτά τα κύτταρα διεγείρουν δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων στα Β λεμφοκύτταρα. Ο ένας τύπος είναι ο μιτωτικός υποδοχέας και είναι αυτός που θα διεγείρει τον πολ/σμό των Β κυττάρων και ο άλλος είναι ο αντιγονικός ειδικός υποδοχέας που θα διεγείρει την παραγωγή της IgM.

2.2.5 Απόπτωση Β κυττάρων.

Αν και η αλληλεπίδραση μεταξύ του CD40 και CD40L έχει δείχθει να προσφέρει θετικά συνδιεγερτικά σιγνάλα στην επιβίωση και στη διαφοροποίηση των Β κυττάρων σε ενεργά ανοσοεκκριτικά κύτταρα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν τη συσχέτιση αυτής της σύνδεσης με γεγονότα που έχουν να κάνουν με υπο-ρύθμιση (down-regulation) της χυμικής ανοσιακής απάντησης. Σύμφωνα με τον Laytraosh, 1988 ο προγραμματισμένος Β κυτταρικός θάνατος μπορεί να ανασταλλεί από τα σήματα επιβίωσης που μεσολαβούνται μέσω της σύνδεσης του CD40 στον CD40L ή στο anti-CD40 mAb, ενώ παράλληλα η συνεργασία της IL-13 με τον CD40L (διεγείρει πολ/σμό και Ig isotype switching σε IgE και IgG) αποτελεί ένα επιπλέον σήμα επιβίωσης αναστέλλοντας δυναμικά την απόπτωση Β λεμφοκυττάρων (Lomo *et al.*, 1997).

Παρά τα παραπάνω ευρήματα Β κυτταρικοί αποπτωτικοί μηχανισμοί θεωρούνται κρίσιμης σημασίας στην μείωση του ανεξέλεγκτου πολ/σμού των Β κυττάρων όπως στην περίπτωση αυτοάνοσων ασθενειών και κακοηθειών που σχετίζονται με Β κύτταρα. Ο Schatter και οι συνεργάτες του έδειξαν το 1996 ότι η σύνδεση του CD40 με το CD40L επιφέρει αύξηση της έκφρασης του Fas

μορίου στην επιφάνεια των Β κυττάρων. Όπως ο CD40L, ο FasL εκφράζεται σε ενεργοποιημένα CD4⁺ TH1 κύτταρα και όταν προσδένεται στο Fas μόριο, ξεκινάει ένα αποπτωτικό σινιάλο για το Β κύτταρο. Έτσι τα CD4⁺ T κύτταρα περιορίζουν την ανάπτυξη αυτόλογων βλαστικών κέντρων Β κυττάρων επάγοντας πρώτα έκφραση του Fas και κατόπιν ένα σήμα κυτταρικού θανάτου με τον FasL.

Ειδικά η έκφραση της ανθρώπινης IgE φαίνεται ότι ρυθμίζεται επιλεκτικά από συγκεκριμένο αριθμό και τύπο κυτοκινών (IL-4, IL-13) καθώς και επιπλέον συνδέσεις επιφανειακών μορίων μεταξύ Β και Τ πέρα της απαραίτητης CD40/CD40L αλληλεπίδρασης (Bonnefoy *et al.*, 1995). Μία τέτοια σύνδεση – βασική στην γέννηση IgE έχει δειχθεί να είναι το CD23/CD21 ζευγάρι, μια και mAbs εναντίον του CD23 ανέστειλαν την παραγωγή ανθρώπινης IgE *in vitro*. Παράλληλα η IgE σύνθεση στον άνθρωπο σχετίζεται και προάγεται από την αύξηση της έκφρασης άλλων μορίων στα Β κύτταρα όπως του ICAM-1 (CD54), CD43, CD18 και CD11a (LFA-1) (Katada *et al.*,).

Κλείνοντας το κομμάτι αυτό θα λέγαμε ότι συνεχώς έρχονται στο φως νέα στοιχεία στο θέμα της συνεργασίας Τ και Β κυττάρων που αφορούν νέα μόρια που μεσολαβούν αυτή την αλληλεπίδραση π.χ. CD4 (Kruman *et al.*, 1996) διατηρώντας όμως την απουσία αντιγονο-ειδικότητας και εξάρτησης της διαδικασίας από τα MHC μόρια που ούτως ή άλλως χαρακτηρίζουν την CD40/CD40L αλληλεπίδραση.

Παραγωγή αντι – αδenoκαρκινικών μονοκλωνικών αντισωμάτων

1.1. Βλεννίνες

Η ανάπτυξη ανοσο-θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου είναι το σημείο αναφοράς για τους περισσότερους ανοσολόγους, αλλά παρά την αλματώδη και καταπληκτική πρόοδο της τελευταίας δεκαετίας, όπως ο προσδιορισμός των καρκινικών αντιγόνων και των επιμέρους αντιγονικών επιτόπων οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δυναμικοί στόχοι, υπάρχουν ακόμα πολλά εμπόδια στην ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής ανοσιακής απάντησης για την καταπολέμηση του καρκίνου. Οι βλεννίνες (ή βλεννίνες) έχουν τον τελευταίο

καιρό προξενήσει αρκετό ενδιαφέρον ως πιθανοί στόχοι για ανοσοθεραπεία στην περίπτωση αδενοκαρκινωμάτων (Apostolopoulos *et al.*, 1996).

Οι βλεννίνες συνιστούν μία οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών υψηλού MB (>200Kd) με υψηλά επίπεδα γλυκοζυλίωσης, τις οποίες απαντούμε φυσιολογικά στην κυτταρική μεμβράνη των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων, των σιελογόνων αδένων, του πεπτικού και αναπνευστικού σωλήνα, των νεφρών, του προστάτη, της ουροδόχου κύστεως, του μαστού και της μήτρας με σκοπό την προστασία τους από παρασιτικούς εισβολείς (Gendler *et al.*, 1988, Ohava *et al.*, 1994). Οι βλεννίνες σε αντίθεση με άλλες γλυκοζυλιωμένες αμινογλυκάνες δείχνουν τεράστια ποικιλομορφία από ελαφρώς γραμμικές έως υψηλά διακλαδιζόμενες δομές, ενώ η πλειοψηφία των γλυκανών είναι O-linked (Peter L-Devine *et al.*, 1992).

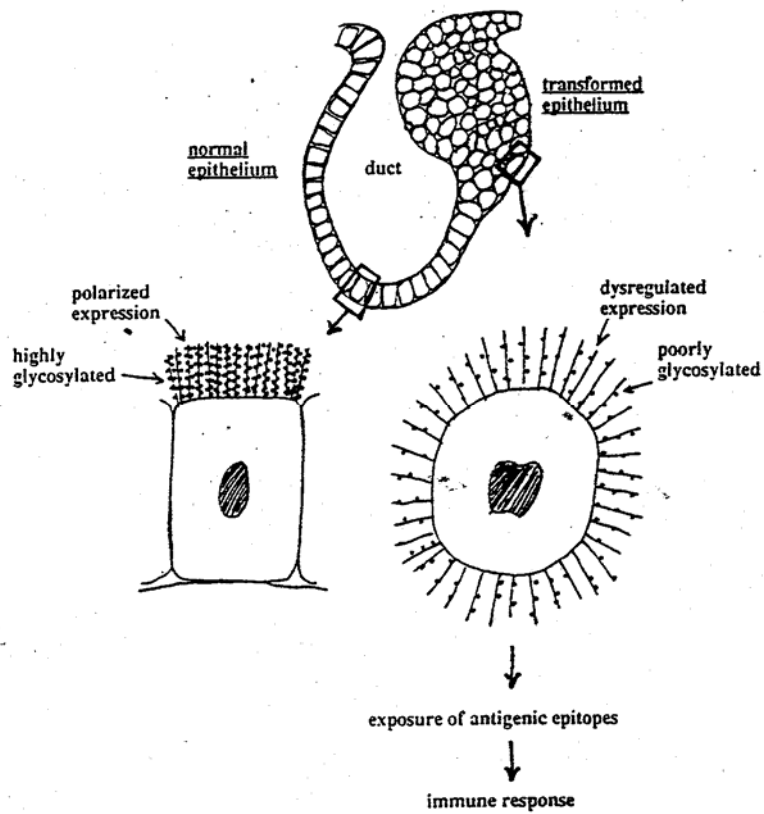
Τέσσερις ανεξάρτητοι γενετικοί τόποι (Human Gene Mapping Nomenclature Committee 1989) προσδιορίστηκαν αρχικά για τις ανθρώπινες βλεννίνες. Αυτοί έχουν ονομαστεί ως Muc1, Muc2, Muc3 και Muc4, ενώ πιο πρόσφατες μοριακές και βιοχημικές μελέτες έχουν τελικά προσθέσει σ' αυτή την οικογένεια 4 επιπλέον γονίδια που κωδικοποιούν τις Muc5A, Muc5B, Muc6 και Muc7 (Seregini *et al.*, 1997). Το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό είναι ότι όλες οι βλεννίνες που παράγονται απ' αυτά τα γονίδια περιέχουν ένα μεταβλητό αριθμό διαδοχικά επαναλαμβανόμενων τμημάτων (repeats) (VNTR) τα οποία φτιάχνουν το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεϊνικής ραφοκοκαλίας. Για το Muc1 τα VNTR κωδικοποιούνται από 60bp, στο Muc2 από 69bp, στο Muc3 από 51bp, στο Muc4 από 48bp και στο Muc5 από 24bp. Ουσιαστικά δεν υπάρχει ομοιότητα στην ακολουθία αυτών των VNTR. Πολλά από τα mAbs που παράγονται αντιδρούν με πεπτιδικές αλληλουχίες της VNTR περιοχής.

Με Northern Blot analysis του m-RNA των παραπάνω γονιδίων έχει μελετηθεί η διαφορετική ποσοτική και ποιοτική έκφρασή τους στους διάφορους επιθηλιακούς ιστούς (Ogata *et al.*, 1992). Για παράδειγμα το Muc1 απαντά στα βλενώδη επιθήλια του μαστού, των νεφρών και του παγκρέατος, το Muc2 και το Muc3 στο έντερο, ενώ το Muc4 και Muc5 βρίσκεται κυρίως στα τραχεοβρογχικά επιθήλια (Apostolopoulos *et al.*, 1995). Άλλες μελέτες αναφέρουν κύρια έκφραση των Muc1, Muc2 και Muc5 στο αναπνευστικό επιθήλιο (Voynow *et al.*, 1994), Muc1, Muc5 και Muc6 στο στομαχικό βλεννογόνο (Ho,SB *et al.*, 1995).

Η συσχέτιση μεταξύ βλεννινών και αδено-καρκινωμάτων έχει μελετηθεί και συνεχίζει να μελετάται εκτενώς. Η πλειοψηφία των δημοσιεύσεων που έχουν ασχοληθεί με το θέμα εντοπίζουν μία αυξημένη σύνθεση και έκκριση συγκεκριμένων βλεννινών την οποία χρησιμοποιούν ως δείκτη καρκινογένεσης στους αντίστοιχους ιστούς (Hollingsworth *et al.*, 1994, Dahiya *et al.*, 1992). Πέρα από το παραπάνω γεγονός οι βλεννίνες που απαντούν στα καρκινικά κύτταρα είναι διαφορετικές σε κάποια σημεία σε σχέση με αυτές που είναι παρούσες στα φυσιολογικά τα οποία αφορούν κυρίως αλλαγμένη ή ατελή γλυκοζυλίωση, που έχει ως συνέπεια δημιουργία ελαττωματικού υδατανθρακικού καλύμματος και έκθεση του πρωτεϊνικού τους σκελετού (Apostolopoulos *et al.*, 1996) (Εικ 3). Επιπρόσθετα πρόσφατες προσεγγίσεις στη μοριακή βιολογία των βλεννινών έχουν δείξει ότι αυτή η ετερογένεια μεταξύ φυσιολογικών και μη οφείλεται επίσης σε διαφορές στον πρωτεϊνικό σκελετό (ραφοκοκαλιά) στον οποίο τα υδατανθρακικά μόρια δένονται. Έτσι λοιπόν όλες οι παραπάνω αλλαγές πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Όπως και στα φυσιολογικά κύτταρα, εμφανίζεται διαφορετική ποιοτική και ποσοτική έκφραση των διαφόρων τύπων βλεννινών στα διάφορα αδено-καρκινώματα : έτσι για παράδειγμα για τις νεοπλασίες του πνεύμονα ενοχοποιείται κυρίως η υπερέκφραση του συνδυασμού Muc1 και Muc4 (Seregni *et al.*, 1996), ενώ στις παγκρεατικές νεοπλασίες το Muc1 (Dahrya *et al.*, 1995). Η έκθεση όμως του πρωτεϊνικού πυρήνα λόγω ατελούς γλυκοζυλίωσης του υδατανθρακικού καλύμματος μας δίνει ένα εργαλείο στα χέρια μας για τη δημιουργία μονοκλωνικών αντισωμάτων που θα αντιδρούν αποκλειστικά με τους εκτεθειμένους πρωτεϊνικούς πυρήνες των μουκινών που εκφράζονται σε καρκινικούς ιστούς, ενώ θα παρατηρείται απουσία ειδικής αντίδρασης στα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα ότι κάποιοι επίτοποι των μουκινών μπορούν να δράσουν – εκτός από στόχους των mAbs – και ως δείκτες του καρκινικού σταδίου.

Η δυνατότητα κλωνοποίησης των cDNA των πρωτεϊνικών πυρήνων των διαφόρων βλεννινών και η αποκάλυψη των αμινοξικών τους αλληλουχιών, οδηγεί συνεχώς στη δημιουργία συνθετικών πεπτιδίων από την VNTR περιοχή τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μόνα τους είτε σε συνεργασία με άλλα μόρια ως αντιγονικοί επίτοποι για ανοσοποιήσεις. Ο προσδιορισμός των πεπτιδικών



Εικ.3. Σχηματική παρουσίαση της έκφρασης της ανθρώπινης Muc1 βλεννίνης σε φυσιολογικό και 'μετασχηματισμένο' εντερικό επιθήλιο.

επιτόπων των μουκινών που σχετίζονται με τον καρκίνο έχει παρεμποδιστεί από τη φύση του υλικού ανοσοποίησης. Χρησιμοποιώντας αυτήν την προσέγγιση πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν την παραγωγή ποντικίστων μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν συνθετικούς πεπτιδικούς επίτοπους ανθρώπινων βλεννινών που απαντούν σε διάφορα αδenoκαρκινώματα.

Μία τέτοια περίπτωση είναι τα mouse α-human VA1 και -VA2 mAbs (α-Muc1) τα οποία αντιδρούν ειδικά μόνο με κακοήθη κύτταρα μαστού και τα οποία προήλθαν *in vivo* μετά από ανοσοποίηση του ζώου με τη glutathione - S - transferase - Muc1 βακτηριακή fusion πρωτεΐνη (Apostolopoulos *et al.*, 1993). Άλλες έρευνες αναφέρουν τα CCP31, CCP37, CCP58 mouse α-human (α-Muc2) IgG mAbs με ειδικότητα αναγνώρισης μόνο Muc2 επιτόπων σε κακοήθεις περιπτώσεις εντέρου (παχέως και λεπτού) αλλά ενίοτε και σε φυσιολογικό ιστό (πεπτίδιο ανοσοποίησης MI-29-KLH) (Pei-Xiang Xing *et al.*, 1992), ενώ ανάλογα παραδείγματα υπάρχουν και για mAbs δεύτερης γενιάς (IgG) εναντίον των Muc3 (Apostolopoulos *et al.*, 1995) και Muc4 (Pei-Xiang Xing *et al.*, 1997).

Αξιοσημείωτη και ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μπορεί να θεωρηθεί η περίπτωση χορήγησης του πεπτιδίου συζευγμένου με κάποιο φορέα και παρουσία ποικιλίας βοηθητικών μορίων προκειμένου να προκληθεί η επιθυμητή ανοσολογική απάντηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η mannan, μία πολυμανόζη απομονωμένη από το κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων η οποία θεωρείται ένας πολύ αποτελεσματικός πρωτεϊνικός φορέας για την πρόκληση κυτταρικών ή χυμικών ανοσιακών απαντήσεων εξαρτώμενων από τον τρόπο της σύζευξης (οξειδωτικό ή αναγωγικό). Αυτό το μόριο έχει συζευχθεί από τη Vasso Apostolopoulos, 1996 και τους συνεργάτες της με Muc1 αντιγονικό επίτοπο και αυτή τη στιγμή ήδη βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές προκειμένου να εκτιμηθεί η αντιγονικότητα του Muc1 και η καταλληλότητα αυτού του τρόπου σύζευξης του ανοσογόνου μορίου για ανοσοθεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού.

1.2. *In vitro* ανθρώπινη αντιγόνο-ειδική ανοσοποίηση

Η ενεργοποίηση και απομόνωση ανθρώπινων αντιγόνο-ειδικών υβριδωμάτων ικανών να παράγουν τα εκάστοτε ειδικά υψηλής συγγένειας αντισώματα αποτελεί ευσεβή πόθο και προσδοκία τόσο της βασικής όσο και της

εφαρμοσμένης ιατρικής επιστήμης. Η χρήση διαφόρων αντιγονικών πεπτιδίων για *in vivo* ανοσοποιήσεις σε άνθρωπο με παράλληλη παρακολούθηση της εξέλιξης της διαδικασίας, τίθεται κάτω από δεοντολογικούς φραγμούς και είναι πρακτικά μη εφικτή.

Το μόνο εργαλείο λοιπόν που υπάρχει αυτή τη στιγμή στα χέρια μας είναι η όσο το δυνατόν καλύτερη κατανόηση της *in vivo* θυμοεξαρτώμενης χυμικής ανοσιακής απάντησης, που αφορά τους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς (Μφ, Β, Τ), τα σήματα ενεργοποίησης, διαφοροποίησης και επιβίωσής τους, το είδος συνεργασίας που υφίσταται μεταξύ τους (αλληλεπιδράσεις υποδοχέων – δεσμευτών, κυτοκίνες) και τελικά την παραγωγή αντισωμάτων διαφόρων ισοτύπων (isotype switching) και υψηλής συγγένειας (affinity maturation) ως προς τον αντιγονικό επίτοπο που αναγνωρίζουν. Η γνώση αυτή σε συνεργασία με την παροχή των επιθυμητών συνθετικών πεπτιδίων ανοίγουν το δρόμο για *in vitro* συστήματα ανοσοποίησης τα οποία θα μιμούνται με τον καλύτερο δυνατό τρόπο το *in vivo* σύστημα. Μέχρι τώρα οι *in vitro* τεχνολογίες ανοσοποίησης έχουν σχεδόν αποκλειστικά οδηγήσει μόνο σε παραγωγή αντιγόνου-ειδικών IgM αντισωμάτων με μικρές έως ενδιάμεσες συγγένειες προς το αντιγόνο ανοσοποίησης (Borrebaeck *et al.*, 1988a, 1988b) τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως προϊόντα μιας πρωτογενούς ανοσιακής απάντησης.

Ως γνωστό για να προκληθεί ανοσιακή απάντηση χρειάζονται τουλάχιστον δύο επίτοποι εκ των οποίων ο ένας θα διεγείρει τα Β λεμφοκύτταρα και ο άλλος τα Τ. Λόγω του ότι τα Μuc πεπτιδία θεωρούνται αντιγόνα εαυτού που φυσιολογικά απαντώνται στα βλεννώδη επιθήλια, ο οργανισμός έχει οδηγήσει σε απόπτωση όλους τους αντιγόνο-ειδικούς για Μuc Τ κλώνους ήδη από την περίοδο ωρίμανσης των Τ κυττάρων στο θύμο. Για προφανείς λόγους η αναζήτηση τέτοιων ειδικών Τ κυττάρων στην περιφέρεια δεν υφίστανται. Για το λόγο αυτό έγινε χρήση συνθετικών αντιγονικών πεπτιδίων που πέρα από το Β καθοριστή (Muc2, Muc3, Muc4) περιελάμβαναν και έναν αντιγονικό επίτοπο από τη τοξίνη του τετάνου pTT (aa 830-840) ο οποίος λειτούργησε ως TH καθοριστής. Έτσι η αποτελεσματική βοήθεια από τα Τ κύτταρα μπορεί να επιτευχθεί με την εμπλοκή αυτού του βοηθητικού επιτόπου της πρωτεΐνης του Τετάνου ο οποίος έχει δείχθει να αντιδρά μ' ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών MHC-τάξης II αλληλίων (O' Sullivan *et al.*, 1991). Επιπλέον η συχνότητα απάντησης TH κυττάρων μνήμης για πολλούς επίτοπους της παραπάνω πρωτεΐνης στον

άνθρωπο θεωρείται ιδιαίτερα υψηλή, οπότε η πιθανότητα συνάντησης και αλληλεπίδρασης ενεργοποιημένων τέτοιων αντιγονο-ειδικών κλώνων με τα αντίστοιχα B αντιγόνο-ειδικά κύτταρα για πρόκληση δευτερογενούς απάντησης στο *in vitro* σύστημα, είναι εξαιρετικά αυξημένη.

Στο *in vitro* μοντέλο ανοσοποίησης που θα περιγραφεί παρακάτω έγινε προσπάθεια παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων υψηλής συγγένειας που θα αναγνωρίζουν συγκεκριμένους επίτοπους των αντιγονικών πεπτιδίων Muc2, Muc3 και Muc4 και ουσιαστικά στηρίχθηκε με κάποιες τροποποιήσεις στο μοντέλο που αρχικά διατυπώθηκε από τους Zafiroopoulos *et al.*, 1997. Το σύστημα δίνει βάση στην επιλεκτική ενεργοποίηση των αντιγονο-ειδικών TH κυτταρικών κλώνων (T-cell activation) και στη 2 σταδίων ενεργοποίηση του ειδικού B κυτταρικού πληθυσμού [1/γενής (primary) και 2/γενής (secondary) ανοσοποίηση], προσαρμόζοντας σε *in vitro* κατάσταση τα σήματα που φυσιολογικά απαντούν στις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στα δευτερογενή βλαστικά κέντρα *in vivo*.

T-cell activation

Με την επίδραση κατάλληλου αντιγονικού ερεθίσματος σε καλλιέργεια B, T και Mφ ως APCs, διεγείρεται η διαφοροποίηση και ο πολ/σμός των αντιγόνο-ειδικών T κλώνων.

Primary immunization

Τα B κύτταρα έρχονται για πρώτη φορά σε επαφή με το ανοσογόνο, παρουσία διαλυτών παραγόντων που εκκρίνονται από T πολυκλωνικά ενεργοποιημένα κύτταρα (TRF) και απαντούν κυρίως με την παραγωγή μόνο IgM ανοσοσφαιρινών χαμηλής συγγένειας δίχως ικανότητα αλλαγής ισοτύπου (ανάλογη της πρωτογενούς *in vivo* απάντησης).

