



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ,
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ»

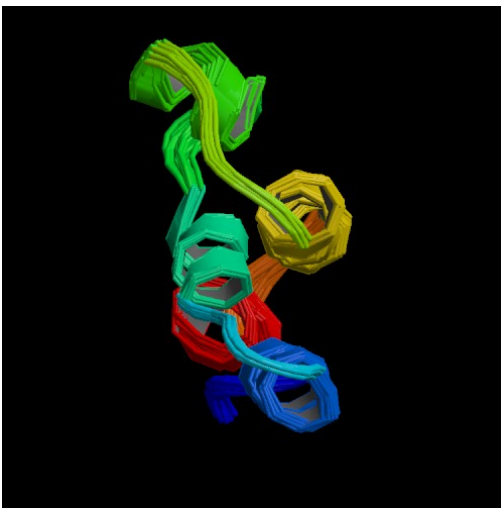
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση φλεγμονωδών μορίων της φυσικής ανοσίας
ως νέων θεραπευτικών μέσων για επιθετικές μορφές
εγκεφαλικού καρκίνου**

ΑΝΤΙΓΟΝΗ ΣΤΑΥΡΙΔΟΥ

A.M. : 20130372

ΒΙΟΛΟΓΟΣ



ΑΘΗΝΑ 2015

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ,
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αξιολόγηση φλεγμονωδών μορίων της φυσικής ανοσίας ως νέων
θεραπευτικών μέσων για επιθετικές μορφές εγκεφαλικού καρκίνου»**

ΑΝΤΙΓΟΝΗ ΣΤΑΥΡΙΔΟΥ
Α.Μ. : 20130372

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέποντες καθηγητές

Καθ. Μιχαήλ Κουτσιλιέρης (MD, PhD, Τομέας Πειραματικής Φυσιολογίας)

Ομ.Καθ. Γεώργιος Βαϊόπουλος (MD, PhD, Τομέας Παθολογίας)

Επιστημονικός Υπεύθυνος

Δημήτριος Μαστέλλος, Ερευνητής Β', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ: Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών &
Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.), Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος

Ημερομηνία εξέτασης

06 /10/2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος

Περίληψη

Abstract

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Κακοήθειες εγκεφάλου

- A.1.1 Νευρολογία
- A.1.2 Γλοιοβλάστωμα: Ταξινόμηση- Ιστολογικά χαρακτηριστικά- Παθοφυσιολογία
- A.1.3 Θεραπευτικές στρατηγικές

A.2 Το σύστημα του συμπληρώματος

- A.2.1 Οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος
- A.2.2 Ρυθμιστικοί μηχανισμοί συμπληρώματος
- A.2.3 Βιολογική δράση αναφυλατοξινών
- A.2.4 Δομή και λειτουργία της αναφυλατοξίνης C5a

A.3 Ο ρόλος του συμπληρώματος στον καρκίνο

- A.3.1 Ανοσολογία του καρκίνου
- A.3.2 Ο ρόλος του συστήματος του συμπληρώματος στον καρκίνο
- A.3.3 Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον καρκίνο του εγκεφάλου. Ο ρόλος των αναφυλατοξινών

Σκοπός της Εργασίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 Παραγωγή ανθρώπινης ανασυνδυασμένης αναφυλατοξίνης C5a

- B.1.1. Καλλιέργεια βακτηρίων και επαγωγή της έκφρασης ανθρώπινου γονιδίου C5a με IPTG

- B.1.2 Χρωματογραφία χημικής συγγένειας. Καθαρισμός C5a πρωτεΐνης σε στήλη αγαρόζης Ni²⁺- νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA)

B.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

B.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης

- B.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης C5a βάσει προτύπου καμπύλης βαθμίδωσης συγκέντρωσης
- B.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης C5a με φωτομετρική μέθοδο

B.4 Συγκέντρωση διαλύματος πρωτεΐνης με φίλτρο

B.5 Έλεγχος ενεργότητας C5a μέσω δοκιμασίας αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT)

B.6 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος U87MG, T98G in vitro

- B.6.1 Βασικές τεχνικές: Απόψυξη, Ανακαλλιέργεια, Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο, ψύξη κυττάρων σε υγρό N₂. Ακτινοβολήση σε πηγή κοβαλτίου
- B.6.2 Δοκιμασία επιβίωσης κλώνων
- B.6.3 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού
- B.6.4 Δοκιμασία ελέγχου της ικανότητας διήθησης
- B.6.5 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου

B.7 Ζυμογραφία για ανίχνευση δράσης μεταλλοπρωτεασών

- B.7.1 Συλλογή υπερκειμένων καλλιέργειας κυττάρων U87MG
- B.7.2 Ζυμογραφία.

B.8 Ενζυμική ανοσοπροσοφητική μέθοδος προσδιορισμού (Sandwich ELISA)

- B.8.1 Δοκιμασία ELISA για ανίχνευση ανθρώπινου C3
- B.8.2 Δοκιμασία ELISA για έμμεσο προσδιορισμό της ενεργοποίησης του συμπληρώματος
- B.8.3 Δοκιμασία ELISA για ανίχνευση ανθρώπινου C5a

B.9 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ (TCA) και ακετόνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 Παραγωγή ανθρώπινης αναφυλατοξίνης C5a

- Γ.1.1 Καθαρισμός C5a με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή της έκφρασης σε βακτηριακό σύστημα
- Γ.1.2 Καθαρισμός C5a με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (HPLC) και υπολογισμός της τελικής του συγκέντρωσης
- Γ.1.3 Έλεγχος ενεργότητας C5a

Γ.2 Έλεγχος της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος

- Γ.2.1 Οι κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος εκφράζουν τον υποδοχέα C5a-R1
- Γ.2.2 Τα καρκινικά κύτταρα U87-MG παράγουν ενδογενώς συστατικά του συμπληρώματος.

Γ.3 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

Γ.4 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

Γ.5 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στην επιβίωση των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

Γ.6 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στη διεισδυτικότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

- Γ.6.1 Έλεγχος της επίδρασης του μορίου C5a στην παραγωγή και έκκριση μεταλλοπρωτεασών στο υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων U87-MG
- Γ.6.2 Έλεγχος της επίδρασης του μορίου C5a στην ικανότητα διήθησης της εξωκυττάριας μήτρας σε κύτταρα U87MG.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

*Αυτή η εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου και στην
συνάδελφό μου, και καλή μου φίλη πλέον, Μαρία ως ένα
μικρό δείγμα ευγνωμοσύνης, για την υπομονή τους και
την πίστη τους σε εμένα.*

Πρόλογος

Η μεταπτυχιακή αυτή εργασία εκπονήθηκε στον τομέα Βιοδιαγνωστικών Επιστημών και Τεχνολογιών , στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» και πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης “Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία” της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη των τακτικών καθηγητών της Ιατρικής Σχολής και υπευθύνων του μεταπτυχιακού προγράμματος Καθ. Μιχαήλ Κουτσιλιέρη και Ομ.Καθ. Γεωργίου Βαϊόπουλου. Επιστημονικός υπεύθυνος της εργασίας ήταν ο Δρ. Δημήτριος Μαστέλλος, ερευνητής Β΄ στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α) του Ε.Κ.ΕΦ.Ε. Δημόκριτος .

Θα ήθελα σε αυτόν τον πρόλογο να εκφράσω αρχικά τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές μου Δρ.Κουτσιλιέρη και Δρ.Βαϊόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσαν να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό τους πρόγραμμα και για τις γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχαν.

Η εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας δε θα ήταν δυνατή χωρίς τη καθοδήγηση και την συνεχή υποστήριξη του επιβλέποντός μου και επιστημονικού μου υπευθύνου Δρ.Δ. Μαστέλλου , τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω ενεργά στο ερευνητικό του πρόγραμμα, μάλιστα υπό μη ευνοϊκές πάντοτε συνθήκες. Το ήθος και η ερευνητική του εμπειρία υπήρξαν καθοριστικά για την άψογη αυτή συνεργασία και την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας .

Ευχαριστώ ακόμη από καρδιάς την Δρ.Γεωργία Σφυρόερα και τη συνάδελφό μου και υποψήφια διδάκτορα Μαρία Γεωργούτσου, τα δύο άλλα μέλη του εργαστηρίου, για την αμέριστη συμπαράσταση, τη μετάδοση γνώσεων και την έμπρακτη βοήθειά τους καθ’ όλο αυτό το διάστημα, όπως και τα όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσοπεπτιδικής Χημείας του Ινστιτούτου, με υπεύθυνη την Δρ. Ε. Λιβανίου.

Για την πολύτιμη συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων με ακτινοβολήση και την παραχώρηση του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών, ευχαριστώ τον Δρ.Γ.Παντελιά, προϊστάμενο ερευνητή του εργαστηρίου Υγειοφυσικής και της ομάδας Βιοδοσιμετρίας και Ακτινοπροστασίας του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. και την συνεργάτη του Δρ. Γ.Τερζούδη , Ερευνήτρια Β΄ στο ίδιο εργαστήριο.Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να αποδώσω στην Δρ.Ουρανία Τσιτσιλώνη, επίκουρη καθηγήτρια και υπεύθυνη του εργαστηρίου Ανοσολογίας του τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α., καθώς και στα μέλη της ερευνητικής της ομάδας ,τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ.Πηνελόπη Σαμαρά και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Νίκο Παπαϊωάννου, για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους στα πειράματα κυτταρομετρίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους ανεξαιρέτως τους εργαζομένους στον τομέα Βιοδιαγνωστικών Επιστημών και Τεχνολογιών, στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την ευπροσηγορία τους και την καλή τους διάθεση να μου παρέχουν οποιαδήποτε συμβουλή και βοήθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γλοιοβλάστωμα είναι μία από τις πιο επιθετικές μορφές εγκεφαλικού καρκίνου στον άνθρωπο, με προσδόκιμο χρόνο επιβίωσης μόλις 12-16 μήνες μετά την πρώτη διάγνωση, και με πολύ υψηλά ποσοστά υποτροπών παρά την συνεχή πρόοδο των ακτινοχημειοθεραπευτικών σχημάτων, κυρίως λόγω της ισχυρής του αντίστασης στην ακτινοθεραπεία. Το γλοιοβλάστωμα αναπτύσσεται από κύτταρα αστρογλοίας ή προγονικά τους κύτταρα μέσα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα . Η ιστική βλάβη που σχετίζεται με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων προάγει φλεγμονώδεις διαδικασίες που οδηγούν σε ενεργοποίηση του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η αναφυλατοξίνη C5a έχει συσχετιστεί με προαγωγή της ανάπτυξης του όγκου, μέσω πολλών μηχανισμών , σε διάφορους τύπους καρκίνου. Σε αυτή τη μελέτη, ερευνήθηκε η επίδραση του μορίου C5a στην επιβίωση, την ακτινοανθεκτικότητα και τη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Φαινοτυπικός έλεγχος για την έκφραση του υποδοχέα C5aR1 (CD88) και ανοσοενζυμικές δοκιμασίες σε υπερκείμενα *in vitro* καλλιιεργειών έδειξαν ότι τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος παράγουν ενδογενώς μόρια του συμπληρώματος, εκκρίνουν στο καλλιιεργητικό μέσο C5a και εκφράζουν τον υποδοχέα του C5aR1. Το ενδογενώς παραγόμενο C5a προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα U87MG, επιδρώντας στον κυτταρικό κύκλο και αυξάνοντας την κατανομή τους στην ακτινοανθεκτική φάση S. Σε *in vitro* μελέτες ακτινοευαισθησίας το C5a φάνηκε να έχει ακτινοπροστατευτικό ρόλο και να ευνοεί την επιβίωση στην καρκινική σειρά γλοιοβλαστώματος U87MG . Τέλος , το C5a αυξάνει την διεισδυτικότητα των κυττάρων U87MG και την ικανότητά τους να διασπούν την εξωκυττάρια μήτρα, μέσω επαγωγής της έκκρισης της μεταλλοπρωτεάσης MMP-2. Το σύνολο των ευρημάτων αυτών υποδεικνύει ένα δρόμο προς τη ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών που θα καταστήσουν τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στα σημερινά ακτινοθεραπευτικά σχήματα.