Secondary immunization

Πρόκληση σύζευξης μεταξύ αντιγονο-ειδικών TH κλώνων (από T-cell activation) και των αντίστοιχων ειδικών B κυττάρων (primary immunization) σε παράλληλη καλλιέργεια παρουσία CD32-transfected ινοβλαστών και α-CD40 mAb ως επιπλέον διεγέρτες επιβίωσης του B κυτταρικού πληθυσμού και απουσία συνοδών κυττάρων (Mφ ως APCs). Το αντιγονικό ερέθισμα χορηγείται δευτερογενώς και η επιθυμητή σειρά γεγονότων έχει ως εξής:

Το B κύτταρο πρέπει να δράσει ως αντιγονο-παρουσιαστής βγάζοντας στην επιφάνειά του τον αντιγονικό επίτοπο συνδεδεμένο με το τάξης II μόριο του

MHC, να αναγνωρισθεί από το ειδικό TCR-CD3 σύμπλοκο του TH και να προωθηθεί το επόμενο βήμα ενεργοποίησης και επιβίωσης του αντιγονο-ειδικού B κυττάρου με την ανάπτυξη των CD40L/CD40 και B7/CD28 αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Στο *in vivo* σύστημα η CD40L/CD40 σχέση θεωρείται - όπως ήδη αναφέρθηκε - υπεύθυνη για το affinity maturation και το Ig switching των παραγόμενων ανοσοσφαιρινών, οπότε κάποιο ανάλογο φαινόμενο αναμένεται και στο *in vitro*.

Στο σύστημα κρίθηκε απαραίτητη η χρησιμοποίηση του Epstein - Bar ιού (EBV) μια και θεωρείται ο μόνος μέχρι τώρα γνωστός ιός που αθανатоποιεί (immortalize) ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα με ιδιαίτερη προτίμηση στους ενεργοποιημένους κλώνους (Aman *et al.*, 1984). Οι EBV - αθανатоποιημένες B κυτταρικές σειρές είναι αρχικά πολύκλωνες και εκκρίνουν όλες τις κύριες τάξεις ανοσοσφαιρινών. Μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια *in vitro*, οι παραπάνω σειρές γίνονται ολιγόκλωνες ή μονόκλωνες αντανάκλωντας την ανάπτυξη μόνο των επιλεγμένων B κυτταρικών κλώνων.

Η παραγωγή σταθερών ανθρώπινων υβριδωμάτων που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες είναι ουσιαστικά και πρακτικά περισσότερο δύσκολη απ' ότι στο ποντίκι ή στον αρουραίο. Παρόλα αυτά έγινε προσπάθεια χρησιμοποίησης κάποιων από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (KR-12) (Thomas *et al.*, 1988), οι οποίες είναι διαθέσιμες ως 'fusion partners', αν και βιβλιογραφικά δεδομένα δεν τις παρουσιάζουν ως ιδανικές λύσεις λόγω του ότι εκκρίνουν χαμηλά ποσά ανοσοσφαιρίνης, έχοντας χαμηλότερο βαθμό συγκόλλησης απ' ότι τα αντίστοιχα ποντικίσια (James and Bell, 1987). Δυσκολίες επίσης εντοπίζονται και στη διατήρηση των υβριδωμάτων μια και παρουσιάζονται ευάλωτα στην καταπίεση από άλλους μη ειδικούς κλώνους και ασταθή στη θερμοκρασία ψύξης τους (π.χ. -20°C).

Συνοψίζοντας, το σύστημα που περιγράφηκε χαρακτηρίζεται από απουσία κυτοκινών ή άλλων μορίων τα οποία μπορούν να μεσολαβούν τα σήματα που τα ίδια τα κύτταρα μπορούν να παρέχουν. Βασικός σκοπός είναι η όσο το δυνατό επιτυχής επαφή των συμμετεχόντων κυτταρικών πληθυσμών με ανάπτυξη των μεταξύ τους ολοκληρωμένων αλληλεπιδράσεων προκειμένου να πάρουμε τα ανάλογα με το *in vivo* σύστημα επιθυμητά αποτελέσματα. Η επίτευξη παραγωγής ανθρώπινων αντι-αδενοκαρκινικών αντισωμάτων με υψηλής ποιότητας χαρακτηριστικά (ειδικότητα, συγγένεια), αποτελεί το πρώτο τμήμα

της δικιάς μας ανοσο-θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου. Εν συνεχεία αυτά τα ίδια τα αντισώματα μπορούν να χορηγηθούν απευθείας *in vivo* – πιθανώς σε σύζευξη με ραδιενεργά μόρια – για μαζική, ειδική και αποτελεσματική καταπολέμηση των κακοήθων κυττάρων.

ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κυτταρικές σειρές και θρεπτικά μέσα καλλιέργειας.

1.1. Ανθρώπινα PBMC (peripheral blood monocytes)

Ως πηγές προέλευσής τους χρησιμοποιήθηκαν buffy coats από υγιείς οροαρνητικούς για HIV και για ηπατίτιδα Β δότες προερχόμενα από την τράπεζα αίματος του Βενιζελείου Νοσοκομείου Κρήτης. Τα στάδια απομόνωσης περιέλαβαν μία αρχική φυγοκέντρηση των buffy coats στις 3000 rpm για διαχωρισμό της λευκής στοιβάδας κυττάρων (λευκά αιμοσφαίρια) η οποία εν συνεχεία καθαρίστηκε περνώντας από κλινές καθαρής (100%) φικόλης (Pharmacia Biotech) με φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 30 min.

1.2. Ινοβλάστες

Ινοβλάστες ποντικίσιας προέλευσης (ATCC no CRL – 10680) με σταθερή επιφανειακή έκφραση του CD32 μορίου χρησιμοποιήθηκαν – αφού πρώτα ακτινοβολήθηκαν στα 10,000 rad για παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού τους – κατά τη δευτερογενή ανοσοποίηση, ως σηματοδότες επιβίωσης και στήριξης των B κυττάρων.

1.3. Καρκινικές κυτταρικές σειρές

Ευγενής προσφορά της Dr. Vasso Apostolopoulos (Austin Research Institute, Australia) ήταν οι κυτταρικές σειρές HT29, LIM2412 από καρκίνο παχέως εντέρου με έκφραση κυρίως Muc3 αλλά και Muc2 και η T47D από καρκίνο μαστού με έκφραση Muc1 και λιγότερο Muc3 (Apostolopoulos et al., 1995, Devin et al., 1992). Οι σειρές αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε FACs ανάλυση για ανίχνευση της πρόσδεσης αντιγόνου – αντισώματος.

Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των PBMC ήταν RPMI 1640 (GIBCO) εμπλουτισμένο με 4mM L-glutamine, μη απαραίτητα αμινοξέα, sodium pyruvate, 50μg gentamycin (GIBCO) και διαφορετικές συγκεντρώσεις (ανάλογα με το στάδιο ανοσοποίησης) θερμικά απενεργοποιημένου (heat-inactivated) ανθρώπινου ορού (HS) ή Εμβρυϊκού Βόιου ορού (FBS) (GIBCO). Ο ανθρώπινος ορός (HS) ελήφθη από τη Μονάδα Αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου Κρήτης.

Όλες οι καρκινικές σειρές μεγάλωσαν σε RPMI 1640 με 2mM glutamine, 100Units/ml penicillin, 10μg/ml streptomycin (GIBCO) και 10% FCS.

2. Αντιγόνα

Οι *in vitro* ανοσοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν με 3 ανεξάρτητα Muc ετεροπεπτίδια τα οποία συντέθηκαν χρησιμοποιώντας καθορισμένη F-moc/tBu χημική μέθοδο. Καθένας από τους παραπάνω ετερότοπους περιείχε ένα δεκαπενταπεπτιδίο (pTT) της Τοξίνης του Τετάνου (αα 830-844) και από ένα Muc πεπτιδίο το οποίο μπορεί να ήταν:

- Muc2 23/μερες (TTTPITTTTTVTRPTPTGTQTP)
- Muc3 17/μερές (TSSITTTGTTSHSTPSP)
- Muc4 16/μερές (VTDTSSASTGHATPLP)

Μεμονωμένο το pTT χρησιμοποιήθηκε στη ενεργοποίηση των T κυττάρων και στις δοκιμές πολλαπλασιασμού τους παράλληλα με ολόκληρο το τοξοειδές, ενώ τα Muc2, Muc3, Muc4 αλλά και Muc1 πεπτιδία στις ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA). Το Muc1 πεπτιδίο είναι ένα 20/μερές με αμινοξική αλληλουχία PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP. Επιπλέον τα πεπτιδία HIV15 (δεκαπενταπεπτιδίο που αντιπροσωπεύει τα αμινοξέα 309-323 της gp120 του HIV-1 LAI) και PIP2 χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως πιθανά αρνητικά CNTR σε πειράματα ειδικότητας των παραγόμενων αντισωμάτων κατά την παραπάνω μέθοδο.

3. Αντισώματα

Για FACs ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές (FITC και PRE) μονοκλωνικά αντισώματα, a-human CD19, a-human CD40 και a-human IgG (DAKO). Ανάλογα ενζυμικά συζεύγματα Goat a-human IgG – Alkaline Phosphatase, Goat a-human IgM – Alkaline Phosphatase (Binding Site) και a-human IgG – HRP χρησιμοποιήθηκαν και στις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Για τη μέτρηση συνολικής IgM ή IgG οι ειδικές ELISA πλάκες επιστρώθηκαν αρχικά με a-human IgM ή a-human IgG (Binding Site) αντίστοιχα. Το a-CD40 (κλώνος S₂C₆) θεωρήθηκε απαραίτητο συστατικό προστιθέμενο στοιχείο κατά τη δευτερογενή ανοσοποίηση.

4. LLO-Me κατεργασία PBMC – Καθαρισμός Μφ.

Μετά το πέρασμα από κλινές πυκνότητας φικόλης τα PBMC πλύθηκαν 3 φορές με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) και το μεγαλύτερο μέρος αυτών κατεργάστηκε με το Μεθυλεστέρα της διλευκίνης (L-Leucyl-L- Leukine methylester hydrobromide) (Bachem). Η επεξεργασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την απομάκρυνση πληθυσμών πέρα των TH και B όπως Tc, Μφ, NK κ.τ.λ. Η επώαση με τον LLO-Me έγινε για 15min παρουσία RPMI 5% HS σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ μετά τα πλυσίματα τα κύτταρα επώαστηκαν στο παραπάνω θρεπτικό υλικό σε 75 ή 162cm² φλάσκες καλλιέργειας στους 37⁰ C παρουσία DNAσης (10μg/ml) (Boehringer) για 2 ώρες τουλάχιστον.

Τα κύτταρα που δεν υπέστησαν την κατεργασία με το μεθυλεστέρα ακτινοβολήθηκαν για 30sec με 3000rad ακτινοβολίας προκειμένου να παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός τους μέσα στην καλλιέργεια ώστε η αύξησή τους να μην αλλοιώνει τον LLO-Me κατεργασμένο καθαρό λεμφοκυτταρικό πληθυσμό και ως εκ τούτου τα στατιστικά δεδομένα. Ο περιεχόμενος στο παραπάνω κυτταρικό διάλυμα πληθυσμός Μφ τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα τροφοί ('feeder cells') και APCs, απομονώθηκε από τους άλλους παρευρισκόμενους πληθυσμούς παρέχοντας του το χρονικό διάστημα προσκόλλησης (1-2hrs στους 37⁰ C) στο πυθμένα των φλασκών και των πλακών καλλιέργειας παρουσία RPMI 5% HS. Με το τέλος της επώασης το στρώμα των κολλημένων Μφ πλύθηκε κατ' επανάληψη με θρεπτικό υλικό για απομάκρυνση των αιωρούμενων κυττάρων και τελικά αφέθηκε σ' αυτό παρουσία επιπλέον 50μM 2-μερκαπτοαιθανόλης ως αντιοξειδωτικού μέσου.

5. Επιλογή Τετανο-ειδικών δοτών.

Η επιθυμητή εκλεκτική χρήση μόνο PBMC που έφεραν τετανοειδικά T κύτταρα μνήμης οδήγησε σε έλεγχο όλων των δοτών απ' όπου ελήφθησαν τα buffy coats. Για το λόγο αυτό στήθηκαν καλλιέργειες 200μl ακτινοβολημένων Μφ (2x10⁶κύτταρα/ml) και LLO-Me κατεργασμένων λεμφοκυττάρων (2x10⁶κύτταρα/ml) σε πηγάδια 96-well plate (Costar ή TPP) παρουσία Tetanus Toxoid ή pTT (και τα δύο 1μg/ml) σε RPMI 5% HS για 3 ημέρες στους 37⁰ C. Το τελευταίο 18ωρο της επώασης προστέθηκε Τριτωμένη θυμιδίνη (³H)

(Amersham) σε αραιώση 1/10. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε διηθητικά φίλτρα (Filter MAT, Skatron Instruments) και μετρήθηκαν μέσα σε scintillation liquid (ICS) σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Ο αριθμός των κρούσεων ανά λεπτό (cpm/min) αντανάκλα την πολλαπλασιαστική διέγερση των T ειδικών κλώνων του κάθε δότη που επέρχεται μετά την δεύτερη επαφή με το ίδιο αντιγόνο.

6. Ενεργοποίηση T- λεμφοκυττάρων.

Η ενεργοποίηση των τετανο-ειδικών T λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες 10^6 ακτινοβολημένων και πλυμένων Mφ /ml και 10^6 LLO-Me κατεργασμένων λεμφοκυττάρων/ml σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 παρουσία 5% HS, 50mM 2-Mercaptoethanol και 1μg/ml pTT για 6 ημέρες.

7. Πρωτογενής Ανοσοποίηση.

3×10^6 LLO-Me κατεργασμένα λεμφοκύτταρα/ml καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας για 6 ημέρες αφού πρώτα ανοσοποιήθηκαν πρωτογενώς με 7nM των ετερότοπων pTT-(Muc2, Muc3 ή Muc4) μέσα σε RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% HS, 50μM 2-mercaptoethanol, 5U/ml rIL-2 και 25% T cell Replacing Factor (TRF). Σ' αυτό το χρονικό διάστημα των 6 ημερών γινόταν σταδιακή προσθήκη θρεπτικού υλικού στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη (κιτρίνισμα της καλλιέργειας λόγω εκτενούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού). Το στάδιο αυτό είχε ως στόχο την πολυκλωνική ενεργοποίηση ολόκληρου του κυτταρικού πληθυσμού ευνοώντας ιδιαίτερα τα Muc - ειδικά B κύτταρα.

8. Δευτερογενής Ανοσοποίηση.

Η στρατηγική της δευτερογενούς ανοσοποίησης ήταν να επιτευχθεί η άμεση επαφή μεταξύ των pTT- ειδικών $CD4^+$ κυττάρων και των πρωτογενώς ενεργοποιημένων Muc – ειδικών B κυττάρων. Γι αυτό τόσο τα κύτταρα της πρωτογενούς καλλιέργειας όσο και τα pTT T ενεργοποιημένα κύτταρα αφού καθαρίστηκαν και πλύθηκαν περνώντας από 40% κλινές πυκνότητας φικόλης καλλιεργήθηκαν μαζί σε φλάσκες καλλιέργειας σε συγκεντρώσεις $0,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml και $0,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml αντίστοιχα, πάνω από στρώμα

ακτινοβολημένων ινοβλαστών με δευτερογενή παρουσία των pTT-Muc(2,3,4) ετερότοπων. Η καλλιέργεια έγινε σε RPMI 1640 με 5% HS, 50mM 2-mercaptoethanol και 500mg anti-CD40 (S₂S₆)/ml για 4-6 ημέρες.

Μετά το πέρας της 2/γενούς ανοσοποίησης έγινε επιμόλυνση των Β κυττάρων με Epstein Bar Virus (EBV) για αθανатоποίηση των Β κλώνων και ιδιαίτερα των αντιγονο-ειδικών προωθώντας τα παράλληλα να εκκρίνουν την ειδική ανοσοσφαιρίνη. Συγκεκριμένα μετά το καθαρισμό της δευτερογενούς καλλιέργειας προστέθηκε για κάθε 10⁷ κύτταρα 1 ml υπερκείμενο καλλιέργειας της B95-8 marmocet κυτταρικής σειράς (ATCC Number: CRL-1612) και επώαστηκαν για 2 ώρες με περιοδική ανακίνηση στους 37⁰ C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από διπλό πλύσιμο και στρώθηκαν σε συγκέντρωση 10⁵ κύτταρα/ml (200μl) πάνω από ακτινοβολημένα και πλυμένα Μφ (10⁴ κύτταρα/ml) σε πηγάδια 96-well plate, παρουσία RPMI 1640 10%FBS. Ο έλεγχος για παραγωγή αντισώματος έγινε μετά το πέρας 3-4 εβδομάδων.

9. Συμπύκνωση ανοσοσφαιρινών

9.1. Καθίζηση με Θεικό αμμώνιο (NH₄SO₄)

Με βάση τον πίνακα που δείχνει το ποσό του στερεού NH₄SO₄ που απαιτείται για να φέρει μία διάλυση γνωστής αρχικής συγκέντρωσης κορεσμού σε μια επιθυμητή τελική συγκέντρωση κορεσμού(40%), προστέθηκαν 22,6 gr NH₄SO₄ ανά 100ml υπερκειμένου καλλιέργειας για κατακρήμνιση μόνο των ενυπάρχοντων αντισωμάτων. Η διάλυση έγινε Ο/Ν στους 4⁰ C και μετά από φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές η συλλεγμένη πρωτεΐνη υπέστη membrane dialysis σε PBS 1X για απομάκρυνση του NH₄SO₄.

9.2. Συμπύκνωση μέσω διηθητικής μεμβράνης

Συμπύκνωση υπερκειμένων καλλιέργειας έγινε και με το υπό ανάδευση πέρασμα του υλικού από διηθητική μεμβράνη (DIAFLO, Ultrafiltration Membranes, PM30 43mm) η οποία επιτρέπει την έξοδο πρωτεϊνών με MB μικρότερο του 30000 κατακρατώντας τις περιεχόμενες ανοσοσφαιρίνες.

10. Καθαρισμός ανοσοσφαιρινών (IgG)

Η απομόνωση των IgG κλασμάτων έγινε χρησιμοποιώντας Χρωματογραφία Συγγένειας. Από πακεταρισμένη Protein-A-Sepharose CL-4B κολώνα πέρασαν αρχικά 2-3 όγκοι 50mM ρυθμιστικού δ/τος KH_2PO_4 και Tris, PH:8,1 (loading buffer) προκειμένου να γίνει το στανταρισμά της. Το δείγμα αραιώθηκε 1:1 με το ίδιο buffer και μετά από προσθήκη 50 Units/ml Aprotinin (αναστολέας πρωτεασών) πέρασε από την κολώνα αργά και με αρκετές επαναλήψεις. Η έκλουση έγινε με την προσθήκη 3-4 όγκων 1M Acetic acid και η εξουδετέρωση του λαμβανόμενου θετικού κλάσματος με Triethanolamine (7,5M αραιωμένη 1:2 με H_2O). Το κλάσμα μετρήθηκε στα 280nm για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IgG και κατόπιν υπέστη membrane dialysis σε PBS 1X..

11. ELISA

Ο έλεγχος των υπερκείμενων καλλιέργειας αμέσως μετά το EBV αλλά και σε μετέπειτα στάδια καλλιέργειας έγινε με ELISA assay. Συγκεκριμένα 96-well plates (Costar) στρώθηκαν ανάλογα με τα πεπτίδια Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, pTT, HIV15, PIP2 σε συγκέντρωση 1μg/ml μέσα σε Coating buffer (0,05M NaHCO_3 , 0,05M Na_2CO_3) PH:9,8 και επώαστηκαν Ο/Ν στους 4⁰ C. Ακολούθησε φραγμός (blocking) των κενών θέσεων της στερεάς φάσης με PBS-BSA 1% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα καλυμμένα πιάτα μετά από τριπλό πλύσιμο με dH_2O 0,05% Tween-20 επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37⁰ C με τα παραπάνω υπερκείμενα, αφού έγινε κάθε φορά η επιθυμητή αραιώση σε assay buffer (0,1% PBS-BSA).

Με το πέρας της επώασης τα πιάτα ξαναπλύθηκαν 3 φορές και τους έγινε προσθήκη goat a-human IgM ή - IgG αντισωμάτων συζευγμένων είτε με Αλκαλική Φωσφατάση (αραιώση 1/1000 σε assay buffer) είτε με υπεροξειδάση (HRP) (αραιώση 1/4000 σε assay buffer) ανάλογα με τον ισότυπο ανοσοσφαιρίνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Η επώαση έγινε στους 37⁰ C για 1 ώρα, ενώ μετά από πλύσεις προστέθηκε το ανάλογο για το συζευγμένο ένζυμο υποστρώμα. Έτσι, για την Αλκαλική Φωσφατάση χρησιμοποιήθηκε 1mg/ml ειδικού υποστρώματος (Sigma), ενώ για την HRP δ/μα χρωμογόνου και υποστρώματος σε αναλογία 1:1. Η αντίδραση συνεχίστηκε μέχρι να φανεί

σήμα (χρώμα) και σταμάτησε με 50μl 3N NaOH για την φωσφατάση και με 50μl 4N H₂SO₄ για την HRP. Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε ELISA reader στα 415nm και στα 450nm αντίστοιχα.

Ειδικά για τον προσδιορισμό της συνολικής IgG και IgM, maxisorp πιάτα στρώθηκαν αρχικά με 1μg/ml α-human IgG και α-human IgM αντίστοιχα και επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω.

12. FACS analysis

Με χρήση του κυτταρομετρητή ροής (FACScan, Becton Dickinson) και του υπολογιστικού προγράμματος CellQuest προσδιορίστηκε το ποσοστό των B κυττάρων που φέρουν επιφανειακή έκφραση sIgG (α-human IgG-FITC) καθώς επίσης μελετήθηκε και η παρουσία ή όχι πρόσδεσης των παραγόμενων α-Muc αντισωμάτων (μετά τον καθαρισμό με Pr-A), τόσο σε κυτταροπλασματικά όσο και επιφανειακά αντιγόνα των καρκινικών σειρών που αναφέρθηκαν. Μελέτη επίσης έγινε και στο ποσοστό των B κυττάρων που συνεχίζουν να εκφράζουν και μετά την επιμόλυνση με τον EBV CD40 μόριο στην επιφάνειά τους.

Η κατεργασία των κυττάρων για ανίχνευση επιφανειακών δεικτών (CD19, CD40, sIgG) περιέλαβε αρχικό πλύσιμο 2-5x10⁵ κυττάρων με 2% normal goat serum (NGS)-PBS και προσθήκη από 5λ των κατάλληλων συζευγμένων με FITC ή PRE αντισωμάτων επώαζοντας στον πάγο για 30min. Για ανίχνευση της πρόσδεσης α-Muc αντισώματος σε επιφανειακά αντιγόνα των καρκινικών σειρών έγινε επιπλέον επώαση των κυττάρων για 30min σε πάγο με τα α-Muc αντισώματα. Με το πέρας του χρόνου των επώασεων τα κύτταρα ξαναπλύθηκαν με PBS και αναλύθηκαν.

Για ανίχνευση ενδοκυτταρικών συνδέσεων αντιγόνου-αντισώματος (πρωτόκολλο Krouwels et al., 1997), 2-5x10⁵ κύτταρα από τις προαναφερθείσες καρκινικές σειρές πλύθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 150λ PBS. Κατόπιν 50λ PFA (4% w/v) προστέθηκαν στην κυτταρική πελέτα και επώαστηκαν για 10min. Το blocking πραγματοποιήθηκε με 10% NGS-PBS για 10min, ενώ το άνοιγμα των κυτταρικών μεμβρανών με 0,1% Saponin-PBS. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν σε πάγο, ενώ κατόπιν ακολούθησε η επιμέρους προσθήκη του πρώτου

και δεύτερου αντισώματος με την προαναφερθείσα για τα επιφανειακά αντιγόνα διαδικασία.