ABSTRACT

Glioblastoma is one of the most malignant forms of glial cell-derived brain tumors, with a dismal prognosis of 12-16 months post diagnosis. Despite recent advances in therapeutic intervention, this brain tumor remains notorious for its extremely high recurrence rates, mainly due to its inherent resistance to radiotherapy and infiltrative phenotype. Glioblastoma arises from the malignant transformation of glial cells, a neural cell population within the brain parenchyma. The tissue damage associated with malignant development triggers an inflammatory response leading to complement activation in the tumor microenvironment. The anaphylatoxin C5a has been associated with tumor growth induction, through diverse mechanisms, in various types of cancer. In this study, we investigated the effect of C5a on the survival, radioresistance and invasiveness of glioblastoma cells. Phenotypic screening of C5aR1 (CD88) expression and ELISA assays, testing cell culture supernatants, demonstrated that glioblastoma cells express C5aR1 and are able to produce and secrete complement components, including C5a, into the culture medium. C5a promoted proliferation of U87MG cells and changed their cell cycle phase distribution, towards the more radioresistant S phase. Moreover, C5a promoted glioma clone survival acting as a radioprotective factor in radiosensitivity studies conducted with the glioblastoma cancer cell line U87MG. Furthermore C5aR stimulation promoted tumor cell invasiveness, through increased MMP-2 secretion and enhanced ECM degradation. Overall these results identify complement C5a modulation as a novel strategy for developing targeted anti-glioma therapeutics that could turn glioma cells more sensitive to current radiotherapeutic schemes.

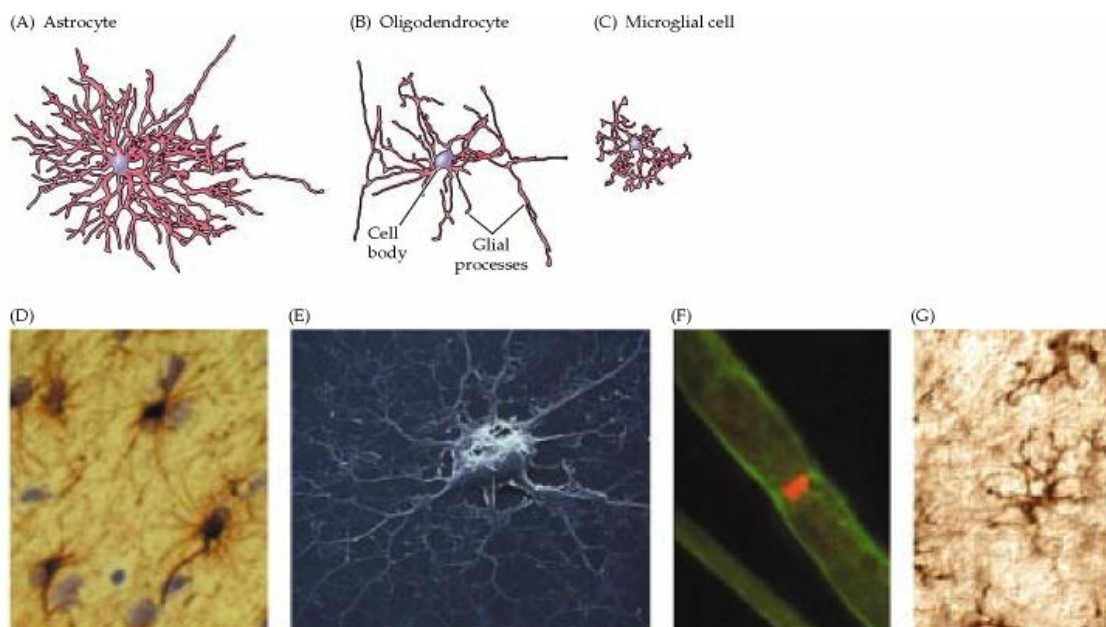
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Κακοήθειες Εγκεφάλου

A.1.1 Νευρογλοία

Τα νευρογλοιακά κύτταρα ή απλώς γλοία, τα οποία απαντώνται αποκλειστικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, είναι κύτταρα πολύ διαφορετικά από τους νευρώνες. Δε συμμετέχουν σε συναπτικές αλληλεπιδράσεις και μετάδοση νευρικών σημάτων, παρ'ότι οι υποστηρικτικές τους λειτουργίες βοηθούν στη διαμόρφωση των συναπτικών συνδέσμων και στη διατήρηση της ικανότητας μετάδοσης σημάτων από τους νευρώνες. Τα κύτταρα γλοίας είναι πολύ περισσότερα από τους νευρώνες στον εγκέφαλο, σχεδόν τριπλάσια σε αριθμό, και γενικά μικρότερα σε μέγεθος, ενώ στερούνται αξόνων και δενδριτών. Απαντώνται τρεις τύποι: τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα μικρογλοίας (Εικ.1.1).



Εικ.1.1: Νευρογλοιακά κύτταρα. Αστροκύτταρο (A, D), Ολιγοδενδροκύτταρο (B, E), Κύτταρο μικρογλοίας (C, G). Στην εικ. F, ένας περιφερικός νευρικός άξονας που περιβάλλεται από κύτταρα Schwann, εκτός από την κόκκινη περιοχή που ονομάζεται κόμβος Ranvier.

Ρόλος των κυττάρων αυτών είναι ο έλεγχος της μετάδοσης νευρικών σημάτων, μέσω της ρύθμισης των επιπέδων νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις, ενώ παρέχουν και στήριξη (υπό μορφή ικριώματος) σε ορισμένα στάδια της νευρικής ανάπτυξης ή της αποκατάστασης νευρικής βλάβης. Τα αστροκύτταρα έχουν χαρακτηριστική αστεροειδή μορφολογία και μαζί με τα ολιγοδενδροκύτταρα υποστηρίζουν τροφικά τους νευρώνες. Τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν σε επιδιόρθωση βλαβών και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, καθώς έχουν ιδιότητες μακροφάγων, ενώ είναι σε θέση να παράγουν όλα τα συστατικά του συμπληρώματος(1).

A.1.2 Γλοιοβλάστωμα: Ταξινόμηση- Ιστολογικά χαρακτηριστικά -Παθοφυσιολογία

Ο πρωτογενής καρκίνος του εγκεφάλου συνίσταται από ένα σύνολο νεοπλασμάτων που προέρχονται από ποικίλες κυτταρικές σειρές.Κάθε όγκος που προέρχεται από γλοιωματικό ή τον περιφερικό υποστηρικτικό ιστό στον εγκέφαλο ονομάζεται «γλοίωμα» (από την ελληνική λέξη «γλοία»=κόλλα) (2).

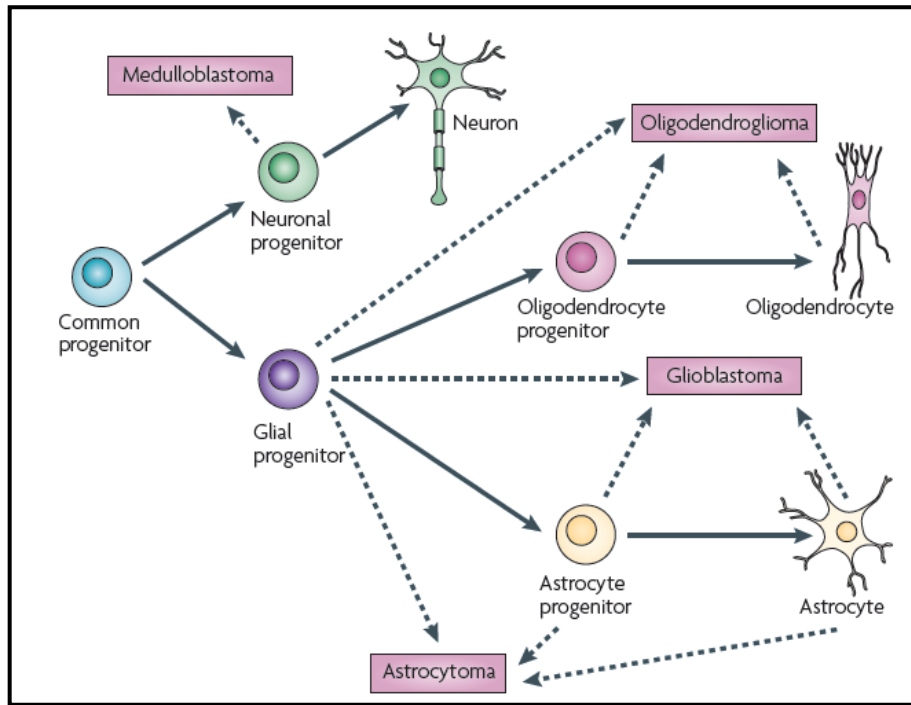
Όπως συμβαίνει και με όγκους του ΚΝΣ που εντοπίζονται σε άλλες ανατομικές θέσεις, οι εγκεφαλικοί όγκοι έχουν ιστορικά ταξινομηθεί βάσει μορφολογικών και πιο πρόσφατα ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών, με λιγότερη έμφαση στην υποκείμενη μοριακή παθογένεσή τους.Το πρώτο σύστημα ταξινόμησης προτάθηκε από τους Bailey και Cushing το 1926 και διαμόρφωσε τη βάση πάνω στην οποία στηρίζονται ακόμα οι σύγχρονες διαγνώσεις. Προτείνει ότι τα νεοπλάσματα του ΚΝΣ προκύπτουν από γλοιωματικά ή νευρωνικά προγονικά κύτταρα, παγιδευμένα σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ως εκ τούτου οδηγεί άμεσα σε έννοιες όπως «ιστογένεση» και «κύτταρο προέλευσης του όγκου».Αξιοσημείωτες βελτιώσεις από τους Kernohan and Ringertz, οδήγησαν τελικά στην ταξινόμηση WHO (World Health Organization classification), που διαμορφώθηκε αρχικά το 1979 και αναθεωρήθηκε το 2007. Εκτός από τη μορφολογική ταξινόμηση των εγκεφαλικών όγκων βάσει της ιστολογικής τους προέλευσης, το σύστημα WHO είναι γνωστό για την χρήση ενός συστήματος περιγραφής του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου, ως μέσο αναγνώρισης του αναμενόμενου βιολογικού αντικτύπου (3).Το πιο κοινό σύστημα βαθμονόμησης χρησιμοποιεί την κλίμακα από I έως IV και βαθμονομεί τα στάδια ανάπτυξης του όγκου με βάση την υπερκυττάρωση, το μιτωτικό ρυθμό, την παρουσία νέκρωσης και την αύξηση του αριθμού των αγγείων.

Ο όρος επιθετικό και υψηλού βαθμού κακοήθειας γλοίωμα περιλαμβάνει τα 3^{ου} (III) και 4^{ου} (IV) βαθμού γλοιώματα, γεγονός που αντικατοπτρίζει και την σχεδόν ενιαία διαχείριση αυτών των καρκίνων, με κάποιες σημαντικές εξαιρέσεις.Ο όρος **αναπλαστικός** σημαίνει κακοήθης.Ένα αναπλαστικό αστροκύτωμα μεσαίου βαθμού διηθεί διάχυτα το νεοπλασματικό ιστό, γεγονός ενδεικτικό εστιακής ή διεσπαρμένης ανάπλασης και αυξημένου δείκτη ανάπτυξης, σε σύγκριση με ένα αστροκύτωμα 2^{ου} ή 1^{ου} βαθμού.

Το γλοιοβλάστωμα, ή πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ("**GBM**" **Glioblastoma Multiforme**), όπως έχει επικρατήσει να ονομάζεται, είναι η πιο επιθετική μορφή καρκίνου του εγκεφάλου και η πιο κακοήθης μορφή αστροκυτώματος, συνώνυμη με ένα 4^{ου} βαθμού γλοίωμα (2). Το προσδόκιμο επιβίωσης είναι πολύ χαμηλό για ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.Σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς ο μέσος χρόνος επιβίωσης είναι 8 με 15 μήνες, ενώ σε υποτροπιάζον πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι 3 με 9 μήνες.Στο σύνολο μόνο το 5% των ασθενών φτάνει τα 5 χρόνια επιβίωσης (4).