13. Ανοσοιστοχημεία

Ως στόχοι αντιγονο-ειδικής πρόσδεσης των παραγόμενων από τις ανοσοποιήσεις αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν τομές καρκινικών ή μη ιστών πάχους 2μm σε μικροτόμο. Το φάσμα των ιστών κάλυπτε καρκίνο παχέως εντέρου, μαστού, λεμφαδένων και φυσιολογική σκωληκοειδή απόφυση, ευγενή προσφορά του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η διαδικασία χρώσης περιέλαβε:

- Ξέπλυμα των πλακιδίων (Super Frost) με dH₂O και εμβάπτιση σε TBS (PH: 7,6)
- Επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου με το αντίστοιχο μονοκλωνικό (X901, Normal swine serum, DACO) ή πολυκλωνικό (X902, Normal rabbit serum, DACO) αντίσωμα σε αραιώση 1/20.
- Κάλυψη των τομών με το ειδικό αντίσωμα (α-Muc) σε μη αραιωμένη μορφή με παράλληλη προσθήκη υγρής BSA 1% σε TBS. Επώαση για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύσιμο με TBS και προσθήκη του Δευτερογενούς συζευγμένου με Αλκαλική Φωσφατάση αντισώματος με αραιώση 1/50 σε TBS (D314 για μονοκλωνικά, D306 για πολυκλωνικά, DACO) επωάζοντας για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύσιμο και εφαρμογή χρωστικής (Fast Red System, DACO: K699) για 30min στο σκοτάδι.
- Μεταφορά των πλακιδίων σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 5min και βάψιμο με αιματοξυλίνη για 30 με 45sec.
- Ξέπλυμα με dH₂O και κάλυψη με Gelatin και καλυπτρίδα για μικροσκοπική παρατήρηση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η τεχνική και η λογική της *in vitro* ανοσοποίησης στηρίχθηκε στο πρωτόκολλο των Zafiroopoulos *et al.*, 1997.

1. Αξιολόγηση Δοτών

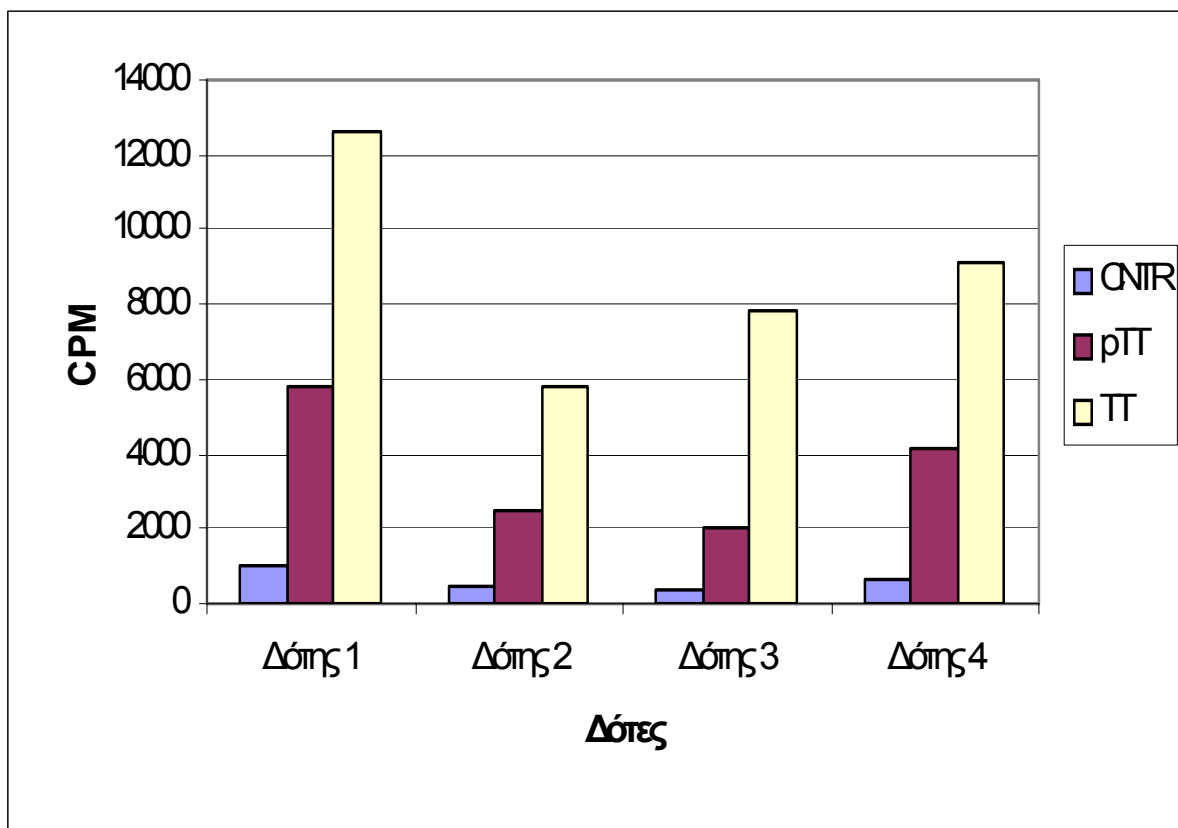
Η επιλογή των δοτών (φορείς ανοσοποίησης) έγινε με βάση:

- Την τετανο-ειδικότητα τους
- Την κατάσταση ενεργοποίησης των λεμφοκυτταρικών τους κλώνων
- Τον συνολικό κυτταρικό τους πληθυσμό

Το πρώτο χαρακτηριστικό μετρήθηκε με την απάντηση των T κυττάρων του δότη σε δοκιμές πολλαπλασιασμού απέναντι, τόσο στο τοξοειδές του τετάνου (TT), όσο και στο επιμέρους πεπτιδίο του (pTT) που συνιστά τμήμα των ετερότοπων ανοσοποίησης (Διάγραμμα 1). Η ποσότητα της ενσωματωμένης θυμιδίνης αντιστοιχίζεται άμεσα με την ποσότητα του νεοσυντιθέμενου DNA και έτσι με τον αριθμό των νεοσχηματιζόμενων ειδικών T κυττάρων.

Τα επόμενα στοιχεία ελέγχθηκαν κάτω από μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων του δότη, μετά τον καθαρισμό με φικόλη κατά την οποία υψηλοί κυτταρικοί αριθμοί συνοδευόμενοι με αυξημένη θνησιμότητα θεωρήθηκαν δείκτες ενεργοποίησης (ίσως πιθανής πρόσφατης ή ισχύουσας ασθένειας) και ως εκ τούτου αρνητική επιλογή του δότη. Ο επιθυμητός κυτταρικός πληθυσμός μετά την κατεργασία με τον μεθυλεστέρα κυμάνθηκε γύρω στα 10^7 κύτταρα / ml με σύσταση σε TH 52%, σε Tc 22%, σε B 9% και λιγότερο από 1% και 4% σε NK και μακροφάγα αντίστοιχα (Zafiroopoulos *et al.*, 1997).

Συνολικά από τους 24 δότες που ελέγχθηκαν, οι 17 εμφάνισαν πολλαπλασιαστική απάντηση των T κυττάρων τους σε ολόκληρο το τοξοειδές του Τετάνου (70,83%) και απ' αυτούς μόνο οι 9 απάντηση στο pTT (37,5 %). Τα ποσοστά αυτά συμφωνούν με αντίστοιχες μελέτες σε άλλα κλάσματα του ευρωπαϊκού πληθυσμού (Ελληνικού και μη) όπου το μεγαλύτερο μέρος εμφανίζεται θετικό (Zafiroopoulos *et al.*, 1997). Οι δότες που τελικά επιλέξαμε εξασφαλίσαμε να έχουν ενδιάμεσους τίτλους πολλαπλασιαστικής απάντησης, δηλαδή γύρω στις 5-10 φορές αύξηση από το αρνητικό δείγμα (CNTR), ενώ όλα τα κύτταρα βρισκόταν σε resting μορφή.



Διάγραμμα 1.

Τυπικό διάγραμμα της ειδικής απάντησης 4 διαφορετικών δοτών στον TT και στο pTT. (Ως CNTR θεωρείται το δείγμα χωρίς αντιγονική διέγερση).

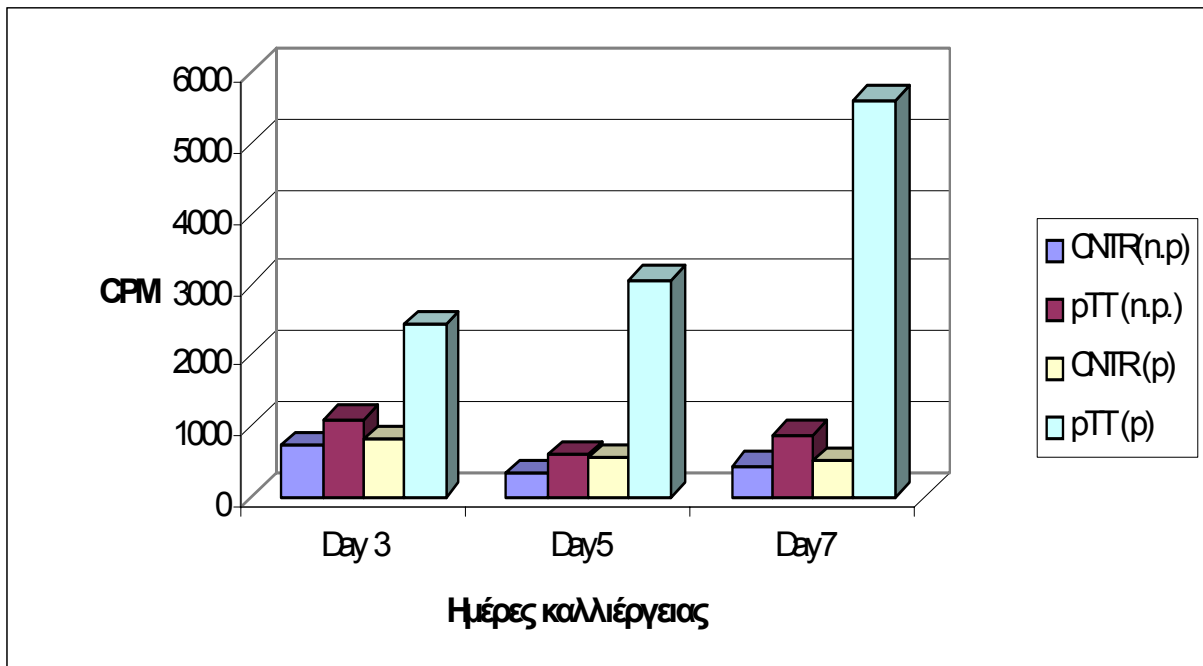
2. Ενεργοποίηση T κυττάρων.

Ο εμπλουτισμός των κυτταρικών μας δειγμάτων σε τετανο-ειδικά T λεμφοκύτταρα έγινε με προώθηση της ενεργοποίησης και ως εκ τούτου του πολλαπλασιασμού των TH κλώνων χορηγώντας στις καλλιέργειες το πεπτίδιο του τετάνου. Αν και η αντίδραση ξεκινά με μία πολυκλωνική διέγερση των TH κυττάρων, με το πέρασμα του χρόνου (6 ημέρες επώασης) όπως εξάλλου παρατηρείται και μικροσκοπικά, επέρχεται μία δραματική μείωση του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού με σχεδόν αποκλειστική υπεροχή των πολλαπλασιαζόμενων (αντιγονο-ειδικών) κυττάρων για το pTT πεπτίδιο. Η απόδοση της διαδικασίας εμπλουτισμού, στηριζόμενοι στα δεδομένα των Panina – Bordington P, *et al.*, 1989 και Zafiroopoulos *et al.*, 1997, είναι μία αύξηση του 44% του αρχικού – πριν τη διέγερση (συχνότητα εμφάνισης 10^{-4} – 10^{-5}) – pTT ειδικού πληθυσμού. Σύμφωνα με τα ίδια δεδομένα η μονή δόση αντιγόνου στάθηκε ικανή για τη βέλτιστη κυτταρική απάντηση.

Ο πληθυσμός των ακτινοβολημένων μακροφάγων που χρησιμοποιήθηκαν ως APCs στο στάδιο αυτό εμφάνισε καλύτερη απόδοση στις δοκιμές πολλαπλασιασμού των ειδικών T όταν απομονώθηκε (καθαρίστηκε) από τους άλλους συμμετέχοντες στο κυτταρικό διάλυμα πληθυσμούς. Αυτό έγινε δυνατό μέσω της ικανότητας προσκόλλησής τους στο πλαστικό (πυθμένα) της φλάσκας καλλιέργειας και μετά από συνεχείς πλύσεις για απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πληθυσμών. Παράλληλα η 6^η με 7^η ημέρα καλλιέργειας έδειξε την υψηλότερη τετανο-ειδική απάντηση στο ίδιο πείραμα δοκιμής πολλαπλασιασμού (Διάγραμμα 2).

3. Πρωτογενής ανοσοποίηση

Από τους 9 θετικούς στο pTT δότες, ανά 3 ανοσοποιήθηκαν κατά το πρωτογενές στάδιο της διαδικασίας με τους Muc2-pTT, Muc3-pTT και Muc4-pTT ετερότοπους αντίστοιχα. Σκοπός στάθηκε η επίτευξη μιας ουσιαστικής πρώτης επαφής και πολυκλωνικής ενεργοποίησης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (μέσω του TRF) και ειδικά των B κυττάρων που αναγνωρίζουν τα Muc πεπτίδια. Αυτό αντανακλά άμεσα στην απόδοση της πρωτογενούς ανοσοποίησης όσο αφορά τον εμπλουτισμό των καλλιεργειών με B ειδικά κύτταρα. Στην περίπτωση



Διάγραμμα 2

Δοκιμή πολλαπλασιασμού T-λεμφοκυττάρων υπό την παρουσία pTT, 'καθαρών (pure)' και 'μη καθαρών (non pure) APCs. (Ως CNTR, κύτταρα χωρίς αντιγόνο).

του V3 το απόλυτο μέγεθος του κυτταρικού πληθυσμού σημείωσε σχεδόν σε όλους τους εξεταζόμενους δότες αύξηση της τάξης του 10-15% (Zafirooulos *et al.*, 1997) η οποία ουσιαστικά αντιστοιχούσε στην πολλαπλασιαστική διέγερση των ειδικών B κλώνων. Τουλάχιστον σε 3 από τους 9 δότες της δεύτερης περίπτωσης, FACs ανάλυση -μετά το πέρας της πρωτογενούς ανοσοποίησης – έδειξε διατήρηση του ποσοστού των B κυττάρων στο 9-10% του συνόλου (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Η χαμηλότερη απόδοση της διαδικασίας ήταν αναμενόμενη εφόσον η διέγερση γινόταν με αντιγόνα εαυτού, αλλά μπορέσαμε να εξασφαλίσουμε τουλάχιστον το ποσοστό του αρχικού B κυτταρικού πληθυσμού.

Ανίχνευση ειδικών Muc αντισωμάτων στα υπερκείμενα των πρωτογενών καλλιιεργειών δεν έγινε, λόγω της εστίασης του ενδιαφέροντός μας στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων υψηλής συγγένειας για το αντιγόνο, που ως γνωστό θεωρούνται προϊόντα μόνο μιας δευτερογενούς απόκρισης.

4. Δευτερογενής ανοσοποίηση

Στο στάδιο αυτό ο ενεργοποιημένος pTT-ειδικός TH κυτταρικός πληθυσμός συναντάται και αλληλεπιδρά με τα πρωτογενώς εκτεθειμένα στο αντιγόνο ειδικά B κύτταρα. Η διακυτταρική επικοινωνία των παραπάνω πληθυσμών όπως προαναφέρθηκε ήδη, κρίνεται απαραίτητη για την επαγωγή της ενεργοποίησης και του περαιτέρω πολλαπλασιασμού των ενυπάρχοντων ειδικών B κυττάρων, καθώς και για την απόκτηση της ικανότητας αλλαγής ισotypου της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Σήματα επιβίωσης προέρχονται επιπρόσθετα και από το στρώμα των ινοβλαστών που είναι παρόν στην καλλιέργεια και μπορεί να αλληλεπιδρά με τα B με τη μεσολάβηση του anti-CD40 διαλυτού μορίου το οποίο με τη σειρά του μπορεί επιπλέον να προσδένεται στο CD32 επιφανειακό μόριο των ινοβλαστών.

Η αναγκαιότητα παρουσίας και των 2 τύπων κυττάρων (TH, B) στην προαναφερθείσα κατάσταση έχει μελετηθεί εκτενώς (Zafirooulos *et al.*, 1997) γι' αυτό δεν θα γίνει παραπάνω λόγος.

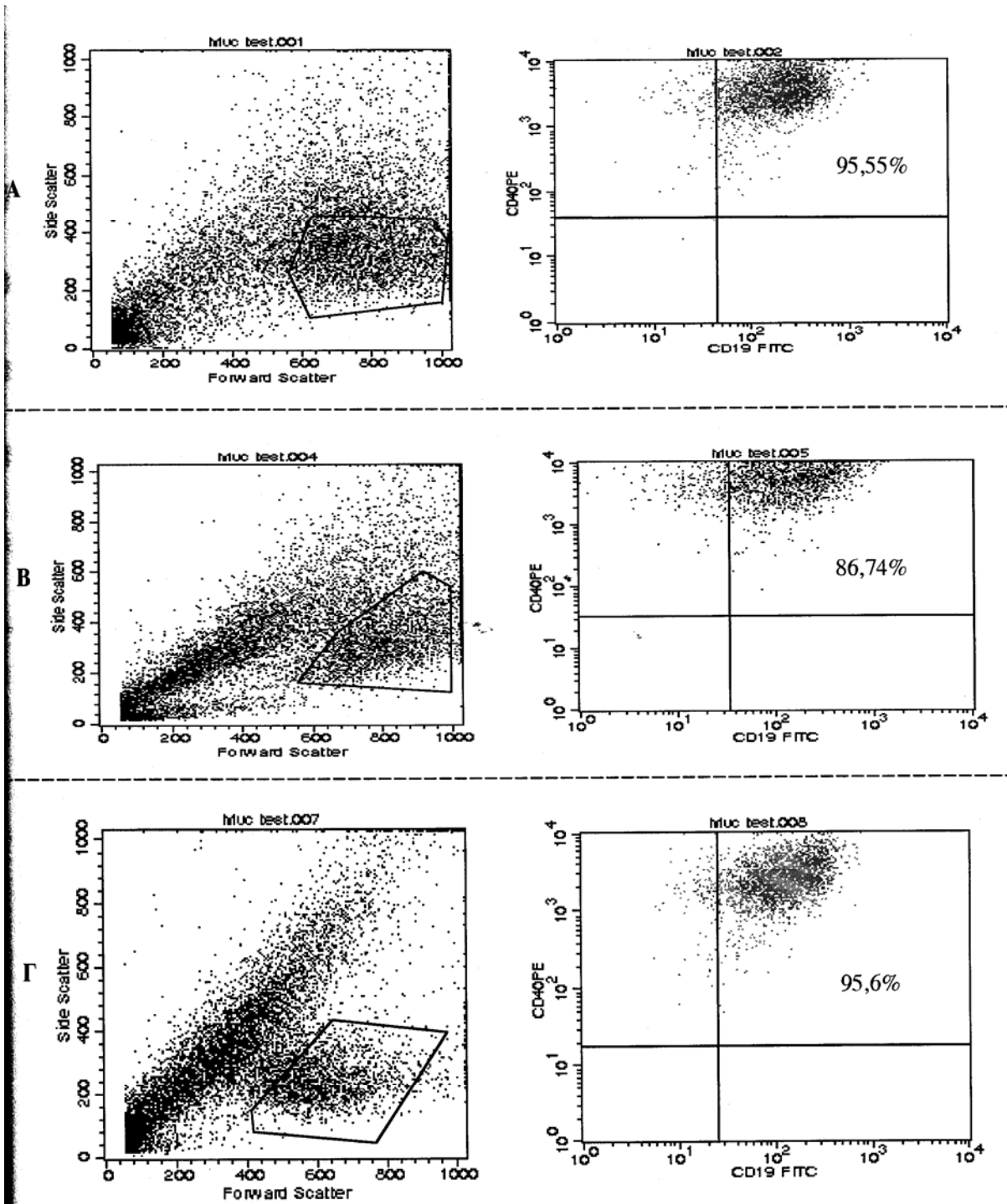
4.1. EBV- μετασχηματισμός B κυττάρων

Ο μετασχηματισμός των B κλώνων μετά τη δευτερογενή ανοσοποίηση σε αθανатоποιημένα πιθανά Ig εκκριτικά πλασματοκύτταρα, άφηνε ανοιχτά ερωτήματα για την ικανότητα αυτών των κυττάρων να συνεχίζουν να εκφράζουν στην επιφάνειά τους πρωτεϊνικά μόρια απαραίτητα για την παραλαβή σήματος από τα T - ακόμα και σ' αυτό το στάδιο - αλλά εξίσου σημαντικά και για την επιβίωσή τους, όπως για παράδειγμα το CD40.

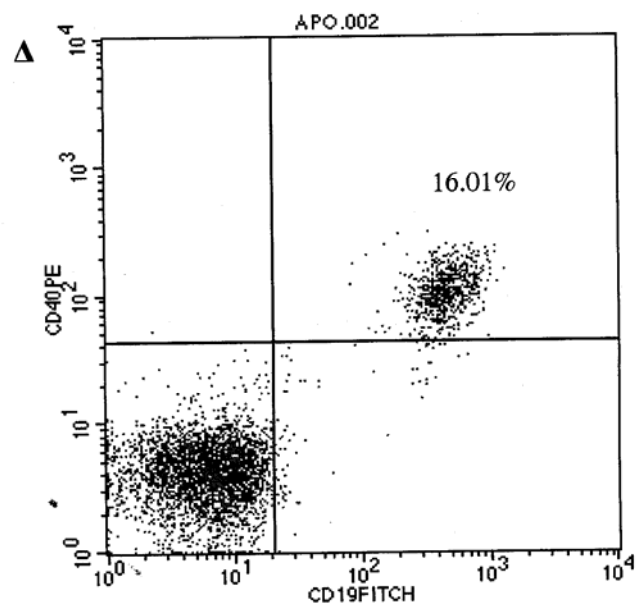
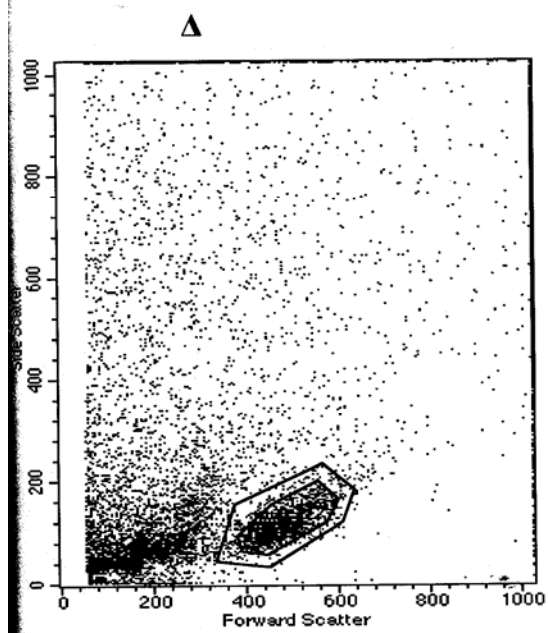
Στα διαγράμματα 3A, 3B και 3Γ γίνεται η σύγκριση της έκφρασης του CD40 πριν την έναρξη της ανοσοποίησης (3Δ) και μετά το τέλος της επιμόλυνσης με EBV και στις 3 κατηγορίες πεπτιδίων (Muc2, Muc3, Muc4) όπου ουσιαστικά δε διαφαίνεται κάποια αλλαγή έκφρασης. Εμφανής είναι και η παρουσία συγκροτημένων B κυτταρικών κλώνων στη δεύτερη περίπτωση με αξιοσημείωτη μετατόπιση προς τα δεξιά [Διαγράμματα (3) SSC/FSC, gates R4, R10, R9] έναντι των άλλων λευκοκυτταρικών πληθυσμών.

4.2. Ανίχνευση ειδικών IgM και IgG ανοσοσφαιρινών κατά τη δευτερογενή ανοσοποίηση μετά το EBV

Για την ανίχνευση παρουσίας ή όχι ειδικών ανοσοσφαιρινών τύπου IgM και IgG στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών μετά το πέρας του χρόνου της EBV επιμόλυνσης εφαρμόστηκαν ELISA assays ελέγχοντας το συνολικό αριθμό πηγαδιών όλων των πιάτων καλλιιεργειας. Η ανίχνευση έγινε με βάση την ειδική πρόσδεση της περιεχόμενης στο κατάλληλο υπερκείμενο ανοσοσφαιρίνης (τύπου IgM ή IgG) στο αντίστοιχο προσκολλημένο στην πλάκα ELISAs ειδικό πεπτιδίο ανοσοποίησης (Muc2, Muc3, Muc4). Ειδικά για την IgG – αντίσωμα υψηλότερης συγγένειας σε σχέση με την IgM και επικρατές κατά τη δευτερογενή διέγερση *in vivo* – ο έλεγχος εφαρμόστηκε πολλαπλές φορές. Ως αρνητικό CNTR χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο καλλιιεργειας (Πίνακας 1). Οι διαφοροποιήσεις του ποσοστού των θετικών πηγαδιών ανάμεσα στους ελέγχους οφείλονται στους διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης των ειδικών κλώνων από τα επίσης υπαρκτά, μη ειδικά για Muc, B κύτταρα. Η κατάσταση αυτή εξηγείται από τη μετατόπιση του μεγαλύτερου ποσοστού της μεταβολικής



Διάγραμμα 3. Έκφραση των CD40 μορίων στην επιφάνεια των B κυττάρων μετά το EBV. 3(A) Muc2, 3(B) Muc3, 3(Γ) Muc4 καλλιέργειες.



Διάγραμμα 3Δ. Έκφραση του CD40 μορίου στα Β κύτταρα πριν την ανοσοποίηση

Πεπτιδιο Ανοσοποίησης	Ν° Δότη	Ειδική IgM Test 1	Ειδική IgG			
			Test 1	Test 2	Test 3	Τελική IgG
Muc2	1	227/830	134/830	99/134	90/99	90/830
	2	28/280	198/280	15/198	12/15	12/280
Muc3	1	21/378	18/378	4/18	4/4	4/378
	2	5/480	71/480	10/71	9/10	9/480
	3	33/280	235/280	85/235	8/85	8/280
Muc4	1	25/240	190/240	10/190	10/10	10/240
	2	12/55	35/55	3/35	3/3	3/55

Πίνακας 1. Ποσοστό θετικών πηγαδιών σε παρουσία ειδικής (α-Muc) IgM και IgG ανοσοσφαιρίνης μετά το EBV infection, όπως δείχθηκε με ELISA assay. Οι 2 δότες με μηδενικό τίτλο IgM ή IgG αντισωμάτων δεν αναφέρονται.

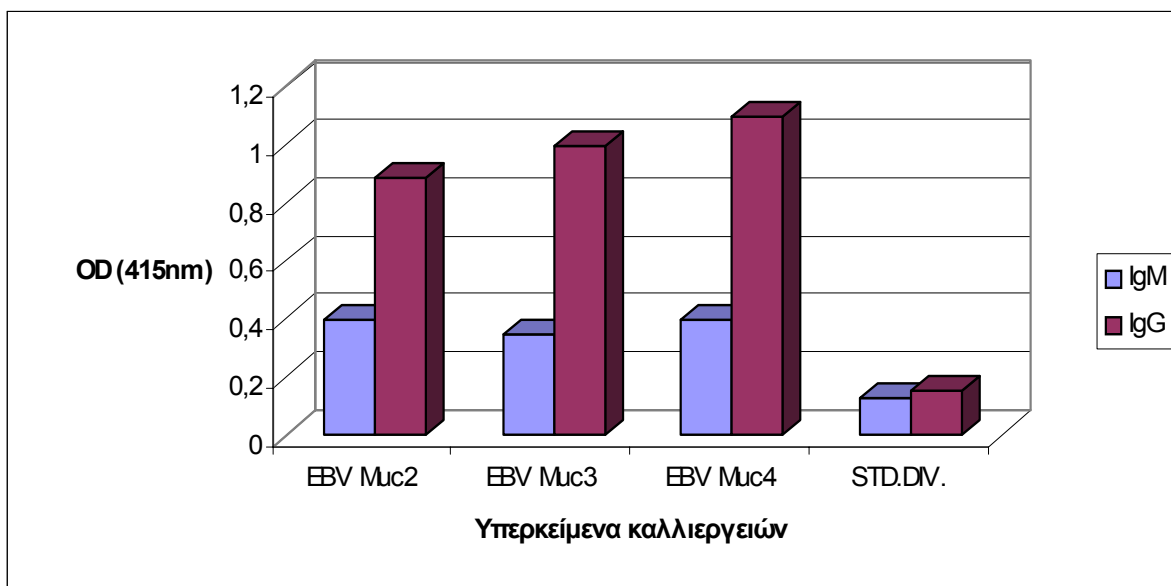
ενέργειας που παράγεται από τα ειδικά B κύτταρα προς την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών για έκκριση αντισώματος παρά για αύξηση.

Συγκρίνοντας το αρχικό ποσοστό (test 1) των πηγαδιών που εκφράζουν IgG ή IgM βλέπουμε - στην πλειοψηφία των δοτών και ανεξάρτητα από το πεπτιδίο ανοσοποίησης - η παραγωγή της IgG να επικρατεί σταδιακά μέσα στις καλλιέργειες της δευτερογενούς ανοσοποίησης κάτι που ούτως η άλλως εμφανίζεται στις *in vivo* καταστάσεις. Κάτι τέτοιο διαφαίνεται και στη μέτρηση της συνολικής IgG ή IgM στα υπερκείμενα καλλιεργειών αμέσως μετά το EBV και σε παρατεταμένες καλλιέργειες (Διάγραμμα 4A, 4B). Ο τίτλος της IgG εμφανίζεται σταθερά αυξημένος σε σχέση με την IgM η οποία ειδικά στη δεύτερη περίπτωση ακολουθεί σημαντική πτωτική τάση, ανάλογη του χρόνου καλλιέργειας.

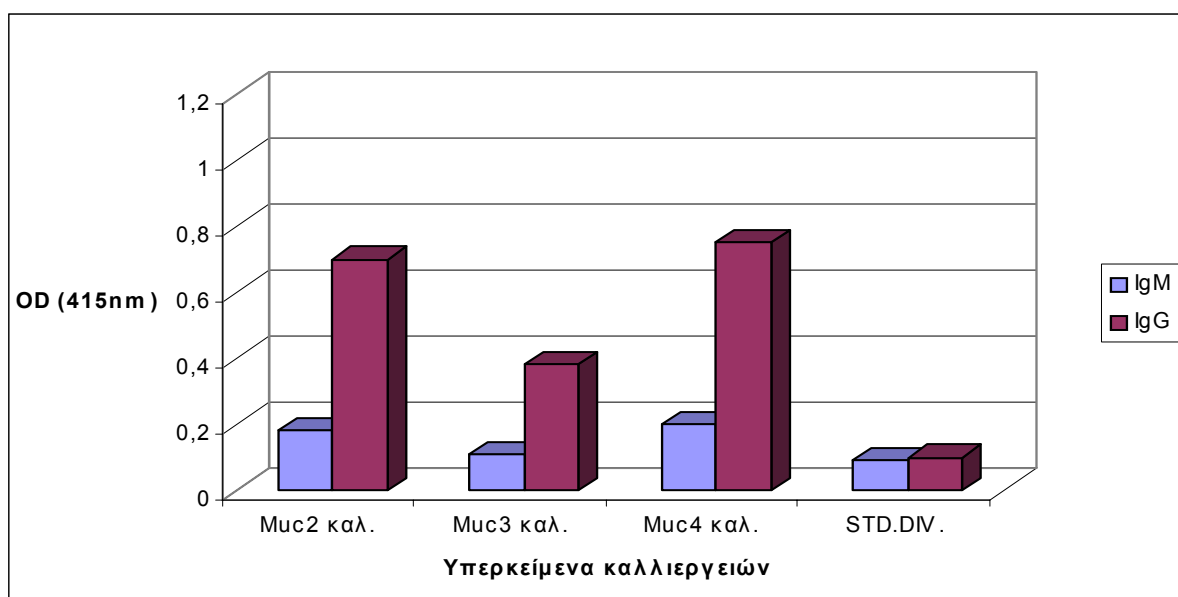
Προσπαθώντας να εκτιμήσουμε ποιοτικά (υψηλή συγγένεια προς το αντιγόνο) και ποσοτικά τα εκκρινόμενα IgG αντισώματα (θετικά πηγάδια μετά το EBV) με βάση τις οπτικές απορροφήσεις (OD) που δίνουν στην ELISA, καταλήγουμε να έχουμε μεγαλύτερη συχνότητα θετικών δειγμάτων στην περιοχή 0-0.15 και για τις 3 περιπτώσεις πεπτιδίων [Πίνακες 2, 3, 4 (αντίστοιχα Διαγράμματα)]. Στους ίδιους πίνακες παρατηρούμε επίσης το ποσοστό να παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με το δότη αλλά όχι και με τη φύση του αντιγόνου ανοσοποίησης δηλαδή αν είναι Muc2, Muc3 ή Muc4. Έτσι κάποιοι δότες απαντούν με έκκριση ειδικής IgG με σχετικά υψηλή OD (0,45-0,75) σε μικρό όμως υπαρκτό ποσοστό, το οποίο κυμαίνεται γύρω στο 1-24% των θετικών πηγαδιών ανάλογα με την περίπτωση.

Η παρουσία B κυττάρων μετά το EBV με επιφανειακή έκφραση IgG (συνολικής) ανιχνεύθηκε και με τον κυτταρομετρητή ροής (FACs) όπου για όλες τις περιπτώσεις το 10-20% των B κυττάρων εμφανίζονται θετικά στην έκφραση sIgG (Διαγράμματα 5A, 5B, 5Γ). Σε σύγκριση οι αντίστοιχοι B κυτταρικοί πληθυσμοί που δεν έχουν υποστεί ανοσοποίηση αμέσως μετά την κατεργασία με τον εστέρα έχουν εμφανώς μειωμένα επίπεδα sIgG (Διάγραμμα 5Δ).

Η απομόνωση της IgG έγινε με πέρασμα του υπερκείμενου υλικού των καλλιεργειών των θετικών πηγαδιών από χρωματογραφική στήλη συγγένειας (Protein-A) η οποία απέδωσε ουσιαστική απομάκρυνση της IgM για όλες τις περιπτώσεις (Διάγραμμα 6).



A.



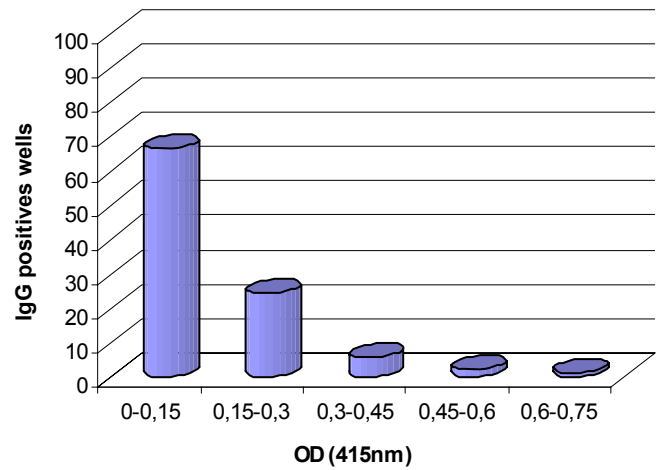
B.

Διάγραμμα 4.

Συνολική παραγωγή IgM και IgG αντισωμάτων όπως ανιχνεύθηκαν με ELISA assay στα υπερκείμενα καλλιέργειών αμέσως μετά το EBV (A) και μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια (B). Το συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αλκαλική φωσφατάση και η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 415nm. Το υλικό χρησιμοποιήθηκε αυτούσιο χωρίς αραιώση.

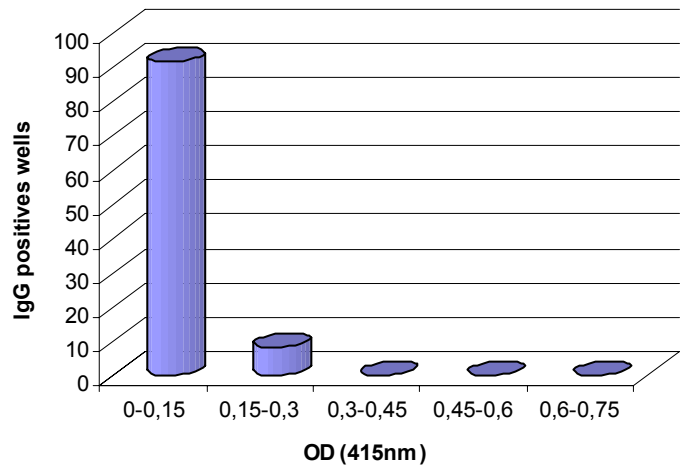
IgG positives (Muc 2 Δότης 1) test 3				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	60	66,66%
2	0,15	0,3	22	24,44%
3	0,3	0,45	5	5,55%
4	0,45	0,6	2	2,22%
5	0,6	0,75	1	1,11%

A



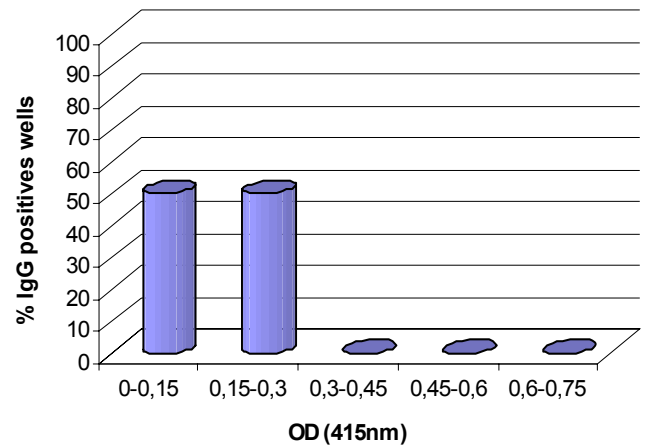
IgG positives (Muc 2 Δότης 2) test 3				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	11	91,66%
2	0,15	0,3	1	8,33%
3	0,3	0,45	0	0%
4	0,45	0,6	0	0%
5	0,6	0,75	0	0%

B



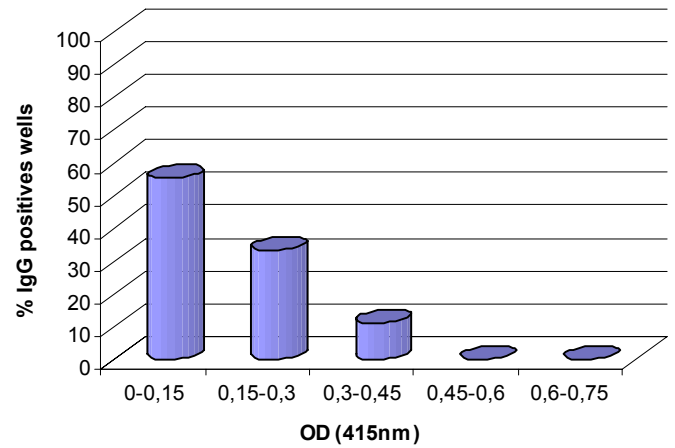
Πίνακας 2. Διακύμανση της OD των θετικών σε ειδική IgG πηγαδιών μετά από ανοσοποίηση με το Muc2 πεπτίδιο. Δότης 1(A), Δότης 2 (B), Η OD μετρήθηκε στα 415nm και από τις τιμές έχει αφαιρεθεί η μέση τιμή του αρνητικού δείγματος X 3.

IgG positives (Muc 3 Δότης 1)				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	2	50%
2	0,15	0,3	2	50%
3	0,3	0,45	0	0%
4	0,45	0,6	0	0%
5	0,6	0,75	0	0%



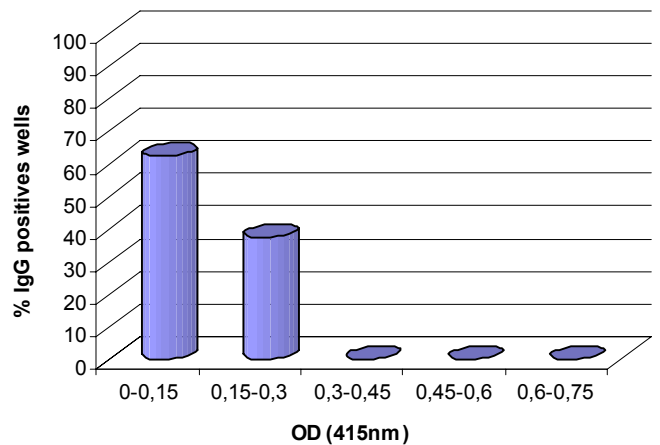
A

IgG positives (Muc 3 Δότης 2)				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	5	55,55%
2	0,15	0,3	3	33,33%
3	0,3	0,45	1	11,11%
4	0,45	0,6	0	0%
5	0,6	0,75	0	0%



B

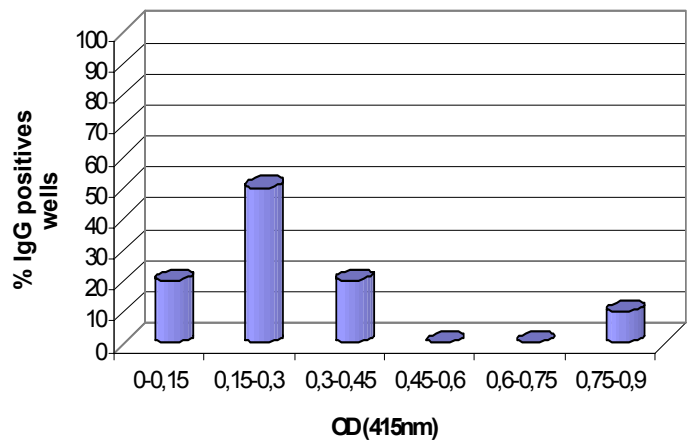
IgG positives (Muc 3 Δότης 3) test 3				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	5	62,5%
2	0,15	0,3	3	37,5%
3	0,3	0,45	0	0%
4	0,45	0,6	0	0%
5	0,6	0,75	0	0%



Γ

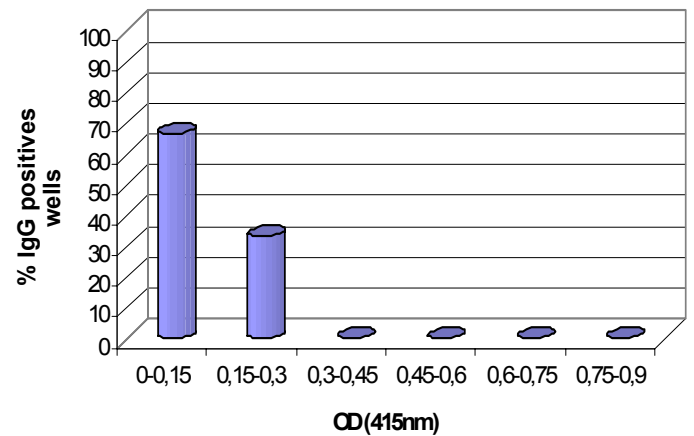
Πίνακας 3. Διακύμανση της OD των θετικών σε ειδική IgG πηγαδιών μετά από ανοσοποίηση με το Muc3 πεπτιδίο. Δότης 1(A), Δότης 2 (B), Δότης 3 (Γ). Η OD μετρήθηκε στα 415nm και από τις τιμές έχει αφαιρεθεί η μέση τιμή του αρνητικού δείγματος X 3.

IgG positives (Muc 4 Δότης 1)				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	2	20%
2	0,15	0,3	5	50%
3	0,3	0,45	2	20%
4	0,45	0,6	0	0%
5	0,6	0,75	0	0%
6	0,75	0,9	1	10%



A

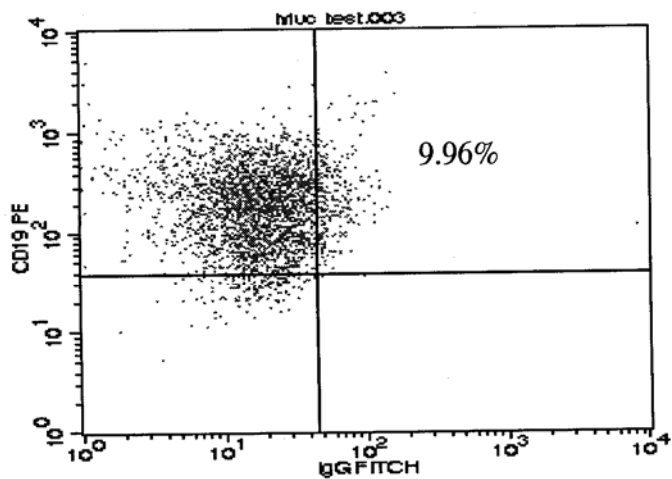
IgG positives (Muc 4 Δότης 2) test 3				
Bar	From: (>)	To: (<)	Count:	Percent:
1	0	0,15	2	66,66%
2	0,15	0,3	1	33,33%
3	0,3	0,45	0	0%
4	0,45	0,6	0	0%
5	0,6	0,75	0	0%



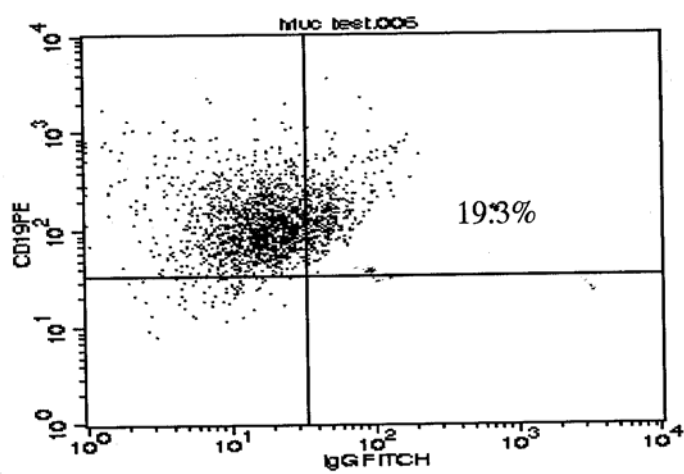
B

Πίνακας 4. Διακύμανση της OD των θετικών σε ειδική IgG πηγαδιών μετά από ανοσοποίηση με το Muc4 πεπτιδιο. Δότης 1(A), Δότης 2 (B). Η OD μετρήθηκε στα 415nm και από τις τιμές έχει αφαιρεθεί η μέση τιμή του αρνητικού δείγματος X 3.