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ξεκινά να αναπτύσσεται από κύτταρα γλοίας (αστροκύτταρα) ή προγονικά τους κύτταρα μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (εικ.1.2). Συνήθως ο όγκος εμφανίζεται στην υποφλοιική φαιά ουσία των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, εντός του κροταφικού λοβού του εγκεφάλου(5). Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να διεισδύσουν στον περιφερικό ιστό και να μεταναστεύσουν σε άλλα σημεία πέρα από την πρωταρχική εστία εμφάνισης του όγκου.Ωστόσο πολύ σπάνια εξαπλώνονται σε ανατομικές θέσεις εκτός του εγκεφάλου.Υπάρχουν δύο υποτύποι γλοιοβλαστώματος: το **πρωτογενές (de novo)**

γλοιοβλάστωμα και το **δευτερογενές**. Οι πρωτογενείς όγκοι αποτελούν το 60% των διαγνωσμένων περιστατικών (4), είναι πιο κοινοί σε ενήλικες ηλικίας 45–65, και απαντώνται συχνότερα σε άνδρες (2). Τα δευτερογενή γλοιοβλαστώματα απαντώνται συχνότερα σε ασθενείς ηλικίας 45 ετών ή νεότερους (2), και αποτελούν το 40% των διαγνώσεων (4). Ξεκινούν ως χαμηλού ή μεσαίου βαθμού αστροκυτικά νεοπλάσματα που είναι γενετικά προγραμματισμένα να εξελιχθούν τελικά σε κακοήθη, ταχέως αναπτυσσόμενα γλοιοβλαστώματα (2).



Εικ.1.2: Το γλοιοβλάστωμα αναπτύσσεται από λιγότερο ή περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα αστρογλοίας(3).

Η διάγνωση της νόσου γίνεται μετά από νευρολογική εξέταση, ακολουθούμενη από αξονική τομογραφία (CT) ή μαγνητική τομογραφία (MRI). Στην μαγνητική τομογραφία τα ευρήματα είναι πιο ξεκάθαρα, με τα επιθετικά γλοιώματα να εμφανίζονται φωτεινά σε σχέση με τον υγιή ιστό. Ωστόσο, μόνο η μικροσκοπική ιστολογική εξέταση μπορεί να πιστοποιήσει μια ακριβή διάγνωση (2). Η ιστολογική διάγνωση βασίζεται σε πυρηνική αταξία και έντονη μιτωτική δραστηριότητα(3). Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που διαχωρίζουν το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα από λιγότερο επιθετικούς τύπους αστροκυτικών νεοπλασμάτων είναι η παρουσία νεκρωτικών κυττάρων και η αύξηση της αγγείωσης γύρω από τον όγκο(5).

Πολυάριθμες μοριακές ανωμαλίες έχουν συνδεθεί με την υποκείμενη βιολογία των διάχυτων γλοιωμάτων, όπως μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, και στην περιοχή 2 του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) (3). Από όλες τις μεταλλάξεις, η υπερέκφραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου, που εμπλέκεται στην αγγειογένεση φαίνεται να είναι εξέχουσας σημασίας. Στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και ο υποδοχέας του, VEGF-R απαντώνται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό ή με

πρώιμου σταδίου όγκους. Η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας επιτρέπει τη γρήγορη ανάπτυξη του όγκου (6). Σε περιβάλλον υποξίας, που είναι χαρακτηριστικό των περισσότερων συμπαγών όγκων, ευνοείται η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο HIF-1α, που πυροδοτούν μεταγραφική δραστηριότητα σχετική με την αγγειογένεση, μέσω αύξησης της έκφρασης του VEGF, ενώ παράλληλα προάγεται ο πολλαπλασιασμός των CD133+ γλοιοματικών βλαστικών κυττάρων (7, 8).

Σε συνθήκες παθολογικού stress που περιλαμβάνουν ακτινοβολία, υποξία και έκφραση ογκογονιδίων τα σημεία ελέγχου που καθορίζουν την αναπτυξιακή πορεία των κυττάρων απορρυθμίζονται, επιτρέποντας στα κύτταρα να επαναπρογραμματίζονται και να αποδιαφοροποιούνται προς απόκτηση ιδιοτήτων πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων (βλαστοκυττάρων). Αυτή η διαδικασία υπογραμμίζει την φαινοτυπική και λειτουργική ετερογένεια ανάμεσα στα κύτταρα αυτά, που εκδηλώνεται σαν μια συνεχής έκφραση γονιδίων βλαστοκυττάρων (9). Οποιαδήποτε συζήτηση της μοριακής και κυτταρικής ετερογένειας στο πλαίσιο των επιμέρους όγκων πρέπει να συμπεριλάβει την υπόθεση των «καρκινικών βλαστικών κυττάρων» (Cancer Stem Cells-CSCs), η οποία προτείνει ότι οι νεοπλασματικές διεργασίες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από ένα μικρό πληθυσμό βλαστικών καρκινικών κυττάρων που έχουν τις ξεχωριστές ιδιότητες της αυτοανανέωσης, πολυδυναμικότητας και αντίστασης στη συμβατική θεραπεία. Τόσο σε γλοιοβλαστώματα όσο και σε μυελοβλαστώματα στον άνθρωπο, η έκφραση του CD133 δείκτη νευρικού βλαστικού κυττάρου (επίσης γνωστή ως προμινίνη-1) έχει συνδεθεί τόσο με την ογκογενετική ικανότητα όσο και με την ακτινοαντοχή (3). Αυτά τα CD133+ CSCs φαίνεται να συμβάλλουν στην αντίσταση του γλοιοβλαστώματος στην ακτινοθεραπεία μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών που παράγονται στο κύτταρο κατά την ακτινοβολία (10).

Διάφορες πρωτεΐνες και καταρράκτες σηματοδότησης εμπλέκονται στην ογκογένεση. Αρκετά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων στον εγκέφαλο ευνοούν την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα σχετικά με το κακόηθες γλοίωμα μονοπάτια περιλαμβάνουν τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα EGF (epidermal growth factor), τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου VEGF (vascular endothelial growth factor), τον IGF (insulin-like growth factor) και τον ηπατικό HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor). Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης είναι πολύ σημαντικά στην ανάπτυξη των κυττάρων: προφυλάσσουν τα καρκινικά κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο, σχετίζονται με την διείσδυση αυτών σε περιοχές υγιούς ιστού και πυροδοτούν την εκ νέου αγγείωση και παροχή αίματος στον όγκο (2). Τα μονοπάτια Notch και AKT έχουν συνδεθεί με την βιολογία των φυσιολογικών νευρικών βλαστικών κυττάρων, καθώς και με τα CSCs σε κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου (3).

A.1.3 Θεραπευτικές στρατηγικές

Το πρώτο βήμα στη θεραπεία των γλοιοβλαστωμάτων είναι η χειρουργική επέμβαση. Επειδή τα αστεροειδούς μορφολογίας κύτταρα του αστροκυτώματος αναπτύσσονται με διάχυση στον περιφερικό ιστό αυτοί οι όγκοι δε μπορούν να αφαιρεθούν εντελώς. Ωστόσο η επέμβαση είναι βοηθητική, καθώς ακόμα και μερική εκτομή του όγκου βοηθά σε ελάφρυνση των συμπτωμάτων και χρήση της βιοψίας για ακριβή διάγνωση του τύπου του καρκίνου (2). Ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και/ή στοχευμένη βιοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του εναπομείναντος όγκου.

Ακτινοθεραπεία

Στους ενηλίκους μετά από τη λήψη βιοψίας και τη χειρουργική επέμβαση συνήθως ακολουθεί ακτινοθεραπεία.Υπάρχουν διάφοροι τύποι ακτινοβολίας που μπορεί να δοθούν χρησιμοποιώντας ποικίλα θεραπευτικά σχήματα και δόσεις.Ο βασικός τύπος συμβατικής ακτινοθεραπείας χρησιμοποιεί ακτινοβολία εξωτερικής δέσμης, όμοια με αυτή που χρησιμοποιείται στην ακτινογραφία με ακτίνες Χ, στοχευμένη στη θέση του όγκου και στην γύρω περιοχή, 5 μέρες /εβδομάδα για 5-6 συνεχόμενες εβδομάδες.

Μια μορφή τοπικής ακτινοθεραπείας μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιπλέον για να ενισχύσει τη συμβατική ακτινοβολία.Οι περισσότερες θεραπείες επιτίθενται στον όγκο, προστατεύοντας παράλληλα τα υγιή κύτταρα γύρω από αυτόν.Αυτές περιλαμβάνουν:

- Δισδιάστατης ή τρισδιάστατης προσαρμογής θεραπεία φωτονίων, γνωστή και ως ρυθμιζόμενη ένταση ραδιοθεραπεία (IMRT), στην οποία η δέσμη φωτονίων διαμορφώνεται σε αναλογία με το μέγεθος και το σχήμα του όγκου.
- Image-guided radiation therapy (IGRT) που χρησιμοποιεί τεχνολογία απεικόνισης της ακριβούς θέσης του όγκου τη στιγμή της εφαρμογής.
- Θεραπεία δέσμης πρωτονίων που προσφέρει ιδανική στόχευση της δόσης έναντι ενός ειδικού καρκινικού στόχου.Διάμεση ακτινοβολία υπό μορφή υγρής ή στερεής ακτινοβολίας μπορεί να εμφυτευτεί στον όγκο κατά τη χειρουργική επέμβαση.
- Στερεοτακτική ραδιοχειρουργική (SRS) και κλασματοποιημένη στερεοτακτική ραδιοχειρουργική θεραπεία (FSRS). Πρόκειται για ειδικές μορφές θεραπείας υψηλής στόχευσης με εφαρμογή υψηλής δόσης ακτινοβολίας σε όγκους μικρής έκτασης και μεγέθους, σαν μονής δόσης θεραπεία ή πολλαπλών δόσεων αντίστοιχα , για 4-5 μέρες.
- Φωτοδυναμική θεραπεία που χρησιμοποιεί ένα μέσο ευαισθητοποίησης των καρκινικών κυττάρων σε συνδυασμό με δέσμη φωτός laser για να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα.
- Θεραπεία σύλληψης νετρονίων βορίου, που απελευθερώνει ραδιοενεργές ουσίες μέσα στον όγκο .

Φάρμακα που κάνουν τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ακτινοθεραπεία, σχήματα χημειοθεραπείας που εφαρμόζονται παράλληλα με την ακτινοθεραπεία, καθώς και φάρμακα που αυξάνουν τα επίπεδα οξυγόνου στον εγκέφαλο είναι υπό μελέτη, με σκοπό να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας (2).

Χημειοθεραπεία

Η τεμοζολομίδη είναι ένας αλκυλιωτικός παράγων που στοχεύει στην O⁶, N⁷ θέση της γουανίνης.Αυτό έχει ως αποτέλεσμα βλάβη στο DNA και παρεμπόδιση της αντιγραφής του DNA, οδηγώντας έτσι σε καταστροφή τα καρκινικά κύτταρα.Κανένας άλλος αντινεοπλασματικός παράγων δεν έδειξε καμία σημαντική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών με GBM.(11) Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες χημειοθεραπείες αποτελούν μια τελική προσπάθεια προς παράταση της επιβίωσης σε αυτούς τους ασθενείς μετά από αποτυχία της θεραπείας πρώτης γραμμής.

Στοχευμένη βιοθεραπεία

Με αυτού του είδους τις θεραπείες γίνεται προσπάθεια αλλαγής της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων. Φάρμακα που παρεμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο σε ενδοκυττάριας οδούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου είναι υπό κλινικές δοκιμές(2). Το Bevacizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με τον VEGF εξουδετερώνοντάς τον, με αποτέλεσμα να αποτρέπει τη σύνδεσή του στον υποδοχέα. Έτσι αναστέλλεται η δημιουργία νέων αγγείων και κατά συνέπεια η ανάπτυξη του όγκου(12) .