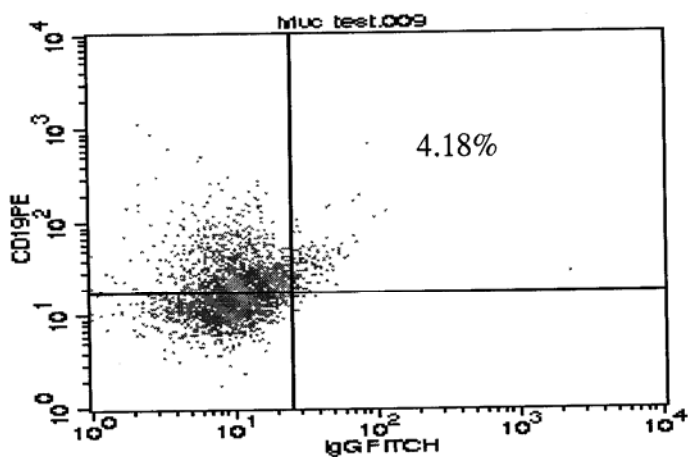
A



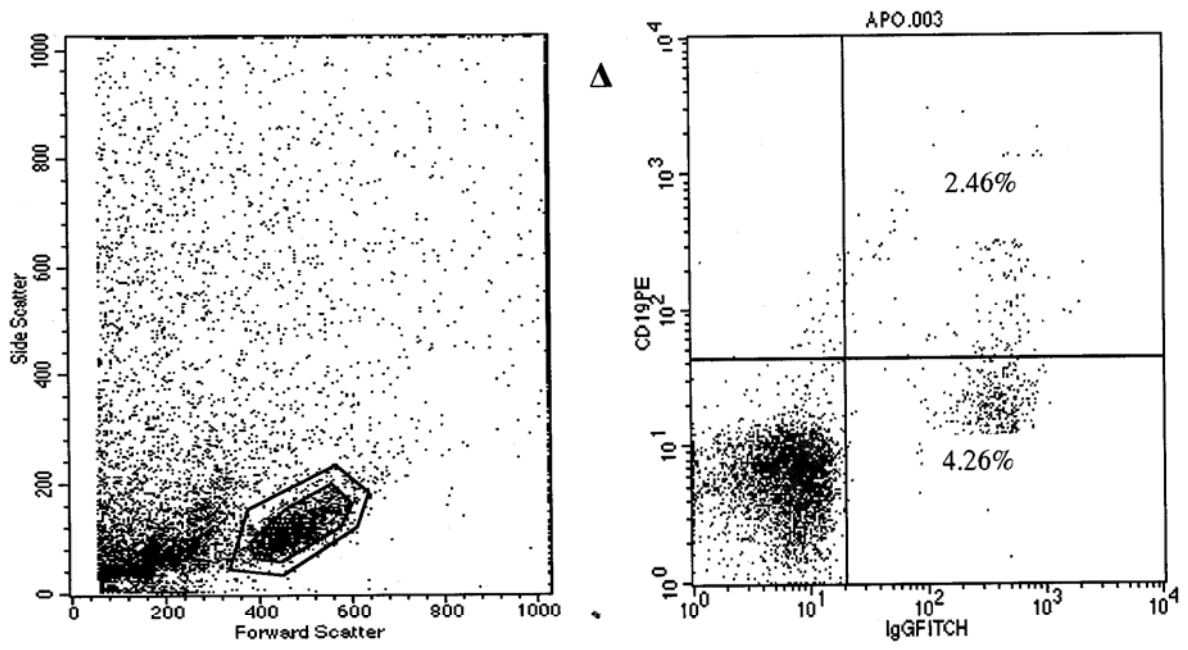
B



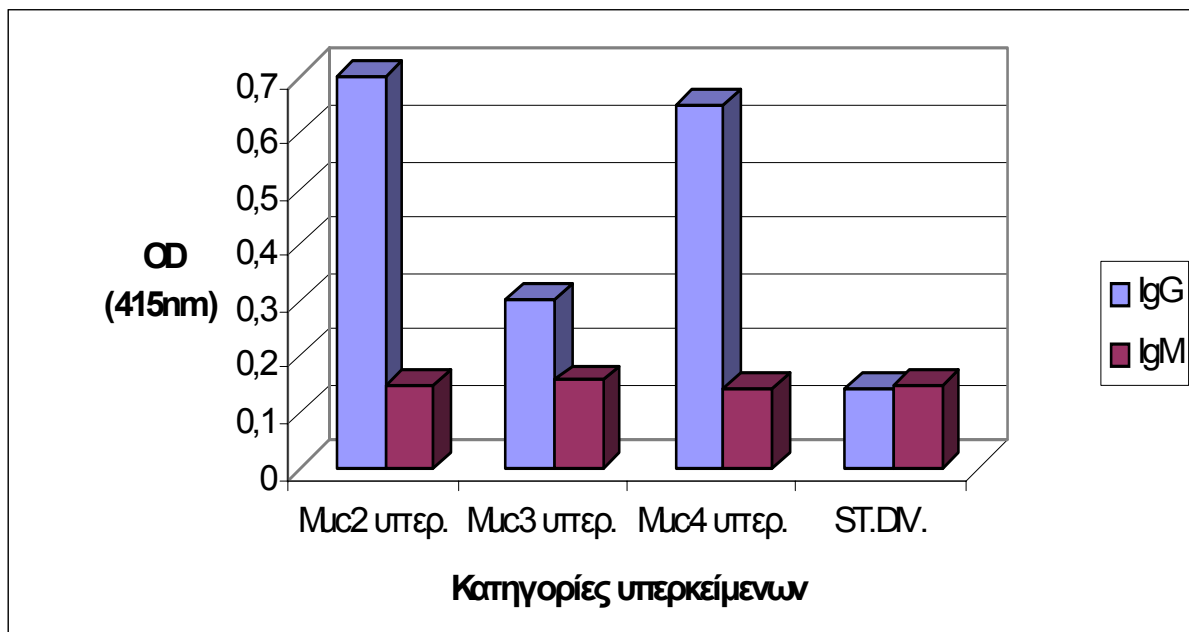
Γ



Διάγραμμα 5. Έπιφανειακή έκφραση συνολικής sIgG σε B κύτταρα Muc2 (A), Muc3 (B), Muc4 (Γ) καλλιιεργειών από τυχαία δείγματα μετά τις ανοσοποιήσεις.



Διάγραμμα 5Δ. Έκφραση sIgG σε δείγμα λεμφοκυττάρων που δεν έχει υποστεί ανοσοποίηση.



Διάγραμμα 6.

Ενδεικτικά συγκεντρωτικά IgG και IgM κλάσματα μετά το πέρασμα των αντίστοιχων υπερκείμενων από χρωματογραφική στήλη συγγένειας Protein A. Παρατηρείται πλήρη απομάκρυνση της IgM. Η μέτρηση έγινε με ELISA assay και η OD μετρήθηκε στα 415nm.

5. Έλεγχος ειδικότητας των παραγόμενων IgG αντισωμάτων

Ο εκτεταμένος έλεγχος της ειδικότητας των παραγόμενων IgG αντισωμάτων έδειξε σε 1 από τις 3 περιπτώσεις (Δότης 2, Muc3) την παρουσία ενός ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος α-Muc3 τύπου IgG με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Ικανότητα αναστολής

Όταν σε πλάκα επιστρωμένη με το Muc3 πεπτιδίο έγινε ταυτόχρονη επώαση του εξεταζόμενου αντισώματος με διάφορες συγκεντρώσεις διαλυτού Muc3 πεπτιδίου, η σύνδεση του αντισώματος εντοπίστηκε επιλεκτικά μόνο στο διαλυτό κλάσμα η οποία έγινε φανερή με αξιοσημείωτη μείωση της OD. Η OD αυτή σε απουσία διαλυτού αντιγόνου εμφανιζόταν γύρω στις 3 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης δ/του αντιγόνου (200μg/ml) (Διαγράμματα 7A, 7B). Αντίστοιχα πειράματα με το ίδιο αντίσωμα και διαφορετικά επιστρωμένα και εν διαλύσει πεπτιδία (Muc2, Muc1 και Muc4) δεν έδωσαν ανάλογα αποτελέσματα (απουσία αναστολής) (Διάγραμμα 7A, 7B).

- Ειδικότητα πρόσδεσης

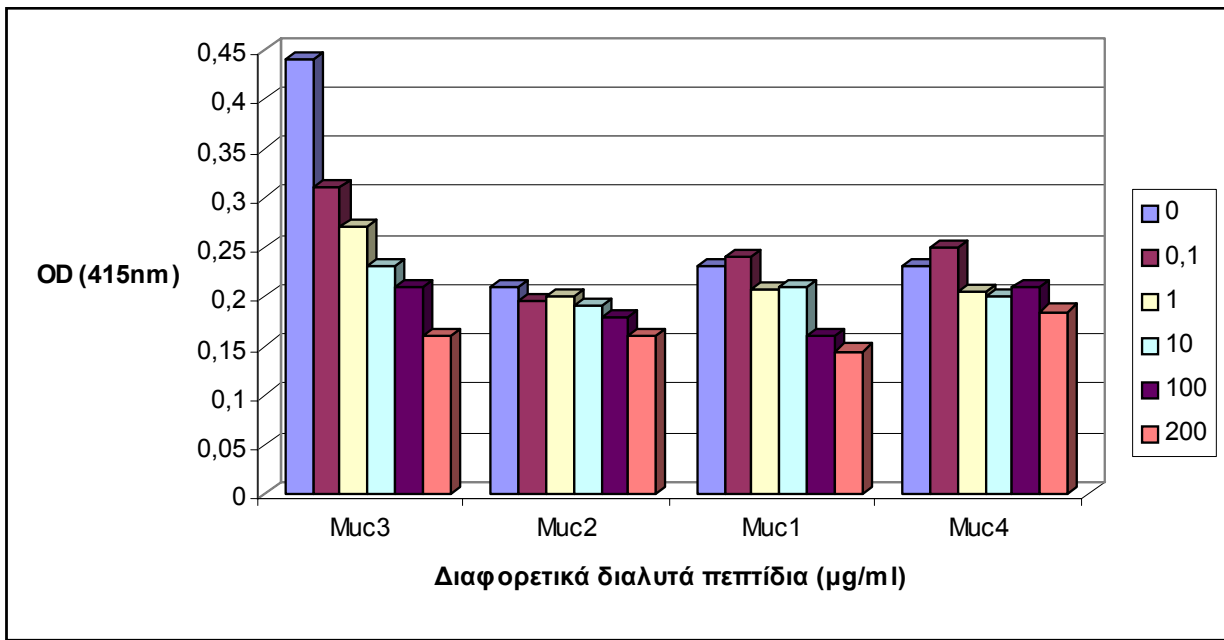
Ειδικότητα επιλεκτικής πρόσδεσης στο πεπτιδίο ανοσοποίησης Muc3 σε σχέση με τα υπόλοιπα Muc1, Muc2 και Muc4 πεπτιδία σε ELISA assay. (Διάγραμμα 7A).

Επιπλέον:

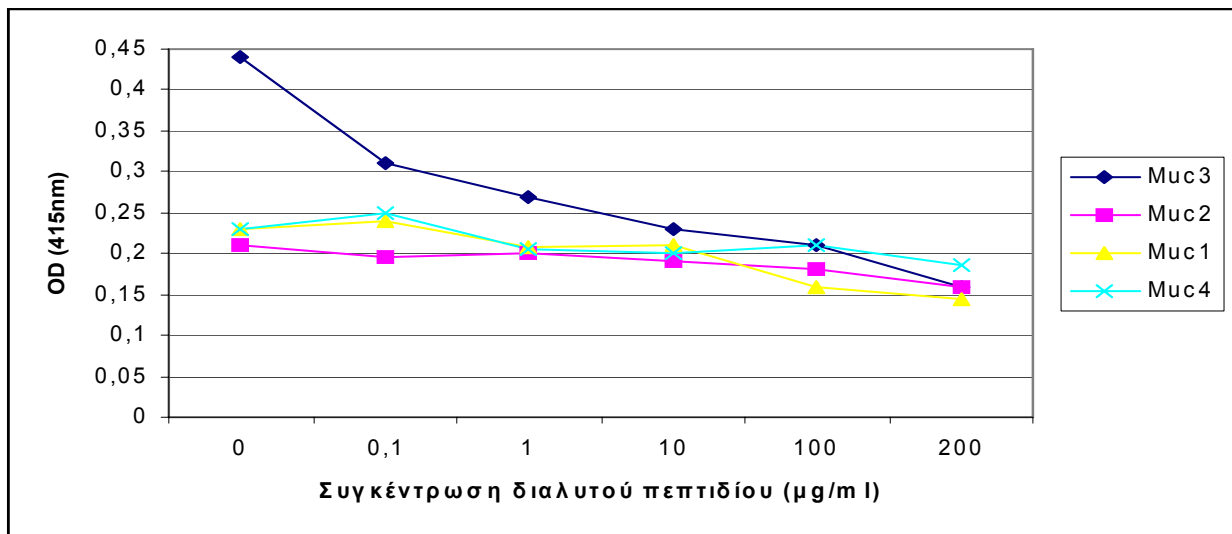
- Επιφανειακή αλλά και ενδοκυτταρική ειδική πρόσδεση του αντισώματος σε κύτταρα καρκινικών σειρών παχέως εντέρου (LIM2412, HT29) που ως γνωστό εκφράζουν και εκκρίνουν κυρίως Muc3 αλλά και σε καρκινικά κύτταρα μαστού (T47D).

Τα ευρήματα αυτά προήλθαν από πειράματα σε κυτταρομετρητή ροής (FACs) χρησιμοποιώντας α-human IgG αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζον μόριο (FITCH), το οποίο αναγνωρίζει και δένεται επιλεκτικά στα IgG μόρια αποκαλύπτοντας την παρουσία ή όχι ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος μας με το υπάρχον αντιγόνο.

Τα καρκινικά κύτταρα, αφού έφτασαν σε φάση υψηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης αντιγόνου, κατεργάστηκαν διαφορετικά ανάλογα με τον τύπο της επιθυμητής χρώσης (ενδοκυτταρική ή επιφανειακή). Ειδικά κατά την



A



B

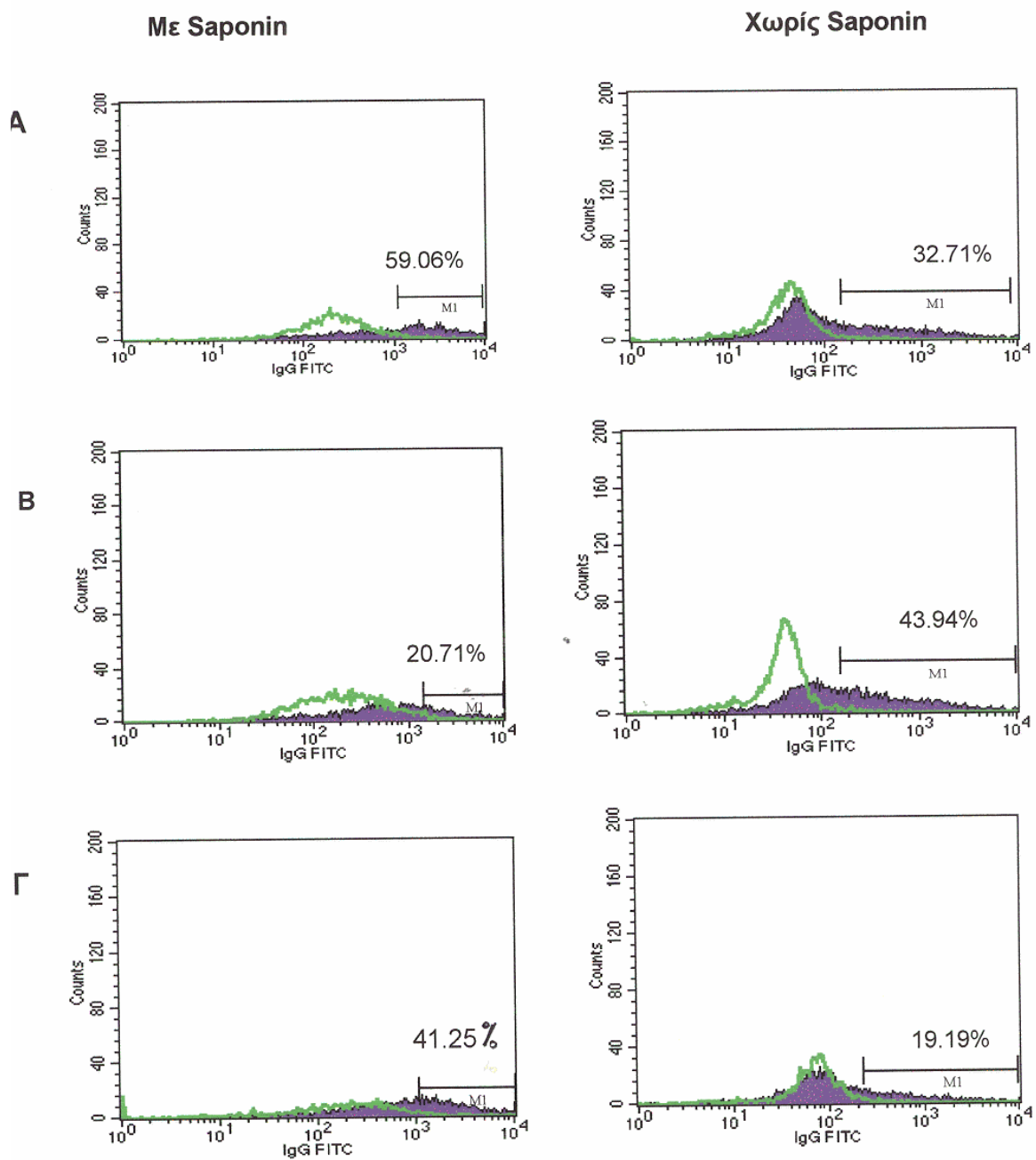
Διαγράμματα 7A,7B.

Παρουσία αναστολής και ειδικότητας του α-Muc3 αντισώματος. Χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε διαλυτού πεπτιδίου (Muc1, Muc2, Muc3 και Muc4) σε µg/ml. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 415nm. Η μέση τιμή του αρνητικού δείγματος (CNTR) X3 έχει αφαιρεθεί.

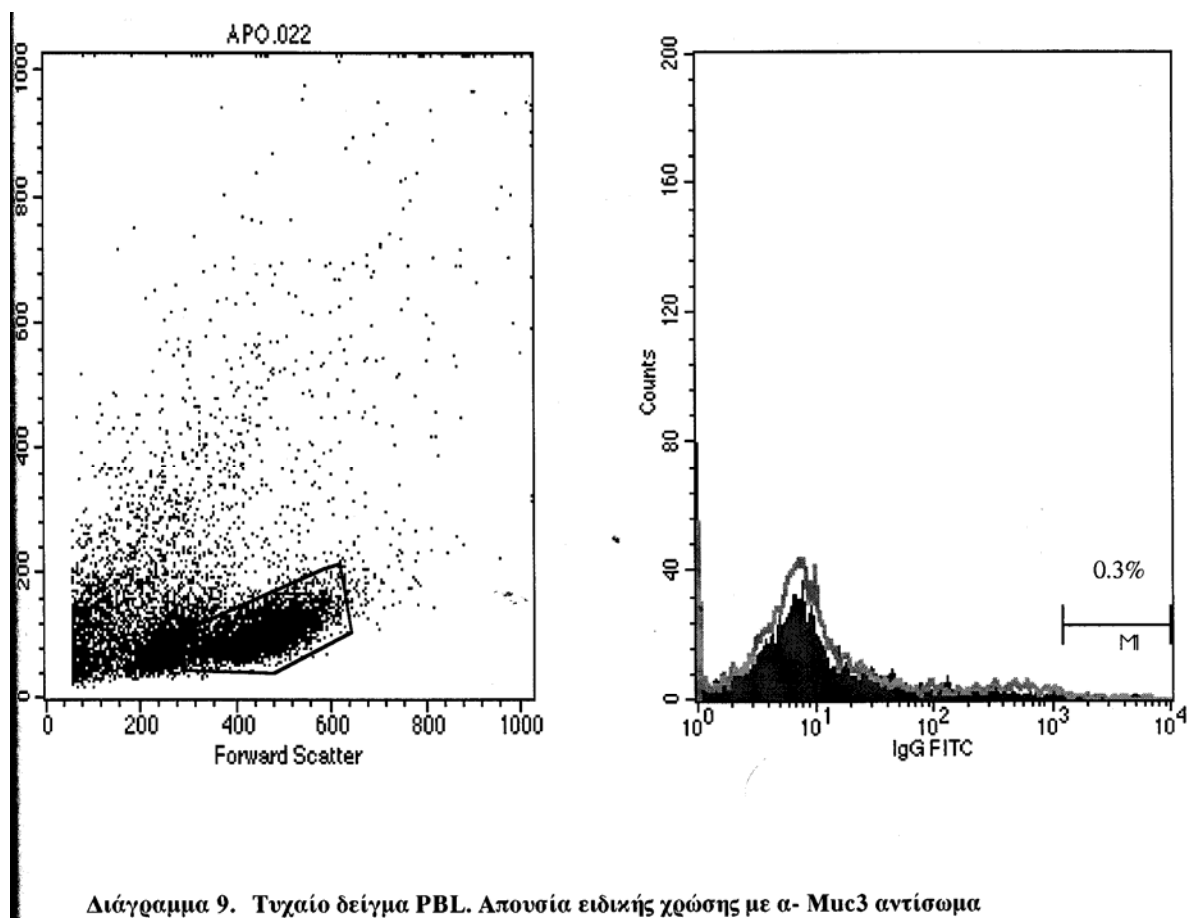
ενδοκυτταρική κατεργασία τα κύτταρα αρχικά μονιμοποιήθηκαν με PFA 4% προκειμένου να γίνουν ανθεκτικά, ενώ οι μεμβράνες τους ανοίχτηκαν με Saponin 0.1%. Ο φραγμός των μη ειδικών θέσεων έγινε με 10% NGS. Ως αρνητικό CNTR χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά PBL τα οποία ούτως η άλλως εμφανίζουν απουσία έκφρασης Muc πεπτιδίων. Η μη ειδική πρόσδεση μετρήθηκε με απουσία προσθήκης του αντισώματός μας (Διάγραμμα 9).

Αυτά που παρατηρούμε (Διαγράμματα 8Α, 8Β, 8Γ) είναι:

- 1) Εμφανής μετατόπιση του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού προς τα δεξιά σε όλες τις κυτταρικές σειρές και κυρίως κατά τις ενδοκυτταρικές χρώσεις. Αυτό αντανakλά το ποσοστό των κυττάρων που φθορίζουν έντονα και συνεπώς την ειδική πρόσδεση αντιγόνου - αντισώματος.
- 2) Διαφορετική κατανομή του αντιγόνου ενδοκυτταρικά και επιφανειακά ανάλογα με την κυτταρική σειρά, όπως διαφαίνεται από το ποσοστό πρόσδεσης αντιγόνου – αντισώματος. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στη φάση στην οποία βρισκόταν η εκάστοτε σειρά (π.χ. εκκριτική και ως εκ τούτου χαμηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση αντιγόνου) καθώς και στην απόδοση της καθ' αυτής διαδικασίας χρώσης. Έτσι με βάση την πρώτη παρατήρηση τα καρκινικά κύτταρα HT29 και LIM2412 από παχύ έντερο βάφονται κυρίως ενδοκυτταρικά σ' ένα αρκετά υψηλό ποσοστό, 59,06 και 41,25% αντίστοιχα, ενώ τα T47D (μαστός) μόλις ένα 20.71%. Η επιφανειακές χρώσεις έδωσαν για τα κύτταρα του παχέως εντέρου χαμηλότερα ποσοστά του 32,71 και 19.19%, ενώ για τα T47D ένα ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό του 43,94%.
- 3) Η παρατηρούμενη προτίμηση πρόσδεσης του αντισώματος βασικά στα καρκινικά εντερικά κύτταρα και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά, συμφωνεί με την επιλεκτική παρουσία κυρίως του Muc3 μορίου στο εντερικό επιθήλιο.
- 4) Τα φυσιολογικά PBL δεν εμφανίζουν μετατόπιση προς τα δεξιά και ουσιαστικά μηδενική ειδική χρώση.
 - Παρουσία θετικής χρώσης σε τομές από δείγματα όγκου παχέως εντέρου κατά τη διεργασία τους με ανοσοϊστοχημική μέθοδο (Εικ. 1).
Ανάλογη μέθοδος με χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος εφαρμόστηκε και σε κακοήθη δείγματα μαστού και λεμφαδένων (Εικ. 2, 3), καθώς και σε φυσιολογικό ιστό από σκωληκοειδή απόφυση (μη παρουσιάζόμενα δεδομένα). Τα δείγματα αυτά εμφανίστηκαν στο σύνολό τους αρνητικά. Η



Διάγραμμα 8. Επιφανειακή αλλά και ενδοκυτταρική πρόσδεση α -Muc3 αντισώματος σε κύτταρα καρκινικών σειρών. 8(A) HT29, 8(B) T47D, 8(Γ) LIM2412. Η μη ειδική πρόσδεση μετρήθηκε με απουσία προσθήκης του αντισώματος μας. M1—ποσοστό κυττάρων που εμφανίζουν ειδική χρώση.



Διάγραμμα 9. Τυχαίο δείγμα PBL. Απουσία ειδικής χρώσης με α- Mus3 αντίσωμα

θετική ειδική χρώση εντοπίστηκε με την παρουσία αμυδρά κόκκινων κύκλων περιφερειακά από τα κακοήθη κύτταρα του δείγματος, αφήνοντας ανεπηρέαστα τα υγιή. Η αμυδρότητα του σήματος μπορεί να οφείλεται:

1) Στη μικρή διαθέσιμη ποσότητα και συγκέντρωση του αντισώματος σε συνάρτηση με την αυξημένη κυτταρική επιφάνεια του ιστού

2) Στη πιθανή μικρή συγγένεια του αντισώματος για το αντιγόνο

3) Στην εξωκυτταρική χρώση.

Για ανίχνευση μη ειδικής χρώσης εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία στους ίδιους τύπους τομών χωρίς όμως προσθήκη του αντισώματός μας.

Με μέτρηση της OD στα 280nm η κατά προσέγγιση συγκέντρωση της αναφερόμενης ανοσοσφαιρίνης βρέθηκε να είναι 1,53mg/ml (συντελεστής απορρόφησης 1,4).

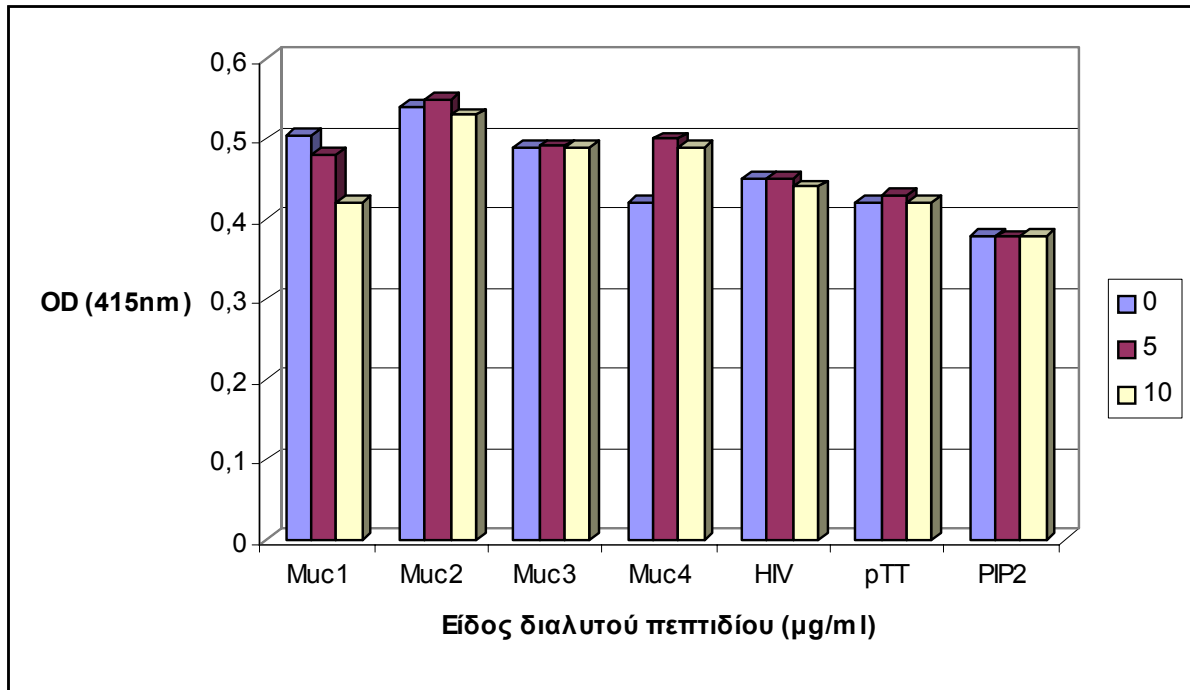
5.2 Πολύ-ειδικά (Polyspecific) αντισώματα

Τα υπόλοιπα IgG κλάσματα από τα δείγματα των υπερκειμένων των άλλων δοτών έδειξαν την παρουσία πολύ-ειδικών (polyspecific) αντισωμάτων χωρίς ειδικότητα και ικανότητα σημαντικής αναστολής στο διαλυτό πεπτίδιο με το οποίο έγινε η ανοσοποίηση, αλλά ούτε και στα άλλα πεπτίδια. Η μη ειδική αντίδραση αυτών των αντισωμάτων επεκτάθηκε και με αντιγόνα πέρα της οικογενείας των Muc πεπτιδίων όπως για παράδειγμα το πεπτίδιο του τετάνου (pTT), το 15/μερες του HIV και το PIP2 (Διάγραμμα 10).

Αντίστοιχα πειράματα με αυτά που έγιναν με το α-Muc3 χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή ροής, εφαρμόστηκαν ενδεικτικά στις προαναφερθείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές για ανίχνευση πρόσδεσης αντιγόνου - αντισώματος. Για ανίχνευση μη ειδικής χρώσης τα ίδια κύτταρα επώαστηκαν χωρίς την παρουσία του πρώτου αντισώματος, ενώ η όλη διαδικασία κινήθηκε μόνο στον εντοπισμό επιφανειακών σημάτων.

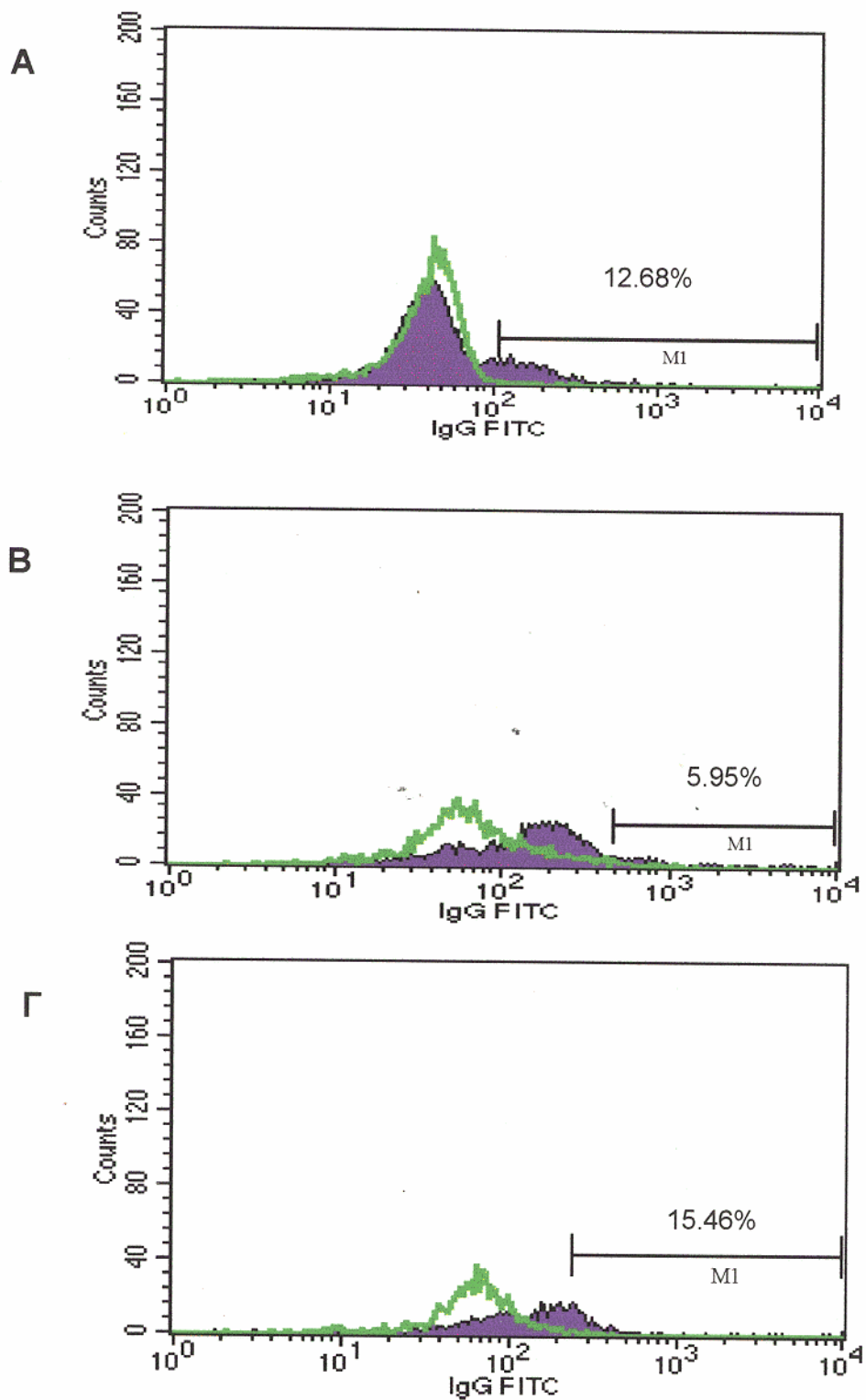
Τα αποτελέσματα έδειξαν ελαφριά μετατόπιση του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού προς τα δεξιά χωρίς όμως το θετικό ποσοστό (M1) να κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα. Για παράδειγμα στις LIM2412 και HT29 σειρές έφτασε μόλις

στο 12,68% και 15,46% αντίστοιχα ενώ για την T47D άγγιξε μόνο το 5,95% (Διαγράμματα 11Α, 11Β,11Γ).



Διάγραμμα 10

Ενδεικτική απάντηση polyspecific αντισώματος που ανιχνεύθηκε σε υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων που είχαν ανοσοποιηθεί με το Muc2 πεπτίδιο. Παρατηρείται παρουσία απάντησης σε ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων και απουσία ουσιαστικής αναστολής σε αυτά. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις διαλυτών πεπτιδίων επέφεραν τα ίδια αποτελέσματα με τις προαναφερθείσες.



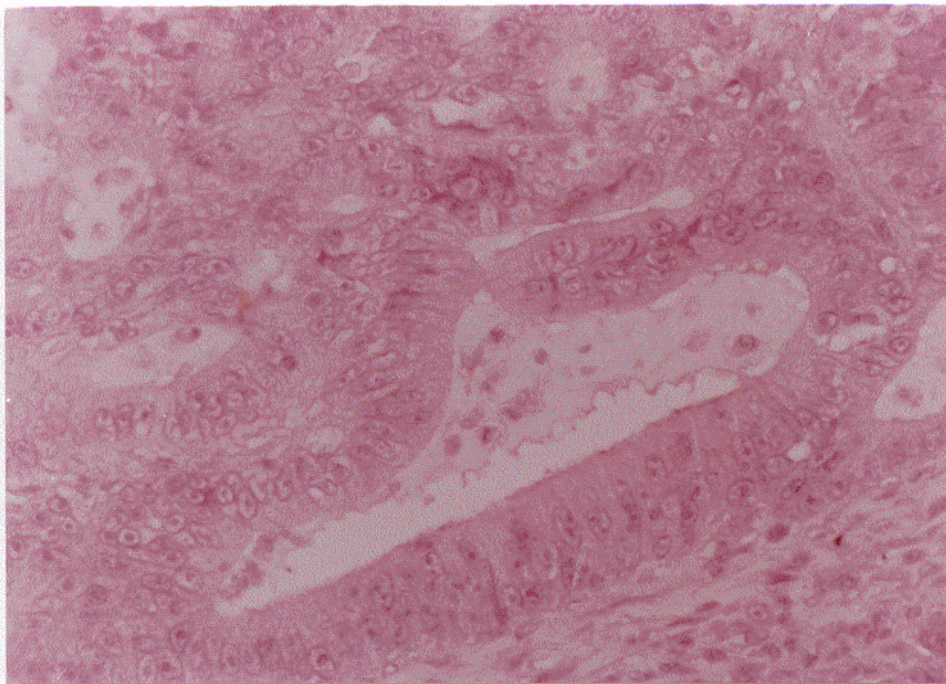
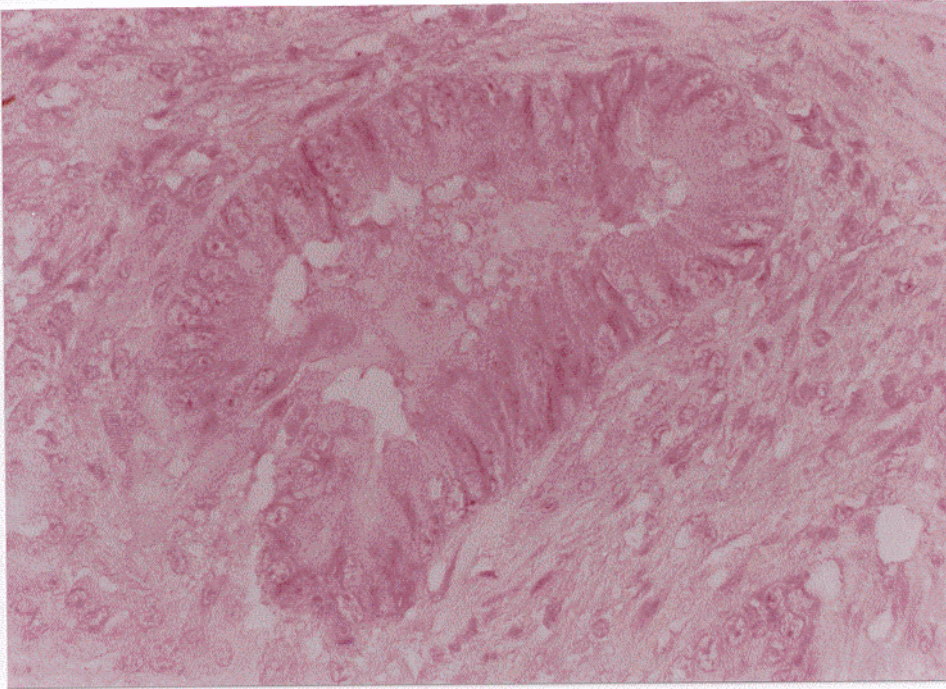
Διάγραμμα 11.

Ειδική πρόσδεση σούπας αντισωμάτων από τυχαία Muc2 καλλιέργεια σε καρκινικές σειρές, HT29 (A), T47D (B) και LIM2412 (Γ). M1—ποσοστό κυττάρων που εμφανίζουν ειδική πρόσδεση. Αρνητικό CNTR σελ. 50

Επίσης, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις στους ίδιους τύπους ιστών δεν απέδωσαν κανένα θετικό σήμα (Εικ. 4)

Παράλληλα η συγκέντρωσή τους εμφανίστηκε ιδιαίτερα χαμηλή – γύρω στα 0,5mg/ml - όπως έδειξε η μέτρηση της OD στα 280nm.

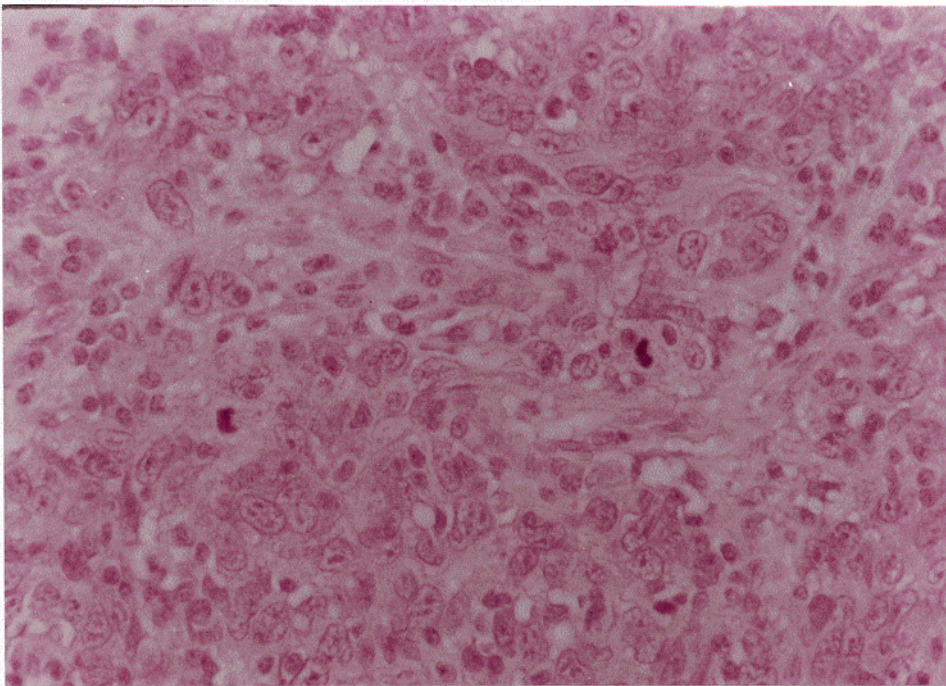
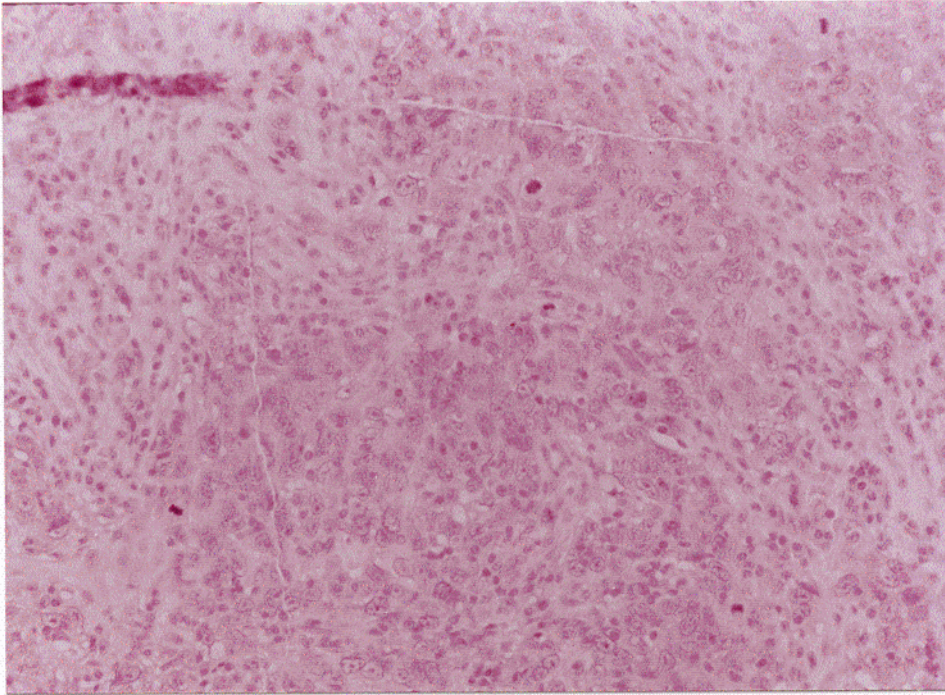
A



B

Εικ. 1 Χρώση τομών από καρκίνο παχέως εντέρου X400. (A) Αρνητικό δείγμα. (B) Χρώση με το αντίσωμα α-Muc3.

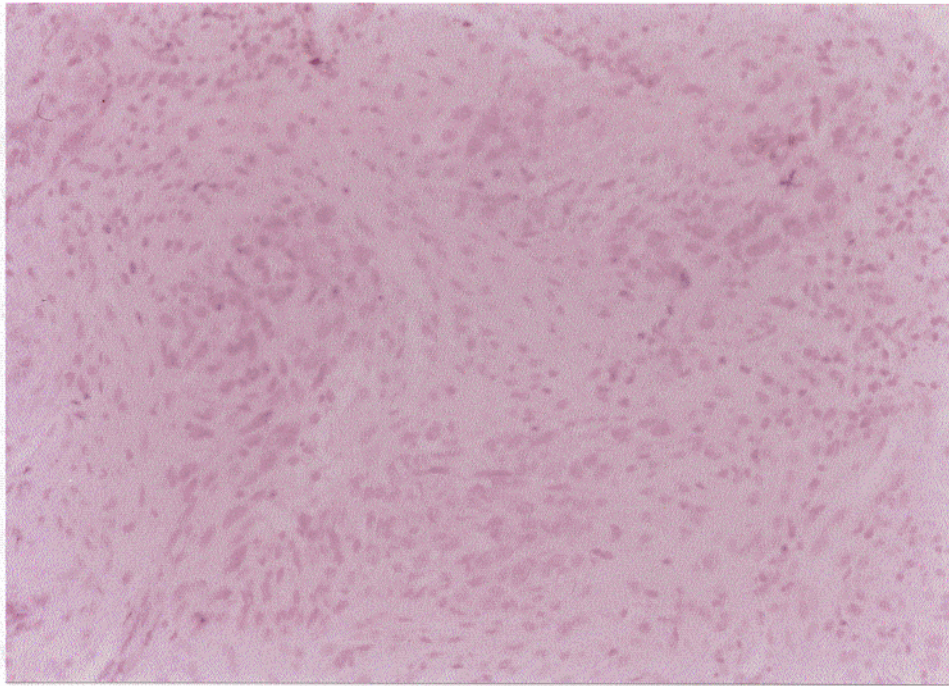
A



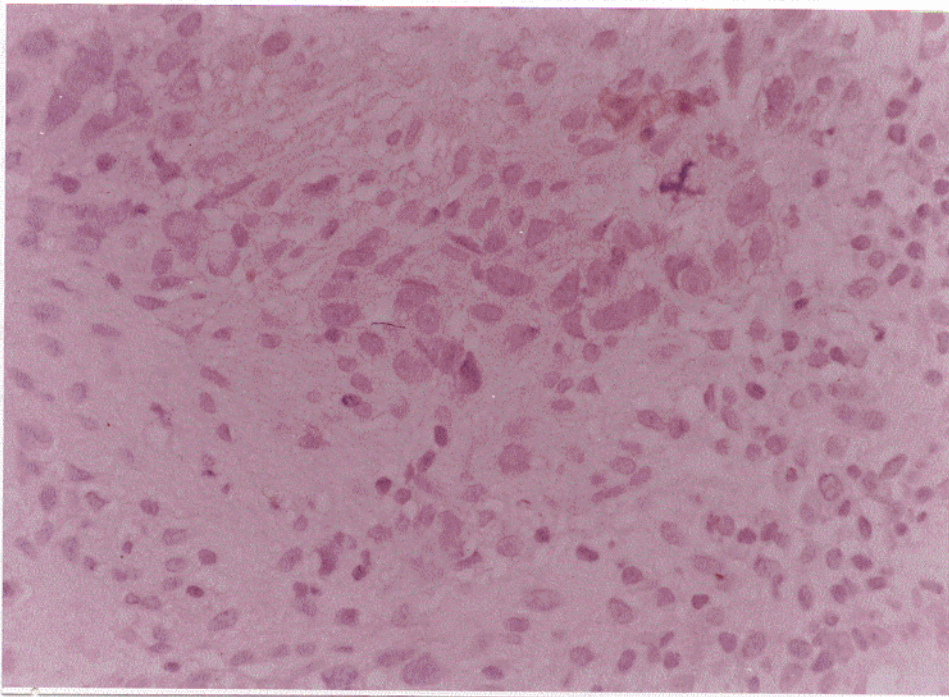
B

Εικ. 2 Χρώση τομών από όγκο σε λεμφαδένες. (A) Αρνητικό δείγμα X200. (B) Χρώση με το αντίσωμα α-Muc3, X400.