Ανοσοθεραπεία με εμβόλια

Είναι ένα νέο πεδίο έρευνας στο οποίο επιστρατεύεται το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς για τον περιορισμό της ανάπτυξης του όγκου. Αυτές οι θεραπείες περιλαμβάνουν εμβόλια με αντιγόνα προερχόμενα από τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία λειτουργούν σαν σήματα παρουσίας μη φυσιολογικών κυττάρων. Το εμβόλιο επιτίθενται στα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας γενετικά τροποποιημένα δενδριτικά κύτταρα (εν δυνάμει ανοσοδιεγερτικά κύτταρα) που διεγείρουν την ανοσιακή απόκριση. Πρόκειται για μια από τις πιο ελπιδοφόρες εξατομικευμένες θεραπείες(2).

Εξαιτίας των πολύ χαμηλών ποσοστών επιβίωσης σε υποτροπιάζουσα νόσο, η περαιτέρω θεραπεία περιορίζεται σε επιπρόσθετη χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση του όγκου και επιπλέον χημειοθεραπευτικά και ακτινοθεραπευτικά σχήματα.

A.2 Το σύστημα του συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος έχει κλασικά αναγνωριστεί σαν ένα κεντρικό τμήμα της φυσικής (έμφυτης) ανοσοαπόκρισης, δηλαδή της πρώτης γραμμής άμυνας έναντι των μικροβίων και μη φυσιολογικών εαυτών μορίων. Οι φυσιολογικές λειτουργίες του συμπληρώματος περιλαμβάνουν την άμυνα έναντι πυογενών βακτηριακών λοιμώξεων και την κάθαρση των ανοσοσυμπλεγμάτων και την προαγωγή φλεγμονωδών αντιδράσεων (13). Πιο πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι το συμπλήρωμα ενορχηστρώνει πολύ περισσότερες ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διεργασίες που παίζουν ουσιώδη ρόλο στην ομοιόσταση και την ανοσοεπιτήρηση του οργανισμού (14).

Το συμπλήρωμα συμμετέχει σε διαδικασίες ρύθμισης της προσαρμοστικής ανοσίας και ενίσχυσης της χυμικής ανοσίας, στην απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων, στην ρύθμιση του συστήματος πήξης, στην ωρίμανση των νευρικών συνάψεων, στην αγγειογένεση, στην κινητοποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, στην ιστική αναγέννηση και στο μεταβολισμό των λιπιδίων (14, 15). Διαμεσολαβητές όλων αυτών των δράσεων είναι περισσότερες από 50 διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτές μπορεί να είναι ζυμογόνα (που μπορεί να μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα μετά από ενεργοποίηση του συμπληρώματος), υποδοχείς, τελεστές ή ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διατηρούν σε ισορροπία τους μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησης του συστήματος.

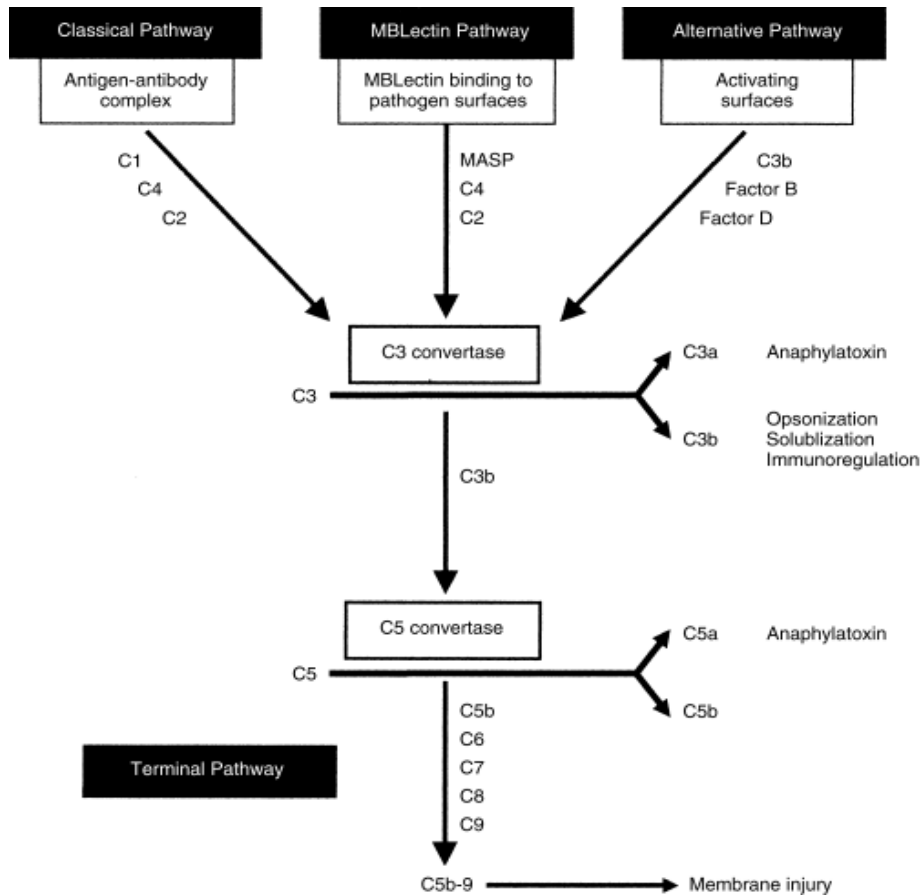
A.2.1 Οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος

Υπάρχουν τρεις καλά μελετημένες οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος: η κλασική οδός, η οδός των λεκτινών και η εναλλακτική οδός (εικ.2). Οι τρεις οδοί έχουν ένα κοινό σημείο που είναι η ενεργοποίηση του κεντρικού συστατικού C3 αλλά διαφέρουν ως προς το μηχανισμό αναγνώρισης του στόχου που οδηγεί στη δημιουργία του C3.

Η κλασική οδός (Classical Pathway)

Το πρώτο συστατικό της κλασικής οδού είναι ένα σύμπλεγμα που διαμορφώνεται από το εξαμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο C1q με το C1r and C1s, δύο πρόδρομες μορφές πρωτεασών σερίνης(16). Η ενεργοποίηση αυτής της οδού ξεκινά με την αναγνώριση από το C1q των σταθερών περιοχών Fc των μ αλυσίδων της IgM ανοσοσφαιρίνης και κάποιων γ αλυσίδων της IgG, που είναι συνδεδεμένες με αντιγόνα -στόχους. Το κλασικό μονοπάτι μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί απουσία αντισωμάτων, καθώς το C1q αναγνωρίζει και ενδογενή αντιγόνα όπως νεκρωτικά κύτταρα, εξωκυττάρια μεμβρανικές πρωτεΐνες, εναποθέσεις αμυλοειδών, πενταξίνες (Ca²⁺ εξαρτώμενες πρωτεΐνες), prions, και DNA (17, 18) (19-22). Η σύνδεση του C1q ενεργοποιεί τα συστατικά του στοιχεία C1s και C1r. Το C1s είναι μια πρωτεάση σερίνης που κόβει το C4 σε δύο θραύσματα: το C4b, που συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη με ένα θειοεστερικό δεσμό και το C4a, ένα διαλυτό μικρό θραύσμα με άγνωστη λειτουργία, το οποίο

απομακρύνεται. Στη συνέχεια το συστατικό C2 του συμπληρώματος συνδέει το C4b και συνιστά σύμπλεγμα –στόχο της πρωτεάσης C1s. Η πέψη του C2 γεννά δύο θραύσματα: τα C2a και C2b. Το C2b παραμένει συνδεδεμένο με το C4b, διαμορφώνοντας την **C3 κονβερτάση της κλασσικής οδού (C4bC2b)**. Στο σύμπλεγμα αυτό το C2b δρα σαν πρωτεάση σερίνης που κόβει το C3 σε C3b και C3a. Το C3b συνδέεται ομοιοπολικά με θειοεστερικό δεσμό στη μεμβράνη και συμμετέχει με σύνδεση στη C3 κονβερτάση στο σχηματισμό της C5 κονβερτάσης της κλασσικής οδού, C4bC2bC3b (23) .



Εικ.1.3 : Τα μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος (24)

Η οδός λεκτίνης (Lectin Pathway)

Το μονοπάτι της λεκτίνης είναι ανάλογο του κλασσικού μονοπατιού. Ενεργοποιείται από πρωτεΐνες ομόλογες του C1q: τη λεκτίνη που δεσμεύεται στη μαννόζη (mannose-binding lectin- MBL) και τις H-, L- και M- φικολίνες (25). Αυτές οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν επαναλαμβανόμενα υδατανθρακικά μοτίβα σε παθογόνα, όπως είναι η μαννόζη και η N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Μετά τη σύνδεσή τους στο παθογόνο, αυτές οι πρωτεΐνες διαμορφώνουν ένα σύμπλοκο με όμοιες δομικές ιδιότητες με του C1q και με ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης (MBL-associated serine protease-2 -MASP-2). Οι MASPs πραγματοποιούν πέψη των συστατικών C4 και C2 προς διαμόρφωση της C3 κονβερτάσης C4bC2b, που είναι όμοια με αυτή του κλασσικού μονοπατιού(26).

Η εναλλακτική οδός (Alternative Pathway)

Η εναλλακτική οδός διαφέρει μηχανιστικά από την κλασική οδό και την οδό λεκτινών. Παρέχει μια πρώτη γραμμή έμφυτης ανοσίας, που ξεκινά από την περιορισμένης έκτασης αυτόματη υδρόλυση του C3 (27). Η αυτόματη υδρόλυση του ασταθούς θειοεστερικού δεσμού του C3, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του C3(H₂O), το οποίο συνδέεται με τον factor B, ο οποίος με πέψη από τον factor D διαμορφώνει την C3 κονβερτάση -C3(H₂O)Bb της εναλλακτικής οδού (28). Αυτό το σύμπλοκο ξεκινά να μετατρέπει το C3 σε θραύσματα C3b και C3a. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό το C3b γρήγορα απενεργοποιείται, όμως ένα μέρος μπορεί να συνδεθεί με μόρια που ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και να συνδεθεί με τον παράγοντα B, ο οποίος πάλι όντας συνδεδεμένος με το C3b μπορεί να υποστεί πέψη από τον factor D, διαμορφώνοντας την επικρατούσα C3 κονβερτάση του εναλλακτικής οδού (C3bBb). Η σταθερότητα αυτής της κονβερτάσης αυξάνεται με τη σύνδεση σε αυτή της προπερδίνης, μιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης του ορού (29). Το θραύσμα Bb της C3 κονβερτάσης διασπά το C3 και ξεκινά έτσι ένας ενισχυτικός κύκλος (amplification loop), όπου παράγεται περισσότερο C3b, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην εκ νέου παραγωγή εναλλακτικής C3 κονβερτάσης και C5 κονβερτάσης (C3bBbC3b).

Σχηματισμός συμπλόκου λύσης της μεμβράνης

Η πέψη του C5 από τις C5 κονβερτάσες (C4bC2bC3b or C3bBbC3b) εκκινεί τη δεύτερη φάση ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Το C5 δίνει τα θραύσματα C5a, μια πολύ ισχυρή αναφυλατοξίνη και το C5b, με το οποίο ξεκινά η μη ενζυματική διαμόρφωση του συμπλόκου λύσης της μεμβράνης (membrane attack complex [MAC]) από τα συστατικά του τελικής οδού λύσης C5b-9. Το σύμπλοκο οδηγεί σε λύση του κυττάρου-στόχου, διαδικασία γνωστή ως εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (complement-dependent cytotoxicity (CDC)). Το σύμπλεγμα MAC επάγει και άλλες αποκρίσεις στο κύτταρο, όπως την απελευθέρωση φλεγμονωδών μορίων και την αύξηση της αντίστασης σε περεταίρω λύση, ενώ μπορεί να οδηγεί τα κύτταρα σε πολλαπλασιασμό και να τα καθιστά ανθεκτικά στην απόπτωση (30).