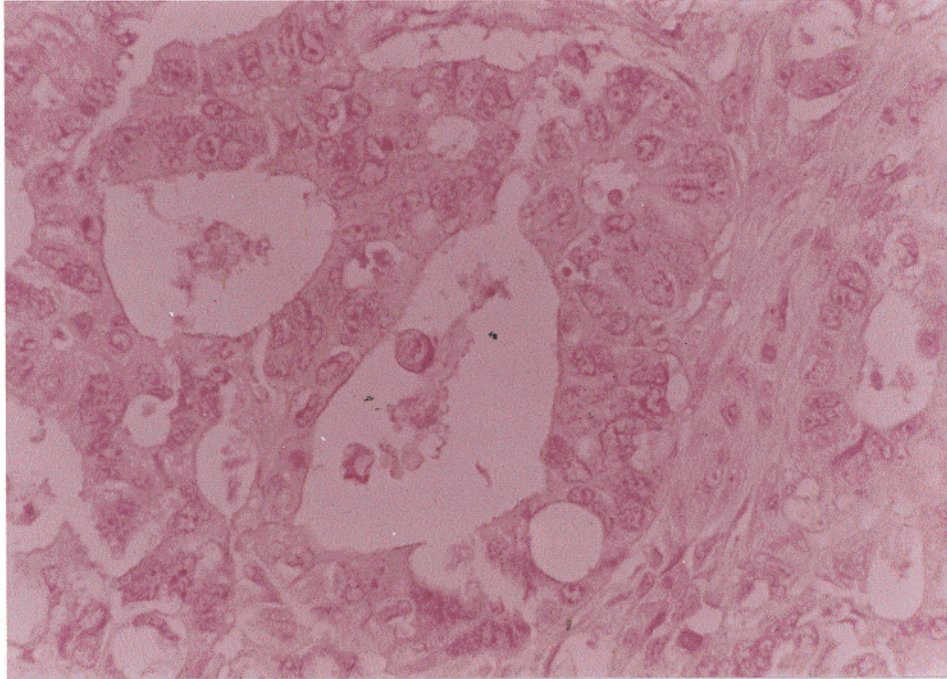
A



B



Εικ. 3 Χρώση τομών από όγκο μαστού. (A) Αρνητικό δείγμα X200. (B) Χρώση με το αντίσωμα α-Muc3, X400.



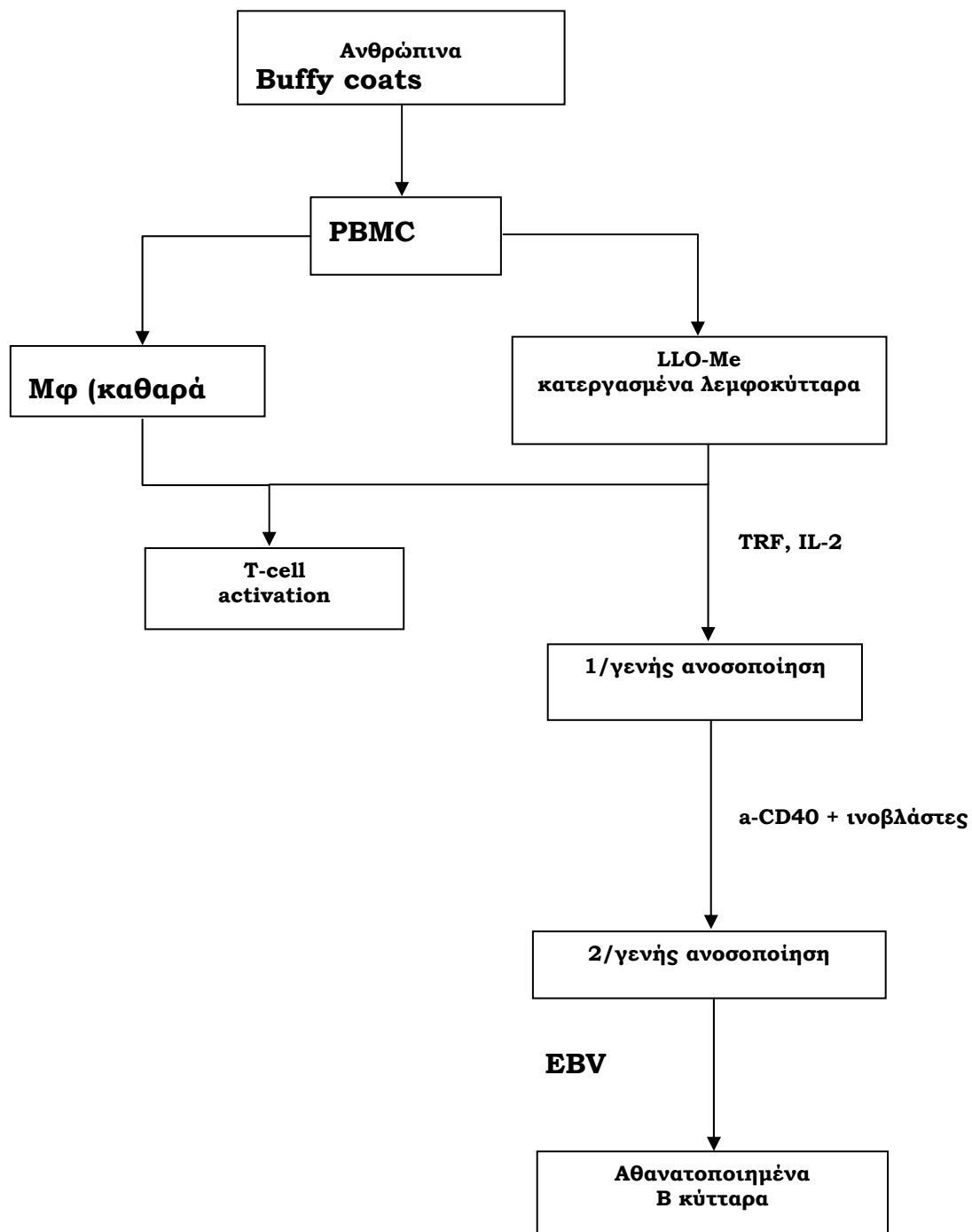
Εικ. 4 Χρώση τομής από καρκίνο παχέως εντέρου με το πολύ-ειδικό αντίσωμα X400. Αρνητικό δείγμα σελ. 63 . Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζεται και στους υπόλοιπους ιστούς (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ποικίλης προέλευσης σε ανθρώπινες θεραπευτικές εφαρμογές, για πολλά χρόνια ετίθοντο κάτω από περιορισμούς οφειλόμενους σε δυσκολίες δημιουργίας αντισωμάτων με ικανοποιητικές συγγένειες πρόσδεσης στο αντιγόνο και/ή σε δυσκολίες σταθερής παραγωγής.

Γι αυτούς τους λόγους πολλές ερευνητικές προσπάθειες ξεκίνησαν γύρω στο 1980 με σκοπό να δημιουργήσουν τη τεχνολογική βάση που ήταν απαραίτητη για τη γένεση ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το βασικό πρόβλημα σε όλες αυτές τις προσπάθειες ήταν και συνεχίζει να είναι το ότι τα ανθρώπινα όντα δεν μπορούν σκόπιμα να ανοσοποιηθούν εναντίον καρκινικών κυττάρων, ιών ή άλλων μολυσματικών μορίων λόγω δεοντολογικών περιορισμών, και ως εκ τούτου τα απαραίτητα ανοσοποιημένα Β κύτταρα δεν μπορούν να δημιουργηθούν. Για τη λύση του παραπάνω προβλήματος οι έρευνες εστιάστηκαν στην κατανόηση των βασικών αυξητικών απαιτήσεων των ανθρώπινων Β κυττάρων η οποία μας επιτρέπει την ανάπτυξη συστημάτων *in vitro* ανοσοποίησης των κυττάρων αυτών δηλαδή έξω από το ανθρώπινο σώμα. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές παραγωγής πιθανώς υψηλής συγγένειας ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων σημαντικά για: ανοσοθεραπεία μολυσματικών ασθενειών, για την καταπολέμηση διαφόρων μορφών καρκίνου, για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων ή αλλεργικών νοσημάτων ή για χρήση τους σε μεταμοσχεύσεις οργάνων.

Παραδοσιακά πρωτόκολλα *in vitro* ανοσοποιήσεων κατάφεραν να επάγουν μόνο μία χαμηλή συχνότητα αντιγονο-ειδικών IgM Β κυττάρων (Chin *et al.*, 1994, Danielsson *et al.*, 1991) ικανά να παράγουν αντισώματα με συγγένειες συνήθως μέσα στο μM εύρος. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Πίνακας 1) είχε ως βασικό στόχο την αύξηση κατά πρώτο της συχνότητας των αντιδρώντων αντιγονο-ειδικών Β κυττάρων και κατά δεύτερο την αλλαγή του ισοτύπου της πρωτογενούς εκφραζόμενης ανοσοσφαιρίνης. Για να επιτεύξουμε τα παραπάνω προσπαθήσαμε να μιμηθούμε τα γεγονότα που πραγματοποιούνται μέσα στα βλαστικά κέντρα ερευνώντας τις μοριακές και κυτταρικές απαιτήσεις που χρειάζονται για την αντιγονο-ειδική αλλαγή του ισοτύπου των Β κυττάρων.



Πίνακας 1. Σχηματικό μοντέλο της *in vitro* ανοσοποίησης.

Βασικά συστατικά στοιχεία του μηχανισμού ήταν:

- Η ανεξάρτητη παρουσία T (pTT) και B (Muc) καθοριστή μέσα σ' ένα ετερότοπο.
- Η στρατολόγηση και η κατεύθυνση του πολλαπλασιασμού τετανο-ειδικών T κυττάρων μνήμης (T cell activation) τα οποία απαντούν σε διαφορετικές συχνότητες στο μεγαλύτερο ποσοστό του δυτικού πληθυσμού.
- Η δύο σταδίων ενεργοποίηση των αντιγονο-ειδικών B κυττάρων με χρήση του CD40 συστήματος.

Λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα οροαρνητικών υγιών δοτών κατεργασμένα με το μεθυλεστέρα της διλευκίνης, ο οποίος σκοτώνει επιλεκτικά τα μη ειδικά κυτταροτοξικά κύτταρα που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις *in vitro* καλλιέργειες και να προκαλέσουν μείωση της ανοσολογικής απάντησης, ανοσοποιήθηκαν με τον pTT-Muc(2,3,4) ετερότοπο. Με τη βοήθεια μίγματος ιντερλευκινών και μιτογόνου (TRF) έχουμε μία πολυκλωνική ενεργοποίηση όλων των λεμφοκυττάρων αλλά παράλληλα τίθεται σε εξέλιξη η επιμέρους αντιγονο-ειδική ενεργοποίηση των B και T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν το πεπτιδικό αντιγόνο (ετερότοπο) με τους επιφανειακούς τους υποδοχείς (Chin *et al.*, 1994). Τα σήματα αυτά (IL-2, μιτογόνο, αναγνώριση πεπτιδίου) οδηγούν σε πολλαπλασιασμό κυρίως τον ειδικό B κυτταρικό πληθυσμό δίχως περαιτέρω προώθηση της διαφοροποίησης του (Ohlin *et al.*, 1989, Chin *et al.*, 1995) και όχι τόσο τον T λόγω απουσίας Mφ ως APCs.

Παράλληλα καλλιέργειες LLO-Me κατεργασμένων λεμφοκυττάρων και ακτινοβολημένων Mφ παρουσία του pTT πεπτιδίου έδωσαν αύξηση του τετανο-ειδικού T κυτταρικού πληθυσμού. Τα Mφ ως APCs κατέργασαν και παρουσίασαν στην επιφάνειά τους το pTT ως σύμπλοκο με MHC τάξης II μόρια. Φαίνεται από τα αποτελέσματα της πολλαπλασιαστικής δοκιμής ότι ο καθαρισμός των Mφ από τους άλλους συστατικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (NK, Tc κ.τ.λ.) απομακρύνει ίσως αρνητικές επιρροές αυτών των ομάδων και διευκολύνει τις διεργασίες παρουσίασης αντιγόνου. Το σύμπλοκο αυτό είναι δυνατό να αναγνωριστεί μόνο από τα T κύτταρα με τον ειδικό TCR που ουσιαστικά δεν είναι άλλα από τα τετανο-ειδικά κύτταρα μνήμης του δότη. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην έκκριση λεμφοκινών που δρουν ως σήματα διέγερσης του πολλαπλασιασμού αυτών των T κυττάρων.

Έτσι φτάνουμε στο σημείο να διαθέτουμε 2 κυτταρικούς πληθυσμούς (memory pTT T κύτταρα, Muc- ειδικά κύτταρα) οι οποίοι απαντούν σε συχνότητα μεγαλύτερη από την αρχική. Οι πληθυσμοί αυτοί πρέπει να επιβιώσουν και να αλληλεπιδράσουν μέσω βασικών και απαραίτητων κυτταρικών επαφών προκειμένου να επιτευχθούν τα γεγονότα για αλλαγή ισotyπου των B κυττάρων όπως τουλάχιστον παρατηρείται στο *in vivo* σύστημα.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη καλλιέργεια τους πάνω σε στρώμα ακτινοβολημένων CD32 μετασχηματισμένων ινοβλαστών, παρουσία του anti-CD40 μονοκλωνικού αντισώματος και του ετερότοπου pTT-Muc(2,3,4). Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες παράλληλη πρόσδεση του anti-CD40 mAb (Bjorck *et al.*, 1994) στο CD40 μόριο των B κυττάρων και στους Fcγ receptors (FcγRs ή CD32) των ινοβλαστών διευκολύνει τη βέλτιστη συνεισφορά του CD40 στην ενεργοποίηση των B κυττάρων. Το σήμα αυτό αποτελεί ένα ερέθισμα που αφορά όλο το ρεπερτόριο των B κυττάρων που βρίσκονται μέσα στην καλλιέργεια, το οποίο όμως γίνεται ακόμα πιο έντονο στα ειδικά B κύτταρα που φέρουν την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη για το Muc πεπτιδίο του ετερότοπου.

Ανάλογα με την *in vivo* κατάσταση τα B κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά από πρόσδεση του αντιγόνου στην ειδική s-Ig. Το B κύτταρο κατόπιν δρα ως APC εσωτερικοποιώντας, κατεργάζοντας και παρουσιάζοντας το αντιγόνο στα CD4⁺ T helper κύτταρα πάνω σε τάξης II μόρια. Τα μόνα T κύτταρα που μπορούν να αναγνωρίσουν μέσω του TCR τους αυτό το σύμπλοκο είναι τα pTT-ειδικά κύτταρα (παρόντα στην καλλιέργεια) τα οποία ενεργοποιούνται, εκφράζουν CD40L, και παράγουν ένα μίγμα λεμφοκινών. Τα ειδικά B κύτταρα με τη σειρά τους γίνονται επιπλέον ενεργά ως συνέπεια της CD40-CD40L αλληλεπίδρασης και οδηγούνται σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Λόγω του ότι η πιθανότητα να συναντηθούν και να αλληλεπιδράσουν τέτοια B και T κύτταρα είναι εξαιρετικά χαμηλή, γι' αυτό ο εμπλουτισμός των πληθυσμών τους στα προαναφερόμενα στάδια θεωρείται απαραίτητος. Τα παραγόμενα IgG αντισώματα, όπως δείχνουν τα αποτελεσματα μου, φανερώνουν την επιτυχία του συστήματος για την αλλαγή του ισotyπου.

Χρησιμοποιώντας την παραπάνω τεχνική προσέγγιση καταφέραμε να πάρουμε διάφορα κλάσματα κυρίως IgG αντισωμάτων με μία ή με περισσότερες ειδικότητες (polyspecific). Η μείωση της συχνότητας των ειδικών IgM αντισωμάτων μετά την EBV επιμόλυνση (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα) σε

σχέση με την πρωτογενή ανοσοποίηση, ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι με την αλλαγή του ισοτύπου (Fujieda *et al.*, 1995) χάνεται η ικανότητα της IgM να πολυμερίζεται και έτσι δεν ανιχνεύονται οι ειδικότητες με ιδιαίτερα χαμηλή συγγένεια προς το αντιγόνο.

Ανοσοποιώντας τα λεμφοκύτταρα μας με τα Muc συνθετικά πεπτιδία βρεθήκαμε αντιμέτωποι με μία επιπλέον σειρά προβλημάτων τα οποία εστιαζόταν κυρίως στη φύση του αντιγόνου ανοσοποίησης. Μεγάλο ποσοστό επιθηλιακών κυττάρων φέρουν και εκκρίνουν φυσιολογικά βλεννίνες οπότε ο οργανισμός τις αναγνωρίζει ως αντιγόνα εαυτού. Οι διαφορές που εντοπίζονται ανάμεσα σ' αυτά τα «φυσιολογικά μόρια» και στα αντίστοιχα που εκφράζονται στους καρκινικούς ιστούς αφορούν κυρίως το ποσοστό έκφρασης τους (ιδιαίτερα αυξημένο στα καρκινικά) καθώς και την ατελή ή τελείως απύουσα γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνικών τους σκελετών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση του σκελετού της πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως ανοσοθεραπευτικός στόχος.

Παρόλα αυτά αξιοσημείωτο ποσοστό anti-Muc αντισωμάτων έχει ανιχνευθεί τόσο σε ορό φυσιολογικών όσο και καρκινοπαθών ατόμων. Η αιτιολογία του παραπάνω φαινομένου αποκαλύπτεται στη δράση αυτών των αντισωμάτων. Πρόκειται λοιπόν για αντισώματα της ομάδας του «γενικού νοικοκυριού» (house keeping) του οργανισμού, τα οποία προσδένονται με χαμηλή συγγένεια τόσο στους Muc επίτοπους όσο και σε άλλα επιφανειακά αντιγόνα των επιθηλιακών κυττάρων των βλεννογόνων (polyspecific antibodies). Η δράση τους συνίσταται στην ανανέωση των κυττάρων αυτών που παρουσιάζουν μικρό χρόνο ζωής από την κατώτερη στοιβάδα.

Αν και έχει μελετηθεί εκτενώς η VNTR περιοχή του πρωτεϊνικού σκελετού των βλεννινών και έχει συντεθεί μεγάλη ποικιλία πεπτιδίων οι επακριβείς αντιγονικοί επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα δεν έχουν προσδιοριστεί. Η παρουσία α-Muc αντισωμάτων χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης στον ορό φυσιολογικών ατόμων αποκαλύπτει και την παρουσία μικρού αλλά υπαρκτού ποσοστού ειδικών B κυττάρων με επιφανειακή έκφραση της χαμηλής συγγένειας ανοσοσφαιρίνης IgM, ο οποίος *in vivo* δεν διαφοροποιείται παρακάτω. Τον πληθυσμό αυτό κληθήκαμε να εμπλουτίσουμε και να τροποποιήσουμε μέσω της δευτερογενούς ανοσοποίησης, σ' ένα νέο

πληθυσμό ειδικών B κυττάρων που θα έχουν υποστεί αλλαγή ισοτύπου της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης.

Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρυντικά όσο αφορά το κομμάτι αυτό παρόλο που στην πλειάδα των περιπτώσεων δεν καταφέραμε να πάρουμε αντισώματα με συγκεκριμένη ειδικότητα προς το πεπτιδίο ανοσοποίησης (polyspecific αντισώματα). Αυτά παρουσιάζουν την ιδιότητα αναγνώρισης ενός ευρέως φάσματος πεπτιδίων γεγονός που δείχνει ότι δεν τα διαφοροποιεί από την προαναφερόμενη ομάδα των house keeping αντισωμάτων αν και δεν μετρήθηκε η συγγένεια προσδεσής τους στο αντιγόνο.

Το επιτυχές σημείο μέσα σ' αυτήν την επίπονη προσπάθεια ήταν να ληφθεί – αν και σε εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα – ένα ειδικό για το Muc3 ανθρώπινο αντίσωμα το οποίο απέδειξε σε πλειάδα ελέγχων τη θετικότητά του. Έτσι πειράματα αναστολής και ειδικότητας το παρουσίασαν να αντιδρά και να αναστέλλεται μόνο με το Muc3 πεπτιδίο ενώ παράλληλες κυτταρομετρικές μελέτες με καρκινικά κύτταρα διαφόρων ιστών που εκφράζουν ή όχι το πεπτιδίο το έδειξαν να βάφει ειδικά σ' ένα ποσοστό που ανάλογα με την περίπτωση και τη χρώση προσεγγίζει μέχρι και το 60%. Ανοσοιστοχημικές μέθοδοι σε αντίστοιχες τομές ιστών εμφάνισαν ελαφρώς θετικό σήμα αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου, παρόλο που βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα (Apostolopoulos *et al.*, 1996) θεωρούν προτιμητέες για τέτοιες χρώσεις τομές ιστών σε κρουστόμο παρά σε μικροτόμο λόγω του ότι το σήμα εμφανίζεται αρκετά πιο ισχυρό.

Στα μελλοντικά σχέδια είναι η μέτρηση της συγγένειας του συγκεκριμένου αντισώματος, καθώς και ο ακριβής προσδιορισμός του ολοκληρωμένου ισοτύπου (IgG1 ή IgG2 ...) αλλά και τον επακριβή επίτοπο αναγνώρισης.

Πολλές μελέτες έχουν στραφεί στην παραγωγή ανάλογων ποντικίσων μονοκλωνικών αντισωμάτων (Xing *et al.*, 1992, 1997) χωρίς να προσφέρουν όμως τα θεωρητικά πλεονεκτήματα των ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Κλινικές δοκιμές με ποντικίσια mAbs έχουν γενικά δώσει απογοητευτικά αποτελέσματα:

1. Τα ποντικίσια mAbs σταθερά προκαλούν μία ανθρώπινη a-mouse ανοσολογική απάντηση χωρίς να είναι αποτελεσματικά ως κυτταροτοξικά μέσα και δίχως να έχουν την ικανότητα να στρατολογούν effector κύτταρα ή μόρια του συστήματος του συμπληρώματος.