Εναλλακτικές οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος

Εκτός από τα τρία κύρια μονοπάτια ενεργοποίησης υπάρχουν αρκετές διαδρομές παράκαμψης που φαίνεται να έχουν προκαλέσει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε διάφορα στάδια. Η οδός λεκτινής μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα από την πρόσδεση της MBL σε φυσικά αντισώματα IgM συνδεδεμένα σε ισχαιμικά αντιγόνα ενδοθηλίου μετά από βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (31), (32). Απουσία C2/C4, αλλά παρουσία των συστατικών του εναλλακτικού μονοπατιού, κάποια συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος ή μερικοί ολιγοσακχαρίτες μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του C3 (33). Το C3 μπορεί να ενεργοποιηθεί και με υδρόλυση από εξωγενείς πρωτεάσες, όπως η θρομβίνη και η πλασμίνη, υποδηλώνοντας μια ισχυρή διασύνδεση των μονοπατιών αιμόστασης (πήξης και ινωδόλυσης) και ενεργοποίησης του συμπληρώματος (34). Το C5 μπορεί επίσης να υποστεί πέψη από θρομβίνη απουσία C3 (35). Τέλος, αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι η ακτινοθεραπεία με ιονίζουσα ακτινοβολία στον καρκίνο, επάγει άμεση τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της κλασικής αλλά και της εναλλακτικής οδού και την απελευθέρωση αναφυλατοξινών C5a και C3a, σε καρκινικούς όγκους ανθρώπων και ποντικών, γεγονός πολύ σημαντικό όσον αφορά την

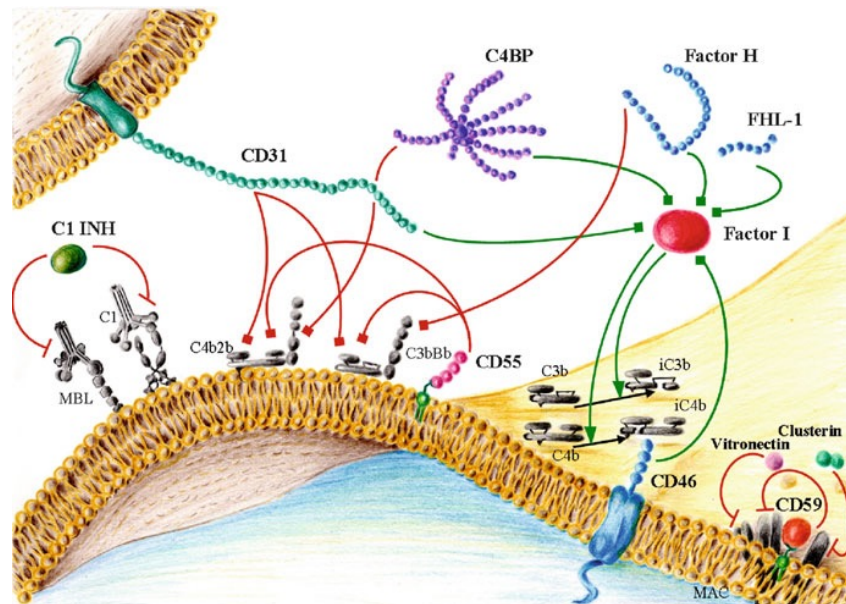
ανάπτυξη του όγκου, όπως περιγράφεται στη συνέχεια(36) .

A.2.2 Ρυθμιστικοί μηχανισμοί συμπληρώματος

Η ρύθμιση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος είναι εξαιρετικά σημαντική για την ομοιόσταση του οργανισμού.Ρυθμιστικές πρωτεΐνες δρουν σε τρία κύρια επίπεδα: αναστέλλουν τη δράση των πρωτεασών που εμπλέκονται στις οδούς ενεργοποίησης, διευκολύνουν την αποδόμηση των κονβερτασών και ελέγχουν τη δημιουργία του συμπλόκου MAC (εικ.1.4).

Πολλές πρωτεΐνες ρυθμιστές μοιράζονται επαναλαμβανόμενα μοτίβα που ονομάζονται short consensus repeats (SCRs). Οι SCRs είναι σφαιρικές δομές περίπου 60 αμινοξέων και έχουν μια διατηρημένη αλληλουχία αμινοξικών υπολειμμάτων που περιλαμβάνει τέσσερις αμετάβλητες κυστεΐνες, μια σχεδόν αμετάβλητη τρυπτοφάνη, και υψηλά συντηρημένες προλίνες, γλυκίνες, και υδροφοβικά κατάλοιπα (37). Αυτές οι δομές φαίνεται να παίζουν ρόλο στη σύνδεση με τα C3 και C4 , καθώς και με τα προϊόντα θραύσης τους.

Οι πρωτεΐνες-ρυθμιστές του συμπληρώματος έχουν παραδοσιακά ομαδοποιηθεί σε δύο κατηγορίες: διαλυτές και μεμβρανικές. Τουλάχιστον έξι διαλυτές ρυθμιστικές πρωτεΐνες απαντώνται στο πλάσμα: ο αναστολέας του C1, ο παράγων I, η C4b-συνδεόμενη πρωτεΐνη (C4BP), ο παράγων H, η βιτρονεκτίνη (S protein), και η κλαστερίνη (SP40,40).



Εικ.1.4: Κύριοι αναστολείς του συμπληρώματος: διαλυτές και μεμβρανικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι κόκκινες γραμμές υποδεικνύουν ανασταλτική δράση (όταν καταλήγουν σε γραμμή) ή επιτάχυνση της αποδόμησης (όταν έχουν τετράγωνη απόληξη).Οι πράσινες γραμμές υποδεικνύουν δράση συμπαραγόνα (όταν έχουν τετράγωνη απόληξη) ή πρωτεολυτική δράση (όταν καταλήγουν σε κορυφή βέλους)(38)

Ο C1 αναστολέας είναι μέλος των αναστολέων πρωτεασών σερίνης και αδρανοποιεί τα μόρια C1r, C1s, και MASP-2 (39). Ο παράγοντας I απενεργοποιεί με ενζυμική πέψη τα C4b και C3b (40). Η C4BP είναι μια ετερογενής ολιγομερική πρωτεΐνη που ελέγχει το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης. Μετά την πρόσδεσή της στο C4b, η C4BP αναστέλλει το συμπλήρωμα με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Αποτρέπει το σχηματισμό της C3 κονβερτάσης, επιταχύνει την αποδόμηση C3 και C5 κονβερτασών της κλασσικής οδού, και λειτουργεί επίσης σαν συμπαράγων στην διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα I πρωτεολυτική πέψη του C4b (41). Ο παράγοντας H μαζί με το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος factor H-like protein 1 (FHL-1), είναι περισσότερο γνωστός ως ο κατεξοχήν διαλυτός αναστολέας της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Διαμέσου της σύνδεσής του με το C3b, ο παράγοντας H ανταγωνίζεται τον παράγοντα B που συμμετέχει στο σχηματισμό των κονβερτασών C3 και C5, απομακρύνει το κλάσμα Bb από τις κονβερτάσες, ενώ δρα και αυτός σαν συμπαράγοντας για τον παράγοντα I στην πέψη του C3b (42). Η βιτρονεκτίνη και η κλαστερίνη αναστέλλουν την εισαγωγή του συμπλόκου MAC στη μεμβράνη (43, 44). Η κλαστερίνη μπορεί επίσης να ρυθμίζει την κυτταρική διαφοροποίηση και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α και η IL-6 (45).

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ελέγχεται επίσης από ρυθμιστικές πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη (membrane-bound complement regulatory proteins (mCRPs), όπως ο υποδοχέας συμπληρώματος (CR) τύπου 1 (CR1; CD35), η μεμβρανική πρωτεΐνη-συμπαράγων (CD46), ο παράγων επιτάχυνσης της αποσύνθεσης (CD55), και η προτεκτίνη (CD59). Ο CR1 εκφράζεται από ερυθροκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα, κοκκίωδη δενδριτικά κύτταρα, σπειραματικά ποδοκύτταρα, Β-κύτταρα, και μερικά Τ-λεμφοκύτταρα (46). Λειτουργεί ως συμπαράγοντας για την διαμεσολαβούμενη από τον παράγοντα I διάσπαση του C3b και C4b και επιταχύνει την αποδόμηση των κονβερτασών της κλασσικής και εναλλακτικής οδού. (47) Η πρωτεΐνη CD46 εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα και δρα σαν συμπαράγοντας του παράγοντα I κατά τη διάσπαση των C3b/C4b (48). Επίσης εμπλέκεται στη ρύθμιση των Τ λεμφοκυττάρων (49, 50). Η CD55 είναι αγκυροβολημένη στη μεμβράνη μέσω ενός μορίου γλυκοφωσφατιδυλοϊννοσιτόλης (GPI) και απαντάται σε όλα τα στοιχεία του αίματος και στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους (51). Επιταχύνει την αποικοδόμηση των κλασσικών και εναλλακτικών C3 και C5 κονβερτασών (52). Η CD55 συνδέεται με το CD97, που εκφράζεται σε μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, και ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα και ρυθμίζει ταυτοχρόνως έμφυτες και προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις (53). Η CD59, επίσης GPI-αγκυροβολημένη πρωτεΐνη, εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της κυκλοφορίας, στο αγγειακό ενδοθήλιο, στο επιθήλιο, και στα περισσότερα άλλα όργανα (54). Συνδέεται με το C8 κατά τη δημιουργία του MAC και αναστέλλει την διείσδυση του C9 στη λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης (55).

A.2.3 Βιολογική δράση αναφυλατοξινών

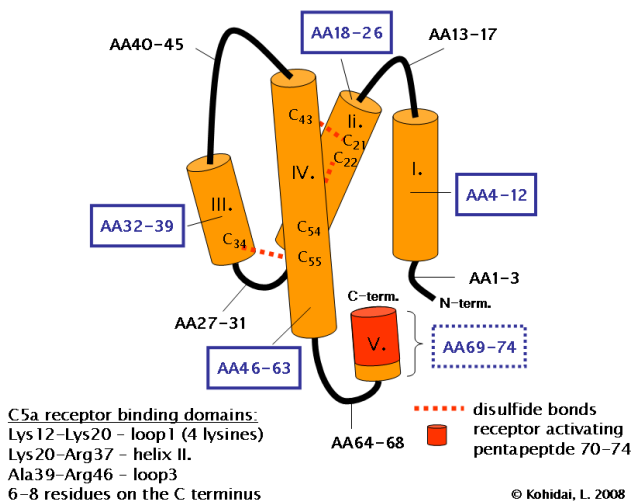
Κατά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος διαλυτά δραστικά θραύσματα απελευθερώνονται από την πέψη του C3 και του C5. Αυτά τα βιοενεργά πεπτίδια, C3a και C5a, κλήθηκαν αναφυλατοξίνες διότι βρέθηκαν να είναι ισχυρά πολyleιτουργικά φλεγμονώδη μόρια, που ενεργούν ως χημειοταξίνες και ενεργοποιητές λευκοκυττάρων (56).

Οι υποδοχείς αναφυλατοξινών ανήκουν στην υπεροικογένεια των συζευμένων με G-πρωτεΐνη υποδοχέων (GPCRs: G-protein coupled receptors). Έχουν 7 διαμεμβρανικά ελικοειδή τμήματα με υδροφοβικά αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν τρεις ενδοκυτταρικές και τρεις εξωκυτταρικές θηλιές, με ένα εξωμεμβρανικό N-άκρο και ενδομεμβρανικό C-άκρο.

Μοιράζονται υψηλή ομολογία αλληλουχίας, αλλά διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση του συνδέτη, την ικανότητα μεταγωγής σήματος, και τη λειτουργία. Οι υποδοχείς αναφυλατοξινών είναι ο C3aR για το C3a και οι C5aR1(ή C5aR-CD88) και C5aR2 (C5L2) για το C5a.

Οι υποδοχείς C3aR και C5aR εκφράζονται σε κύτταρα τόσο της μυελοειδούς όσο και της μη μυελοειδούς σειράς. Οι δραστηριότητες των αναφυλατοξινών σχετίζονται με τους τύπους των κυττάρων που εκφράζουν τους υποδοχείς τους. Μπορούν να αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα, να προκαλούν σύσπαση των λείων μυών, να επάγουν την προσέλκυση λευκοκυττάρων, να αυξάνουν τη χημειοταξία, τη μετανάστευση, τη φαγοκυττάρωση στα λευκά αιμοσφαίρια και να επάγουν την παραγωγή και την απελευθέρωση άλλων προφλεγμονωδών μεσολαβητών (π.χ. ισταμίνη) (57). Οι αναφυλατοξίνες εμπλέκονται ακόμα στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (58), την αναγέννηση των ιστών και την ίνωση (59).

A.2.4 Δομή και λειτουργία της αναφυλατοξίνης C5a.



Εικ.1.5: Δομή του C5a. Οι στικτές κόκκινες γραμμές αναπαριστούν τους δισουλφιδικούς δεσμούς που διαμορφώνουν την τριτοταγή δομή του μορίου.

Το μόριο του συμπληρώματος C5a είναι μια ισχυρή φλεγμονώδης αναφυλατοξίνη, που προέρχεται από ενζυμική πέψη του αμινοτελικού άκρου της α-αλυσίδας του μορίου C5 από τη C5 κονβερτάση, μετά από ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος(60) .

Το ανθρώπινο C5a περιέχει 74 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 11kDa. Το μόριο απαρτίζεται από τέσσερις έλικες που συνδέονται μεταξύ τους, διαμορφώνοντας θηλιές με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς (S-S), οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ της έλικας IV και II, III. Υπάρχει μια κοντή, μήκους 1,5 στροφής έλικα στο αμινοτελικό N-άκρο του πεπτιδίου, αλλά όλη η δραστικότητα εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό C-άκρο. Το C5a γρήγορα υφίσταται ενζυμική πέψη από την καρβοξυπεπτιδάση-B του ορού προς σχηματισμό της πολύ λιγότερο δραστικής μορφής C5a des-Arg (72αα) (61).

Για τη δέσμευση του C5a ο πρώτος αναγνωρισμένος υποδοχέας ήταν ο C5aR-1(62), γνωστός επίσης σαν CD88. Όπως προαναφέρθηκε στο κεφ.Α.2.3, ο υποδοχέας του C5a είναι ένας κλασσικός GPCR. Η δέσμευση του C5a στον υποδοχέα περιλαμβάνει αλληλεπίδραση μεταξύ των βασικών αμινοξικών καταλοίπων στον ελικοειδή πυρήνα του C5a και των όξινων καταλοίπων στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, η οποία επιτρέπει στο C-άκρο του C5a να συνδεθεί με τα αμινοξικά κατάλοιπα των διαμεμβρανικών τμημάτων του υποδοχέα. Ο ορφανός υποδοχέας GPR77 ταυτοποιήθηκε αργότερα σαν δεύτερος υποδοχέας του C5a και ονομάστηκε C5a-like receptor 2 (C5L2) (63). Ο C5L2 είναι διαφορετικού τύπου, μη συζευγμένος με G-πρωτεΐνη υποδοχέας, με αδιευκρίνιστη ως τώρα λειτουργία. Εξαιτίας της έλλειψης επαρκούς γνώσης σε σχέση με τη δομή και τη λειτουργία του υποδοχέα αυτού, δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι ο C5L2 συναγωνίζεται τον C5aR-1, ως προς την πρόσδεση του C5a, ώστε αυτός να ασκεί έλεγχο στις βιολογικές επιδράσεις που έχει η ενεργοποίηση του δεύτερου. Σε ουδετερόφιλα, μακροφάγα και ινοβλάστες ο C5L2 ασκεί αρνητική ρύθμιση στη σηματοδότηση διαμέσου των μονοπατιών φωσφορυλίωσης κινασών ERK 1/2, c-Jun amino-terminal kinase (JNK), MAPK, p38, β-arrestin που προάγουν την κυτταρική επιβίωση (64). Εντούτοις αυτός ο ρόλος για τον C5L2 έχει αμφισβητηθεί, καθώς υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν λειτουργία θετικής ρύθμισης, για αποκρίσεις που επάγονται από τις αναφυλατοξίνες C5a και C3a (64).

Το C5a δρα ως αναφυλατοξίνη προκαλώντας αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, σύσπαση των λείων μυικών ινών και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Το C5a des-Arg είναι πολύ λιγότερο ισχυρή αναφυλατοξίνη. Και τα δύο μόρια μπορούν να προκαλέσουν αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων προκαλώντας παραγωγή ισταμίνης και TNF-α. Το C5a είναι αποτελεσματικό χημειοτακτικό επιστρατεύοντας το συμπλήρωμα και τα φαγοκύτταρα σε περιοχές μόλυνσης ή την έλευση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στους λεμφαδένες. Το C5a παίζει επίσης ρόλο κλειδί στη μετανάστευση και την προσκόλληση των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων. Τέλος, μπορεί να ρυθμίζει την ισορροπία υποδοχέων ενεργοποίησης/αναστολής για τα τμήματα Fc των ανοσοσφαιρινών IgG, ευνοώντας αυτοάνοσες αποκρίσεις (60).

Το C5a φαίνεται να είναι ένας βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη της παθολογίας πολλών φλεγμονωδών ασθενειών που περιλαμβάνουν το σύστημα του συμπληρώματος, όπως είναι η σήψη, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η ψωρίαση (65). Όπως περιγράφεται παρακάτω, τα τελευταία χρόνια η δράση του C5a έχει επίσης συνδεθεί και με την ανάπτυξη καρκινικών όγκων. (38)

Αναστολείς του C5a που μπορούν να μπλοκάρουν τα αποτελέσματα της δράσης του θα ήταν χρήσιμοι σε ιατρικές εφαρμογές. Ένας εκλεκτικός αναστολέας της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα C5aR1 είναι ο μικρού μοριακού βάρους ολιγοπεπτιδικός ανταγωνιστής PMX53 που φέρει την αμινοξική αλληλουχία Ac-Phe-[Orn-Pro-dCha-Trp-Arg]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για αναστολή της δράσης του C5a, σε πολλά μοντέλα φλεγμονωδών νόσων (66, 67).

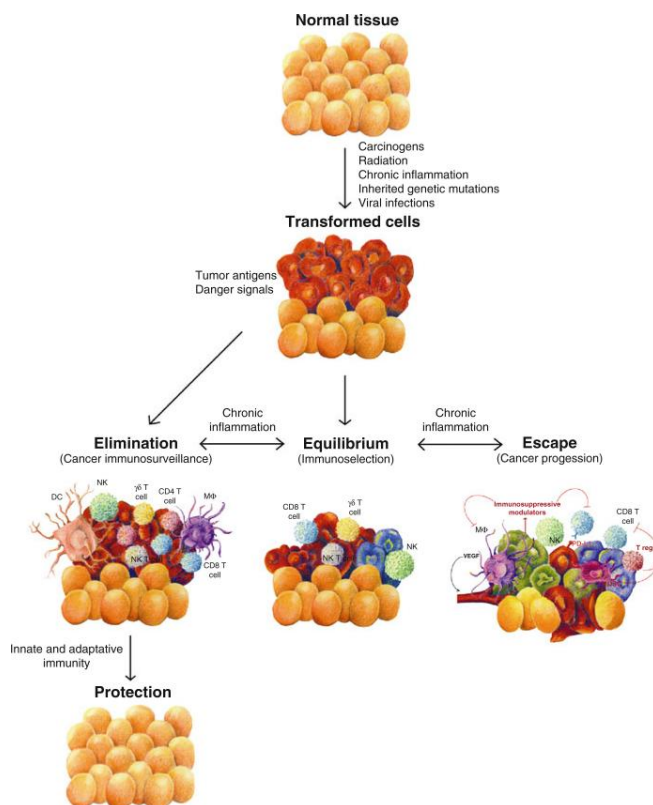
A.3 Ο ρόλος του συμπληρώματος στον καρκίνο

A.3.1 Ανοσολογία του καρκίνου

Όλο και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει κακοήθη κύτταρα και να ρυθμίζει την ανάπτυξη του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αρκετές γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες που υπαγορεύουν κακοήθη ανάπτυξη και παράγουν μεταβολές στην κυτταρική μορφολογία, δημιουργώντας σχετιζόμενα με τον όγκο αντιγόνα που διαχωρίζουν τα κακοήθη κύτταρα από τα φυσιολογικά αντίστοιχά τους. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από αμυντικούς μηχανισμούς διαμεσολαβούμενους από T- και B- λεμφοκύτταρα, προστατεύοντας τον οργανισμό από την ανάπτυξη καρκίνων(68) . Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν ακόμη να αναγνωριστούν από NK κύτταρα, ως αποτέλεσμα της μειωμένης έκφρασης εαυτών τάξης I μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC class I) (69), της έκφρασης επαγόμενων από stress πρωτεϊνών (70) και της παρουσίας μεταβολών στην κυτταρική μεμβράνη που σχετίζονται με μίτωση (71) . Σήμερα η ανοσοεπιτήρηση του καρκίνου υποστηρίζεται τόσο από τα επιδημιολογικά δεδομένα όσο και από καρκινικά μοντέλα. Αυτή ωστόσο αντιπροσωπεύει μόνο μία διάσταση των περίπλοκων σχέσεων μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του καρκίνου(72) . Η ανοσιακή επιτήρηση δημιουργεί μια επιλεκτική πίεση στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου, η οποία τελικά διαμορφώνει την ανοσογονικότητα του όγκου(73).

Η ανοσολογική προσαρμογή του καρκίνου στην ανοσιακή απόκριση είναι μια πολυεπίπεδη διαδικασία που περιλαμβάνει διαφορετικές φάσεις: την αναγνώριση μέσω ογκογονικών δεικτών των μη-φυσιολογικών κυττάρων, την εξάλειψη αυτών από κύτταρα και μόρια της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας, την κατάσταση ισορροπίας, όπου τα καρκινικά κύτταρα παράγουν νέους πληθυσμούς, λιγότερο ανοσογονικούς ή με ικανότητα ανοσορύθμισης και τέλος την ανοσοδιαφυγή (Εικ.1.6). Στη φάση ισορροπίας, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν, αλλά το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ακόμη σε θέση να ελέγχει την εξέλιξη του όγκου. Η φάση της ανοσοδιαφυγής αναφέρεται σε μια τελική κατάσταση στην οποία περιέρχονται τα καρκινικά κύτταρα, κατά την οποία μπορούν να αποφεύγουν αποτελεσματικά, να καταστέλλουν, και να ξεπερνούν τον έλεγχο από το ανοσοποιητικό σύστημα(38).

Πολλοί ανοσορυθμιστικοί μηχανισμοί απαντώνται στον καρκίνο. Αυτοί περιλαμβάνουν την θετική επιλογή καρκινικών κυττάρων που έχουν απωλέσει την ικανότητα έκφρασης ή παρουσίασης καρκινικών αντιγόνων, με αποτέλεσμα να μην επάγουν T-μεσολαβούμενη απόκριση(74). Σε αυτό το σημείο, οι όγκοι μπορούν να αναπτυχθούν και να γίνουν κλινικά ανιχνεύσιμοι. Επιπλέον, σε αυτό το στάδιο τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επωφεληθούν από το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον και να το χρησιμοποιήσουν για να προωθήσουν την καρκινογένεση(75). Στην πραγματικότητα, οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι πυροδοτούν μια εγγενή φλεγμονώδη απόκριση που διαμορφώνει ένα ευνοϊκό για την ανάπτυξη του καρκίνου μικροπεριβάλλον(76) .



Εικ.1.6: Στάδια ανοσοεπιτήρησης και ανοσιακής διαφυγής του καρκίνου (38)

Ο πολυδιάστατος ρόλος της ανοσοαπόκρισης στην παθογένεση του καρκίνου εξηγείται από τις αποκλίνουσες λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που εντοπίζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ο τύπος και η θέση των κυττάρων ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή, όμως τα περισσότερα είναι μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα. Εάν το ανοσοποιητικό σύστημα περιορίζει ή ευνοεί την ανάπτυξη καρκίνου είναι ένα ζήτημα ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ αντίρροπων δυνάμεων. Αυτή η διττή φύση της ανοσολογίας του καρκίνου φαίνεται στην περίπλοκη σχέση καρκίνου και ενεργοποίησης του συμπληρώματος που περιγράφεται στη συνέχεια.