2. Τα ανθρώπινα μπορούν να αντιδρούν με σημαντικούς επίτοπους πολλών ανοσογόνων οι οποίοι δεν αναγνωρίζονται απευθείας από τα ποντικίσια τα οποία τείνουν να κατευθύνονται εναντίον πολύ συγκεκριμένων ανοσοεπικρατών επίτοπων.
3. Όταν τα ποντικίσια μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται για χρήση σε εμβόλια μπορεί να αποτύχουν να αναγνωρίσουν επίτοπους που είναι αρκετά «προστατευμένοι» στον άνθρωπο.
4. *In vivo* παροχή ανθρώπινων αντισωμάτων θα είναι γενικά περισσότερο αποτελεσματική και σαφώς λιγότερο ανοσογονική. Οι συνδεδεμένες με ασπαραγίνη υδατανθρακικές πλευρικές αλυσίδες των ανθρώπινων αντισωμάτων είναι περισσότερο συμβατές με τους Fc υποδοχείς πάνω στα ανθρώπινα effector κύτταρα απ' ότι παρόμοιες υδατανθρακικές αλυσίδες πάνω στα ποντικίσια αντισώματα.

Η γενετική σχεδίαση αντισωμάτων με μειωμένη ανοσογονικότητα στον άνθρωπο έχει βρει τον τελευταίο καιρό θερμούς υποστηρικτές, όμως τέτοια πειράματα σήμερα έχουν γίνει με περιορισμένη επιτυχία. Ξεμερικά' αντισώματα που συνδυάζουν τη μεταβλητή περιοχή (V) ποντικίσια αντισωμάτων με τη σταθερή περιοχή (C) ανθρώπινων αντισωμάτων διατηρούν την ανοσογονικότητά τους στον άνθρωπο. Ήumanized' αντισώματα στα οποία οι CDRs περιοχές των ποντικίσια αντισωμάτων συγκεντρώνονται σ' ένα ανθρώπινο antibody framework, είναι δύσκολο να φτιαχτούν και συνήθως δίνουν μόρια με μειωμένη συγγένεια για το αντιγόνο. Καθαρά, αυτές οι προσεγγίσεις δεν παρέχουν ένα εύρωστο σχήμα για τη δημιουργία ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανοσοθεραπεία.

Βασικός στόχος της μηχανικής ανασυνδυασμένων αντισωμάτων είναι η ανάπτυξη της 'Phage-antibody-display' τεχνολογίας η οποία έχει φέρει επανάσταση δίνοντας μας την ικανότητα να επιλέγουμε ανθρώπινα mAbs και να φτιάχνουμε μία σειρά παραγώγων με επιθυμητές ιδιότητες για ανοσοθεραπεία. Μεγάλες συλλογές (ρεπερτόρια) single chain Fv (scFv) ή Fab τμημάτων ανθρώπινων αντισωμάτων μπορούν να εκφραστούν στην επιφάνεια φαγικών σωματιδίων και αντισώματα με επιθυμητές ειδικότητες μπορούν να επιλεγθούν απ' αυτές τις phage-display βιβλιοθήκες σκρινάροντας με τα κατάλληλα αντιγόνα. Έτσι μέσα από ένα αριθμό βιβλιοθηκών με ικανοποιητικά μεγέθη και μεγάλη ποικιλία μπορούμε να απομονώσουμε αντισώματα κάθε ειδικότητας,

περιλαμβάνοντας και αντισώματα με υψηλή συγγένεια. Ένα καθοριστικό σημείο της σύστασης και της ποικιλίας αυτών των *in vitro* ανοσολογικών συστημάτων είναι η πηγή των γονιδίων των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται ως δομικοί λίθοι για το φτιάξιμο της βιβλιοθήκης. Συνήθως οι βιβλιοθήκες αυτές σχηματίζονται από τις V περιοχές που εκφράζονται από B κύτταρα ενός ατόμου για το οποίο είναι γνωστό ότι έχει την ικανότητα μίας συγκεκριμένης ανοσολογικής απάντησης ως αποτέλεσμα ανοσοποίησης ή έκθεσης στο μολυσματογόνο μέσο. Το ρεπερτόριο των B κυττάρων στα λεμφατικά όργανα αυτών των ατόμων εμπλουτίζεται από αντιγόνο-ειδικά B κύτταρα και πλασματοκύτταρα τα οποία έχουν υποστεί κλωνική εξάπλωση και affinity maturation για το αντιγόνο, αυξάνοντας την πιθανότητα επιλογής αντισωματικών τμημάτων υψηλής συγγένειας (Fabs) από την τελική ‘ανοσοποιημένη’ βιβλιοθήκη φάγων.

Οι προσπάθειες ανάπτυξης πολλών άλλων διαφορετικών προσεγγίσεων για *in vivo* ανοσοποιήσεις εναντίον για παράδειγμα του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιώντας συνθετικούς υδατάνθρακες ή πεπτίδια συζευγμένα με διάφορους φορείς (π.χ. manan) (Apostolopoulos *et al.*, 1996) οδηγούν είτε σε κυτταρική ή σε χυμική απάντηση ανάλογα με τον τρόπο της σύζευξης (αναγωγικό ή οξειδωτικό). Μια τέτοιου είδους όμως κυτταροτοξική αντίδραση ενέχει πολλαπλούς κινδύνους εμφάνισης αυτοάνοσων καταστάσεων. Το αντιγόνο εαυτού (Muc) συζευγμένο με το φορέα είναι δυνατό να αναγνωριστεί ως ξένο, να παρουσιαστεί ως σύμπλοκο με τάξης I μόρια του MHC οπότε τα Tc μπορούν να ξεκινήσουν ένα καθάρισμα όλων των κυττάρων που φέρουν τα αντιγόνα εαυτού καταστρέφοντας παράλληλα με τα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα.

Συνοψίζοντας, προσπαθήσαμε για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας το προαναφερόμενο σύστημα *in vitro* ανοσοποίησης να μιμηθούμε μια *in vivo* χυμική ανοσολογική απάντηση με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον αντιγόνων του ‘εαυτού’. Ήταν μία πρώτη προσέγγιση του θέματος που απαιτεί περαιτέρω μελέτη μέσα από μια σειρά καινούριων πολλαπλών ανοσοποιήσεων που θα μπουν στο πρόγραμμα. Η λήψη έστω και σ’ αυτή την εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα ειδικού αντισώματος, μας δίνει ελπίδες για την αξιοπιστία, την ποιότητα και τη δυνατότητα βελτίωσης της μεθόδου καθώς και κουράγιο για την συνέχεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF. A role for phosphatidylinositol 3-kinase in generating T cell help for B cell growth and differentiation. *J. Immunol.* 1996 **157 (7)**: 2769-2778.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 1991 W.B. Saunders Company.
- Apostolopoulos V, McKenzie IFC, Pietersz GA. Breast cancer immunotherapy. Current status and future prospects. *Immunology and Cell Biology* 1996 **74**: 457-464.
- Apostolopoulos V, Xing PX, McKenzie IFC. Anti-peptide monoclonal antibodies to intestinal mucin 3. *Journal of Gastroenterological Hepatology* 1995 **10**: 555-561.
- Apostolopoulos V, Xing PX, McKenzie IFC. Anti-peptide monoclonal antibodies to intestinal mucin 3. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1995 **10**: 555-561.
- Apostolopoulos V, Xing PX, McKenzie IFC. Murine immune response to cells transfected with human Muc1: immunization with cellular and synthetic antigens. *Cancer research* 1994 **54**: 5186-5193.
- Apostolopoulos V, Xing PX, Trapani JA, McKenzie IFC. Production of anti-breast cancer monoclonal antibodies using a glutathione-S-transferase-Muc1 bacterial fusion protein. *Br. J. Cancer* 1993 **67**: 713-720.
- Arlen M, Tsang A, Wang T. Immunotherapy of colon cancer using chimeric mAb 31.1. *Crit. Rev. Immunol.* 1998 **18 (1-2)**: 133-138.
- Bajorath J, Chalupny NJ, Marken JS, *et al.* Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor ligand interaction. *Biochemistry* 1995 **34(6)**: 1833-1844.
- Bartlett WC, McCann J, *et al.* Cognate interactions between helper T cells and B cells. Requirements for the expression of effector phase activity by helper T cells. *J. Immunol.* 1990 **145 (12)**: 3956-3962.
- Beagley KW, Husband AJ. Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. *Crit. Rev. Immunol.* 1998 **18(3)**: 237-254.
- Bjorck P, *et al.* *Immunology* 1994 **83**: 430-437.

- Blanchard D, Gaillard C, Hermann P, Banchereau J. Role of CD40 antigen and IL-2 in T cell dependent human B lymphocyte growth. *Eur. J. Immunol.* **24(2)**: 330-335.
- Bonnefoy JY, Gauchat JF, Life P, *et al.* Regulation of IgE synthesis by CD23/CD21 interaction. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995 **107(1-3)**: 40-42.
- Bradley LM, Yochimoto K, Swain SL. The cytokines IL-4, IFN- γ , and IL-12 regulate the development of subsets of memory effector helper T cells *in vitro*. *J. Immunol.* 1995 **155(4)**: 1713-1724.
- Brugnani d, Rossi G, Tucci G, *et al.* Study of CD40L expression in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1995 **80(5)**: 440-442.
- Carter LL, Zhang X, Dubey C, *et al.* Regulation of T cell subsets from naïve to memory. *J. Immunother.* 1998 **21(3)**: 181-187.
- Castigli E, Fuleihan R, Ramesh N, *et al.* CD40L/CD40 deficiency. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995 **107 (1-3)**: 37-39.
- Chang JC, Zhang L, Edgerton TL, Kaplan AM. Heterogeneity in direct cytotoxic function of L3T4 T cells. TH1 clones express higher cytotoxic activity to antigen presenting cells than TH2 clones. *J. Immunol.* 1990 **145(2)**: 409-416.
- Chin LT, *et al.* *Eur. J. Immunology* 1995 **25**: 657-663.
- Chin LT, *et al.* *Immunology* 1994 **81**: 428-434.
- Couderc B, Zitvogel L, Douin-Echinard V, *et al.* Enhancement of antitumor immunity by expression of CD70 (CD27L) or CD154 (CD40L) costimulatory molecules in tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 1998 **5(3)**: 163-175.
- Dahiya R, Kwak KS, Ho SB, *et al.* Cystic fibrosis and pancreatic cancer cells synthesize and secrete Muc1 type mucin gene product. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995 **35**: 351-362.
- Dahiya R, Lesuffleur T, KwakKS, *et al.* Expression and characterization of mucins associated with the resistance to methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Res* 1992 **17**: 4655-4662.
- Dailey MO. Expression of T lymphocyte adhesion molecules: regulation during antigen induced T cell activation and differentiation. *Crit. Rev. Immunol.* 1998 **18(3)**: 153-184.

- Danielsson L, *et al.* Immunology 1991 **74**: 50-54.
- Datta SK, kaliyaperumal A, Desai-Metha A. T cells of lupus and molecular targets for immunotherapy. J. Clin. Immunol. 1997 **17 (1)**: 11-20.
- de Boer M, Karsan A, Kwekkeboom J, Walter H, Vandenberghe P, Ceuppens JL. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40L expression, IL-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. Eur. J. Immunol. 1993 **23(12)**: 3120-3125.
- Devine PL, Birrell GW, Whitehead RH, Harada H, Xing PX, McKenzie IFC. Expressin of Muc1 and Muc2 mucins by human tumor cell lines. Tumor Biol. 1992 **13**: 268-277.
- Devine PL, McKenzie IFC. Mucins: Structure, Function, and Associations with Malignancy. BioEssays 1992 **14**: 619-625.
- Ding L, Green JM, Thompson CB, Shevach EM. B7/Cd28 dependent and intependent induction of CD40 ligand expression. J Immunol. 1995 **155(11)**: 5124-5132.
- Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. Annu Rev. Immunol. 1998 **16**: 201-223.
- Fitch F, Gajewski T, Nau G, Shell S, Otten G. Nakahara memorial lecture. Regulation of T lymphocyte responses: interactions among receptors. Princess Takamatsu Symp. 1988 **19**: 15-27.
- Fujieda S, *et al.* J. Immunology 1995 **155**: 2318-2328.
- Gajewski TF, Schell SR, Fitch FW. Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones. J. Immunol. 1990 **144(11)**: 4110-4120.
- Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. Immunol. Rev. 1989 **111**: 79-110.
- Geenen V, martens H, Vandersmissen E, *et al.* Cellular and molecular aspects of thymic T cell education in neuroendocrine self-principles. Implications for autoimmunity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998 **840**: 328-337.
- Gordon J, Katira A, Holder M, *et al.* Central role of CD40 and its ligand in B lymphocyte responses to T- dependent antigens. Cell Mol. Biol. 1994 **40**: 1-13.

- Grabstein KH, Maliszewski CR, Shanebeck K, *et al.* The regulation of T cell dependent antibody formation *in vitro* by CD40L and IL-2. *J. Immunol.* 1993 **150(8 Pt 1)**: 3141-3147.
- Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40L in costimulation and T cell activation. *Immunol. Rev.* 1996 **153**: 85-106.
- Han S, Hathcock K, Zheng B, *et al.* Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J. Immunol.* 1995 **155(2)**: 556-567.
- Hartwing UF, Karlsson L, Peterson PA, Webb SR. CD40 and IL-4 regulate murine CD27L expression. *J. Immunol.* 1997 **159(12)**: 6000-6008.
- Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, *et al.* Mucin gene expression in normal, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res.* 1995 **12**: 2681-2690.
- Hollander GA, Castigli E, Kulbacki R, *et al.* Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 **93(10)**: 4994-4998.
- Hollingsworth MA, Strawhecker JM, Caffrey TC, Mack DR. Expression of Muc1, Muc2, Muc3 and Muc4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 1994 **57**: 198-203.
- Iwata M, Nunoi H, Nonoyama S, *et al.* Neutropenia in patient with X-linked hyper IgM syndrome. *Rinsho Ketsueki* 1995 **36(10)**: 1223-1229.
- Jaiswal AI, Croft M. CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide presenting B cells: implications for development of the primary T and B cell response. *J. Immunol.* 1997 **159(5)**: 2282-2291.
- Jones KW, Hackett CJ. Activated T hybridomas induce upregulation of B7-1 on Bystander B lymphoma cells by a contact- dependent interaction utilizing CD40 ligand. *Cell Immunol.* 1996 **174(1)**: 42-53.
- Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, Ong CS, *et al.* Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-Muc1 fusion protein. *J. Clin. Invest.* 1997 **100 (11)**: 2783-2792.
- Katada Y, Tanaka T, Ochi H, *et al.* B cell-Bcell interaction through intercellular adhesion molecule -1 and lymphocyte functional antigen-1 regulates immunoglobulin E synthesis by B cells stimulated with

interleukin-4 and anti-CD40 antibody. *Eur. J. Immunol.* 1996 **26(1)**: 192-200.

- Klaus SJ, Pinchuk LM, Ochs HD, *et al.* Costimulation through CD28 enhances T cell dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J. Immunol.* 1994 **152(12)**: 5643-5652.
- Koshy M, Berger D, Crow MK. Increased expression of CD40L on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1996 **98 (3)**: 826-837.
- Krouwels FH, Nocker RET, Snoek M, *et al.* Immunocytochemical and flow cytometric detection of intracellular IL-4, IL-5 and IFN- γ : applications blood- and airway- derived cells. *Journal of Immunological Methods* 1997 **203**: 89-101.
- Kruman II, Ramiya V, Bondada S. A role for T cell CD4 in contact mediated T dependent B cell activation. *Cell Immunol.* 1996 **173 (2)**: 236-245.
- Kwekkeboom J, de Rijk D, Kasram A, *et al.* Helper effector function of human T cells stimulated by anti- CD3 mAb can be enhanced by co-stimulatory signals and is partially dependent on Cd40-Cd40L interaction. *Eur. J. Immunol.* 1994 **24(3)**: 508-517.
- Laytragoon-Lewin N. Programmed cell death: influence of CD40, CD95 (Fas or Apo-I) and their ligands. *Med. Oncol.* 1998 **15 (1)**: 15-19.
- Lezzi G, karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naïve and effector T cells. *Immunity* 1998 **8**: 89-95.
- Lipsky PE, Attrep JF, Grammer AC, *et al.* Analysis of CD40-CD40L interactions in the regulation of human B cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997 **815**: 372-383.
- Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol. Rev.* 1997 **156**: 111-126.
- Lomo J, Blomhoff HK, Jacobsen SE, Krajewski Se, *et al.* Interleukin-13 in combination with CD40L potently inhibits apoptosis in human B lymphocytes: upregulation of Bcl-xL and Mcl-1. *Blood* 1997 **89 (12)**: 4415-1124.

- Macaulay AE, DeKruyff RH, Goodnow CC, Umetsu DT. Antigen specific B cells preferentially induce CD4⁺ T cells to produce IL-4. *J. Immunol.* 1997 **158(9)**: 4171-4179.
- Maruo S, Oh-hora M, Ahn HJ, *et al.* B cells regulate CD40L induced IL-12 production in antigen presenting cells (APC) during T cell/APC interactions. *J. Immunol.* 1997 **158(1)**: 120-126.
- Michelle M. Tutt Landolfi, Scollay R, Parnes JR. Specific demethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation. *Molecular Immunology* 1997 **34**: 53-61.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* 1986 **136 (7)**: 2348-2357.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today* 1996 **17 (3)**: 138-146.
- Nishioka Y, Lipsky PE. The role of CD40-CD40L interaction in human T cell-B cell collaboration. *J. Immunol* 1994 **153 (3)**: 1027-1036.
- Noelle RJ. The role of gp39 (CD40L) in immunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995 **76**: S203-S207.
- Noelle RJ. The role of gp39 (CD40L) in immunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995 **76(3 Pt 2)**: S203-S207.
- Ogata s, Uehara H, Chen A, Itzkowitz SH. Mucingene expression in colonic tissues and cell lines. *Cancer Res.* 1992 **21**: 5971-5978.
- Ohlin M, *et al.* *Immunology* 1989 **66**: 485-490.
- Panina - Bordington P, *et al.* *Eur. J. Immunology* 1989 **19**: 2237-2242.
- Patel HR, Oshiba A, Jeppson JD, Gelfand EW. Differential expression of Cd40L on T cell subsets. Implications for different roles of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ cells in IgE production. *J. Immunol.* 1996 **156(5)**: 1781-1787.
- Peng X, Remacle JE, Kasran A, *et al.* IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells. *J. Immunol.* 1998 **160(3)**: 1166-1172.
- Peng X, Remacle JE, Kasran A, Huylebroeck D, Ceuppens JL. IL-12 up regulates CD40L (CD154) expression on human T cells. *J. Immunol.* 1998 **160(30)**: 1166-1172.

- Razanajaona D, Denepoux S, Blanchard D, *et al.* *In vitro* triggering of somatic mutation in human naïve B cells. *J. Immunol.* **159(7)**: 3347-3353.
- Reiner SL, *et al.*: *Science* 1993, **259**: 1457-1460.
- Rotteveel FT, Kokkelink I, van Lier RA. Clonal analysis of functionally distinct CD4+ T cell subsets. *J. Exp. Med.* 1988 **168 (5)**: 1659-1673.
- Rubbi CP, Rickwood D. A simple immunomagnetic bead-based technique for the detection of surface molecules capable of inducing T cell functional polarization. *J. Immunol. Methods* 1996 **192 (1-2)**: 157-164.
- Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol* 1994 **153 (8)**: 3514-3522.
- Schattner E, Friedman SM. Fas expression and apoptosis in human B cells. *Immunol. Res.* 1996 **15 (3)**: 246-257.
- Seregni E, Botti C, Lombardo C, *et al.* Pattern of mucin gene expression in normal and neoplastic lung tissues. *Anticancer Res.* 1996 **16**: 2209-2213.
- Seregni E, Botti C, Massaron S, *et al.* Structure, function and gene expression of epithelial mucins. *Tumori* 1997 **83**: 627-632.
- Street NE, Schumacher JH, Fong TA, Bass H. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 1990 **144(5)**: 1629-1639.
- Tsubata T, Wu J, Honjo T. B cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T cell signal through CD40. *Nature* 1993 **364(6438)**: 645-648.
- Umetsu DT, Jabara HH, DeKruyff RH, *et al.* Functional heterogeneity among human inducer T cell clones. *J. Immunol.* 1988 **140 (12)**: 4211-1216.
- Unutmaz D, Baldoni F, Abrignani S. Human naïve T cells activated by cytokines differentiate into a split phenotype with functional features intermediate between naïve and memory T cells. *Int. Immunol.* 1995 **7(9)**: 1417-1424.

- Vacchio MS, Ashwell JD, King LB. A positive role for thymus derived steroids in formation of the T cell repertoire. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998 **840**: 317-327.
- Voynow JA, Rose MC. Quantitation of mucin mRNA in respiratory and intestinal epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994 **6**: 742-750.
- Wallace VA, Penninger JM, Kishihara K, *et al.* Alterations in the level of CD45 surface expression affect the outcome of thymic selection. *J. Immunol.* 1997 **158(7)**: 3205-3214.
- Walsh MD, McGuchin MA, Devine PL, *et al.* Expression of Muc2 epithelial mucin in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1993 **10**: 922-925.
- Willsher PC, Xing PX, Clarke CP, McKenzie IFC, *et al.* Mucin 1 Antigens in the Serum and Bronchial Lavage Fluid of Patients with Lung Cancer. *Cancer* 1993 **72**: 2936-2942.
- Wong RL, Ruddle NH, Padula SJ, *et al.* Subtypes of helper cells. Non-inflammatory type 1 helper T cells. *J. Immunol* 1988 **141(10)**: 3329-3334.
- Wu Y, Xu J, Shindle S, Grewal I, Henderson T, Flavell RA, Liu Y. Rapid induction of a novel costimulatory activity on B cells by CD40L. *Curr. Biol.* 1995 **5(11)**: 1303-1311.
- Wu Y, Zhou Q, Zheng P, Liu Y. CD28 independent induction of T helper cells and immunoglobulin class switches requires costimulation by the heat stable antigen. *J. Exp. Med.* 1998 **187(7)**: 1151-1156.
- Xing PX, Prenzoska J, Layton GT, *et al.* Second – generation antibodies to intestinal Muc2 peptide Reactive with colon cancer. *J. National Canc. Inst.* 1992 **84**: 699-703.
- Xing PX, Prenzoska J, Quelch McKenzie IFC. Second generation anti-Muc1 peptide monoclonal antibodies. *Cancer research* 1992 **52**: 2310-2317.
- Xing PX, Tjandra JJ, Stacker SA, *et al.* Monoclonal antibodies reactive with mucin expressed in breast cancer. *Immunol. Cell. Biol.* 1989 **67**: 183-195.
- Zafiroopoulos A, Anderson E, Krambovitis E, Borrebaeck CAK. Induction of antigen specific isotype switching by *in vitro* immunization of human

naïve B-lymphocytes. *Journal of Immunological Methods* 1997 **200**: 181-190.

- Zouthen J, Krambovitis E, Borrebaeck C, Gordon J, *et al.* *In vitro* immunization of human B-lymphocytes. *Biotechnology* 1995 **1**: 206-208.