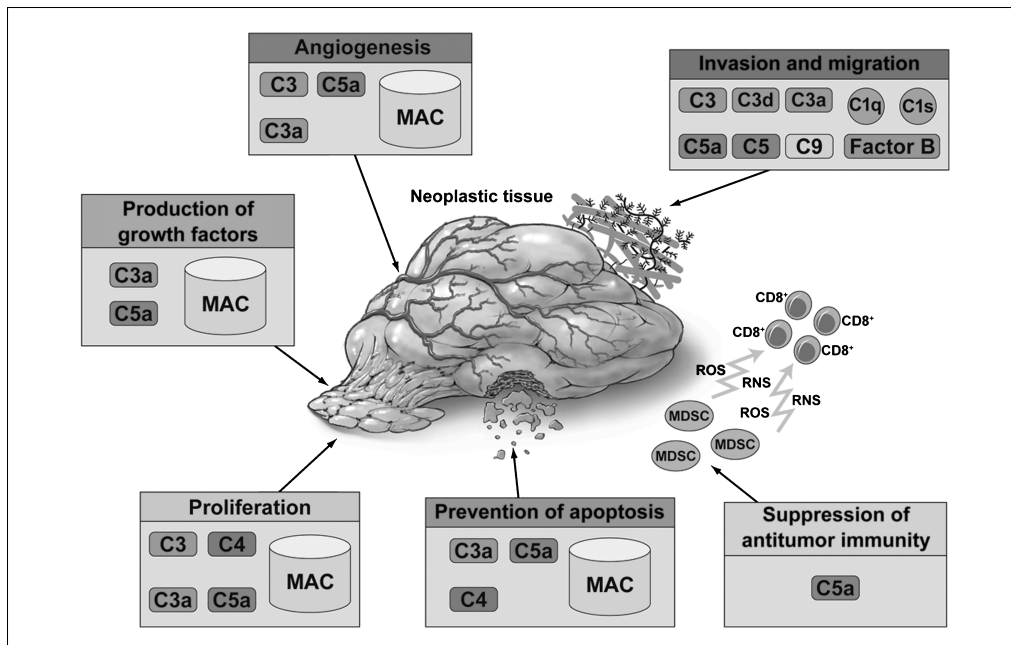
A.3.2 Ο ρόλος του συστήματος του συμπληρώματος στον καρκίνο

Τα βήματα που ακολουθούν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος μετά την αναγνώριση ενός ξένου σώματος είναι η φλεγμονώδης απόκριση, η οψωνοποίηση του κυττάρου-στόχου και σε ορισμένες περιπτώσεις ο θάνατός του. Αυτός ο συμβατικός ρόλος του συμπληρώματος μπορεί να έχει επίδραση στον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου. Οι πολυάριθμες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές που σχετίζονται με την καρκινογένεση αλλάζουν δραματικά την μορφολογία και τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης. Μεταβολές στη γλυκοζυλίωση (77-79), όπως και αύξηση του μεταβολισμού των λιπιδίων της μεμβράνης (80-82) χαρακτηρίζουν την αλλαγή του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων από φυσιολογικό σε κακοήγη. Σύμφωνα με μελέτες διαφόρων τύπων καρκίνου, το σύστημα του συμπληρώματος ενεργοποιείται μετά από έκφραση καρκινικών δεικτών και εναπόθεση συστατικών του συμπληρώματος στον καρκινικό ιστό. Λιγοστή πληροφόρηση υπάρχει σχετικά με τα καρκινικά αντιγόνα που εμπλέκονται στην αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από το συμπλήρωμα και με τους ακριβείς μηχανισμούς

που διέπουν αυτή την ενεργοποίηση. Σε καρκινικές σειρές και ζωικά μοντέλα διαφόρων τύπων καρκίνου παρατηρήθηκε ενεργοποίηση τόσο μέσω της κλασσικής όσο και μέσω της εναλλακτικής οδού(38) .Εκτός από τις παραδοσιακές οδούς ενεργοποίησης, τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα μέσω ενός ενδογενούς μηχανισμού(83) .Μια βαθύτερη γνώση των μηχανισμών αυτών θα μπορούσε να είναι πολύτιμη για την ταυτοποίηση διαγνωστικών βιοδεικτών και ακόμη για την στόχευση της αντικαρκινικής θεραπείας. Μεταβολές των συστατικών του συμπληρώματος στο πλάσμα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικές για την πρόβλεψη της θετικής απόκρισης ενός ασθενούς στη χημειοθεραπεία(84) .

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να προάγει την ογκογένεση

Στη μελέτη του καρκίνου η έρευνα είχε επικεντρωθεί για πολλά χρόνια στον κυτταροτοξικό ρόλο του συμπληρώματος όσον αφορά την στόχευση και την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Νέα δεδομένα ωστόσο παρουσιάζουν μια νέα οπτική σε σχέση με το ρόλο αυτό. Το γεγονός ότι ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου C3 ή του υποδοχέα C5aR έδειχναν μειωμένη ανάπτυξη όγκου σε σχέση με τα φυσιολογικά υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος μπορεί να ευνοούν τον κακοήθη φαινότυπο (83, 85, 86). Στην ίδια γραμμή με αυτή την υπόθεση έχουν αποδοθεί στα ενεργοποιημένα συστατικά του συμπληρώματος πολλαπλές λειτουργίες σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Το συμπλήρωμα μπορεί να βοηθήσει τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση, να προάγει την αγγειογένεση, να ενεργοποιεί μιτογόνα μονοπάτια σηματοδότησης, να ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να έχει αντιαποπτωτική δράση, καθώς και να συμμετέχει στην διείσδυση των καρκινικών κυττάρων σε περιφερικό υγιή ιστό και τη μετανάστευση (εικ.1.7) (87).



Εικ 1.7: Πιθανοί μηχανισμοί προαγωγής της ανάπτυξης του όγκου από πρωτεΐνες του συμπληρώματος στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου. Ενδεικτικά αναφέρονται η ενεργοποίηση μιτογόνων μονοπατιών σηματοδότησης, η παραγωγή αυξητικών παραγόντων, η προστασία από απόπτωση, η κυτταρική διείσδυση και μετανάστευση διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας και καταστολή της αντι-καρκινικής ανοσοαπόκρισης(87) .

Η επίδραση του συμπληρώματος στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση

Ένα ουσιώδες χαρακτηριστικό που διακρίνει τα νεοπλασματικά κύτταρα από τα φυσιολογικά αντίστοιχά τους είναι η διαφορετική τους απόκριση στη δράση αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών. Ενώ η επιβίωση των φυσιολογικών κυττάρων εξαρτάται πρωτίστως από τη δράση εξωγενώς παραγομένων αυξητικών παραγόντων και από διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις με γειτονικά κύτταρα, το καρκινικό κύτταρο διαθέτει δύο κύριους μηχανισμούς αυτονομίας που το απαλλάσσουν από αυτού του είδους την εξάρτηση. Πρώτον, αναπτύσσεται εν απουσία αυξητικών σημάτων από την περιφέρεια και δεύτερον, δεν αποκρίνεται στο φάσμα αντιμιτωτικών σημάτων που διατηρούν υπό έλεγχο την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων (88). Μάλιστα σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως στο γλοιοβλάστωμα, τα κύτταρα είναι ικανά να παράγουν δικούς τους αυξητικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα τη συνεχή διέγερσή τους.

Διάφορα συστατικά του συμπληρώματος έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση στα καρκινικά κύτταρα σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων ή κυτταροκινών που προάγουν τη ανάπτυξη νεοπλασίας. Η διαμεσολαβούμενη από υποδοχείς των αναφυλατοξινών C3aR και C5aR μεταγωγή σήματος είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων του ήπατος και την ιστική αναγέννηση μετά από ηπατεκτομή, όπως έχει δείχθει, διαδικασία που σχετίζεται με την επαγωγή της έκκρισης κυτοκινών IL-6 και TNF-α (89) και την ενεργοποίηση μονοπατιών παρομοίων με αυτών της καρκινογένεσης. Επιπλέον, σε ζωικά μοντέλα παθοφυσιολογίας του ΚΝΣ, το C5a φάνηκε να μεσολαβεί στη νευροπροστασία και να ασκεί αντιαποπτωτική δράση (90, 91). Οι αναφυλατοξίνες C3a and C5a προάγουν την ογκογένεση ενεργοποιώντας μονοπάτια σηματοδότησης που αυξάνουν την κυτταρική επιβίωση. Η αλληλεπίδραση των C3a/C3aR και C5a/C5aR ενεργοποιεί κινάσες της οικογένειας MAPK (mitogen-activated protein kinase) συμπεριλαμβανομένων των ERK και p38. Επιπλέον τα C3a and C5a αυξάνουν την ενεργοποίηση των PIP3 (phosphatidylinositol 3-kinase) και Akt, πρωτεϊνών ισχυρά συσχετισμένων με νεοπλασίες, σε περιπτώσεις υπερέκφρασης (87). Γενικά, συγκεντρώνονται όλο και περισσότερα δεδομένα που υποστηρίζουν, ότι συστατικά του συμπληρώματος ενεργοποιούν ογκογενετικά μονοπάτια σηματοδότησης, πληροφορία που θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για τη χρήση αναστολέων του συμπληρώματος στη θεραπεία του καρκίνου.

Ρυθμιστική επίδραση συμπληρώματος στην ανοσοεπιτήρηση του καρκίνου

Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος παίζουν διττό ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Προϊόντα ενεργοποίησης όπως τα C1q, C3, C3a, C4, C5, και το MAC είναι χαρακτηριστικά του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος του όγκου και έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν ρόλο στην άμεση και έμμεση απόκριση του ξενιστή έναντι του όγκου διαμέσου της CDC και ADCC κυτταροτοξικότητας αντιστοίχως (87). Αρκετές πρόσφατες μελέτες αποδίδουν την προαγωγή της καρκινικής ανάπτυξης διαμέσου των πρωτεϊνών του συμπληρώματος σε μια έμμεση επίδραση, που σχετίζεται με μεταβολή της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή έναντι του όγκου προς την οδό της καταστολής (83, 87, 92). Έχει παρατηρηθεί για παράδειγμα αύξηση των μυελοειδικής προέλευσης κατασταλτικών κυττάρων και μείωση των κυτταροτοξικών T-κυττάρων (CD8+) σε διάφορες καρκινικές σειρές (86).

Οι ανοσοκατασταλτικοί μηχανισμοί που προέρχονται από τον καρκίνο συνοψίζονται σε μειωμένη έκφραση ή απουσία έκφρασης μορίων του μείζονος συμπλέγματος

ισοσυμβατότητας MHC-I, καρκινικών αντιγόνων ή σημάτων κινδύνου και σε παραγωγή και έκκριση ανσοκατασταλτικών παραγόντων και κυτταροκινών, όπως ο VEGF, ο TGF-β, η IL-10, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και προσταγλανδίνες (93). Η ανοσοκαταστολή ενορχηστρώνεται από κύτταρα λεμφοειδούς ή μυελοειδούς προέλευσης που επιστρατεύονται και ενεργοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Αυτά τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα περιλαμβάνουν ρυθμιστικά T-κύτταρα, μακροφάγα TAMs (Tumor-Associated Macrophages), ρυθμιστικά/ανοχογονικά δενδριτικά κύτταρα και τα κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης CD11b+ (myeloid-derived suppressor cells -MDSCs) (94).

Το συμπλήρωμα μπορεί ακόμη να επιδρά ευνοϊκά στα κύτταρα του όγκου και με άμεσο αυτοκρινή τρόπο, ανεξάρτητο από την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών T-κυττάρων. Μελέτες των Min Soon Cho και Hernan G. Vasquez σε αθυμικά ποντίκια έδειξαν ότι τα κύτταρα διαφόρων ανθρωπίνων καρκινικών σειρών, εκκρίνουν ενδογενώς συστατικά του συμπληρώματος που ευνοούν την ανάπτυξή τους μετά από ενεργοποίηση, ενώ εκφράζουν και υποδοχείς αναφυλατοξινών. Το φαινόμενο της επαγωγής της ανάπτυξης του όγκου δεν σχετιζόταν με τα επίπεδα των T-κυτταροτοξικών κυττάρων και η αποσιώπηση του γονιδίου C3 σε CD8 -/- ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα μείωση του όγκου όμοια με αυτή στα φυσιολογικά, γεγονός που συνδυαστικά με άλλα δεδομένα υποδεικνύει την αυτοκρινή δράση (95).

Το συμπλήρωμα προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο

Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος ασκούν αντιαποπτωτική δράση και ευνοούν την επιβίωση. Η έλλειψη απόκρισης των νεοπλασματικών κυττάρων σε εξωγενή σηματοδότηση τους επιτρέπει διαφυγή από αποπτωτικά σήματα. Αυτή η ιδιότητα, ευνοϊκή της επιβίωσης, έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τον ομοιοστατικό έλεγχο της ανάπτυξης των φυσιολογικών κυττάρων, τα οποία διαθέτουν στο σύνολό τους σχεδόν τη ικανότητα επαγωγής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε απάντηση προς κατάλληλα σήματα (88). Το C5a έχει αντιαποπτωτική δράση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, ενώ λιγότερες ενδείξεις υποστηρίζουν όμοια δράση και για το C3a που φαίνεται να παίζει ρόλο στη νευροπροστασία (87).

Η επίδραση του συμπληρώματος στην αγγειογένεση

Πολυετής έρευνα για τον καρκίνο έχει εδραιώσει την αρχή ότι η πρόοδος από ένα μικρό πληθυσμό νεοπλασματικών κυττάρων σε κλινικά ανιχνεύσιμο καρκινικό όγκο απαιτεί τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων που διηθούν το νεοσύστατο κακοήγη ιστό (87). Η αγγειογένεση, δηλαδή η δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία αποτελεί μηχανισμό-κλειδί στην καρκινογένεση που σχετίζεται άμεσα με το ρυθμό ανάπτυξης και την επιθετικότητα του όγκου (96). Οι ενεργοί παράγοντες του συμπληρώματος έχουν συσχετισθεί, είτε άμεσα είτε έμμεσα, με αγγειογένεση σε αρκετές ασθένειες. Λόγω της ετερογένειας των μελετών και των ασθενειών που εξετάστηκαν, υπάρχει κάποια διαμάχη για την προ- ή αντι-αγγειογενετική δράση του συστήματος συμπληρώματος κατά τη δημιουργία νέων αγγείων.

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να είναι σημαντική στην προαγωγή της αγγειογένεσης κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του όγκου. Σύμφωνα με μελέτες η αναφυλατοξίνη C5a πυροδοτεί χημειοτακτικούς μηχανισμούς και δημιουργία σωληνοειδών δομών τόσο σε ομφαλικά (83, 97) όσο και μικροαγγειακά (85) ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου. Όπως συμβαίνει με τον TNF-α και τους λιποπολυσακχαρίτες, η απόκριση του ενδοθηλιακού κυττάρου στο C5a περιλαμβάνει την ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν

στην ενδοθηλιακή προσκόλληση και μετανάστευση, καθώς και την αγγειογένεση(98).

Η επίδραση του συμπληρώματος στη μετάσταση

Μετά τη δημιουργία μιας αποικίας νεοπλασματικών κυττάρων, οι καρκινικοί όγκοι έχουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα να αναδιοργανώνουν το περιφερικό μικροπεριβάλλον τους κατά τρόπο που να διευκολύνει την διείσδυσή τους διαμέσου της εξωκυττάριας μήτρας σε απομακρυσμένους ιστούς. Η μετανάστευση και η εκ νέου εγκατάσταση των νεοπλασματικών αποικιών μακριά από το σημείο προέλευσής τους, η διαδικασία της μετάστασης, είναι ιδιαίτερα κακή εξέλιξη για τον ασθενή και συνδέεται με υψηλή νοσηρότητα και αυξημένη θνησιμότητα. Η μετάσταση εκτιμάται ότι είναι υπεύθυνη για το 90 % περίπου των περιστατικών που καταλήγουν από καρκίνο(87).

Αυτή η πολυεπίπεδη διαδικασία περιλαμβάνει γενετικές και μοριακές μεταβολές στα κύτταρα του όγκου και τα κύτταρα στρώματος, οδηγώντας σε τοπική διείσδυση διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας και μετάβαση στο αγγειακό ενδοθήλιο, μεταφορά διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος και εξαγγείωση σε άλλες ανατομικές θέσεις, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων(99).

Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος μπορεί να συμμετέχουν σε κάποιες από τις διαδικασίες που εμπλέκονται στη διείσδυση και τη μετάσταση. Αναδιοργανώνουν διακυτταρικούς και εξωκυτταρικούς μεμβρανικούς συνδέσμους με τη μεμβράνη(87) και μπορούν να προκαλέσουν απευθείας διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας (100). Ένα από τα πιο σημαντικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στη μεταστατική διαδικασία είναι η γένεση μεσεγχυματικών κυττάρων από επιθηλιακά κύτταρα, γνωστή ως επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT). Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος ενισχύουν την EMT. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα καρκινικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση αναφυλατοξινών που μπορούν να επιστρατεύσουν τα πολωμένα κύτταρα του στρώματος προς ανάπτυξη του όγκου(87). Η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας είναι το επόμενο βήμα-κλειδί για τα νεοπλασματικά κύτταρα, προκειμένου να διεισδύσουν και να μεταναστεύσουν σε θέσεις απομακρυσμένες από τον ιστό (88). Οι πρωτεάσες που είναι υπεύθυνες για τη διαδικασία αυτή συνήθως παράγονται από τα κύτταρα του στρώματος και ενεργά φλεγμονώδη κύτταρα, αποδεικνύοντας την ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων για να ανατρέπουν την κανονική φυσιολογία του μικροπεριβάλλοντός τους προς εξυπηρέτηση των δικών τους διεισδυτικών στόχων(101). Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί επιπλέον να επάγει την έκκριση και ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεασών όπως οι MMP-2 and -9 , πρωτεάσες με επιβεβαιωμένα καθοριστικό ρόλο στη μετάσταση(102).

A.3.3 Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον καρκίνο του εγκεφάλου.Ο ρόλος των αναφυλατοξινών.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός περιορίζει την εισροή κυττάρων και συστατικών του αίματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η ανοσολογική επιτήρηση και η διάκριση εαυτών και μη-εαυτών αντιγόνων επιτελείται από τοπικά εγκατεστημένα κύτταρα, μεταξύ άλλων μικρογλοιακά και αστροκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα γλοίας, αλλά και οι νευρώνες μπορούν να παράγουν τοπικά παράγοντες του συμπληρώματος και ρυθμιστικές πρωτεΐνες(103, 104). Ο καταρράκτης του συμπληρώματος είναι ο κύριος υπεύθυνος για την απομάκρυνση μικροοργανισμών και γηρασμένων ή μεταλλαγμένων κυττάρων στον υγιή εγκέφαλο, καθώς και για την αποκοπή συνάψεων και την ανάπτυξη των νευρωνικών δικτύων κατά την εμβρυογένεση.

Σε παθολογικές συνθήκες η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι εμφανής σε οξείες εγκεφαλικές βλάβες (λοίμωξη, τραύμα, εγκεφαλικό επεισόδιο) και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (μεταξύ άλλων το σύνδρομο Alzheimer's) που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονώδεις επιπλοκές(105). Το γενετικό προφίλ και κατά συνέπεια η συγκέντρωση των επιπέδων πρωτεϊνών-κλειδιών των μονοπατιών ενεργοποίησης του συμπληρώματος έχουν συσχετιστεί με πολυάριθμες ασθένειες. Οι κακοήθειες στον εγκέφαλο σχετίζονται με ένα χρόνια φλεγμονώδες περιβάλλον που μπορεί να οδηγήσει στην τοπική απελευθέρωση αναφυλατοξινών στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, διαμέσου επαγόμενης από τραύμα ενεργοποίησης του συμπληρώματος ή μέσω άλλων μηχανισμών.

Σε ορό ασθενών με GBM βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα του factor-B και αυξημένα επίπεδα C1q, αλλά και εναποθέσεις C3 και C5b-9 στον όγκο, ενδεικτικές τοπικής ενεργοποίησης(106) . Εναπόθεση C4d στον καρκινικό ιστό συσχετίστηκε επίσης με διηθητικά αστροκυτώματα σταδίου II-IV (107) . Εντούτοις, οι ακριβείς μηχανισμοί εμπλοκής του συμπληρώματος στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του εγκεφάλου παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι .

Όπως αναφέρεται στο κεφ A.3.2, το συμπλήρωμα προάγει την ανάπτυξη του καρκινικού ιστού δρώντας σε πολλαπλά επίπεδα. Οι αναφυλατοξίνες C3a και C5a φαίνεται ότι διαδραματίζουν ρόλο-κλειδί σε όλους τους μηχανισμούς αυτής της προ-ογκογονικής δράσης, μέσω της πρόσδεσής τους στους υποδοχείς τους. Αστροκύτταρα και καρκινικές σειρές αστροκυττάρων (γλοιοβλαστωμάτων) ανθρώπου και ποντικού έχει δειχθεί ότι εκφράζουν υποδοχείς αναφυλατοξινών του συμπληρώματος C3aR και C5aR/ C5L2 (108-110).

Το C5a προάγει τον πολλαπλασιασμό αδιαφοροποίητων ανθρωπίνων κυττάρων νευροβλαστώματος. Η δράση αυτή σχετίζεται με τη σύνδεση C5a/C5aR και τη μέσω αυτής ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και του NF- κB(44). Σε ζωικά μοντέλα παθοφυσιολογίας του κεντρικού νευρικού συστήματος το C5a έχει εμφανίσει ικανότητα νευροπροστατευτικής και αντιαποπτωτικής δράσης(87). Ακόμα τα πεπτίδια C3a και C5a έχει δειχθεί ότι προάγουν τη χημειοταξία μεσεγχυματικών κυττάρων μυελωματικής προέλευσης και την ισχυρή ενεργοποίηση των μονοπατιών ERK1/2 και Akt (111). Το C5a επάγει ακόμη μέσω πρόσδεσής του στον C5aR την έκκριση MMP-9 σε μακροφάγα(112), ενώ πρόσφατα έχει δειχθεί ότι αυξάνει έως και 11 φορές την έκκριση μεταλλοπρωτεασών από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα διαφόρων σειρών, αυξάνοντας τη διεισδυτική τους ικανότητα (113). Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, σε ζωικά μοντέλα ποντικών με καρκίνο του μαστού η σηματοδότηση μέσω

της αλληλεπίδρασης C5a/C5aR ευνοεί τη δημιουργία μεταστάσεων σε όργανα όπου αυτές συνήθως εμφανίζονται, όπως στους πνεύμονες και το ήπαρ. Η πρόσδεση του C5a στον υποδοχέα του συμβάλλει στη δημιουργία ενός μικροπεριβάλλοντος όπου, μέσω της έκκρισης ρυθμιστικών κυτταροκινών όπως οι IL-10 και TGFβ, προάγεται η γένεση και δράση ανοσοκατασταλτικών κυττάρων, ενώ καταστέλλεται η κυτταροτοξική δράση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων που επιτίθενται στον όγκο (114) . Παρόμοια δράση για το C5a αναφέρεται σε μεταστάσεις καρκίνου του παχέος εντέρου στο ήπαρ (115) .

Η παρούσα ερευνητική μελέτη βασίστηκε στην υπόθεση ότι η τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος, που προκαλείται κατά την ανάπτυξη γλοιοβλαστώματος και έπειτα από έκθεση του όγκου σε ιονίζουσα ακτινοβολία, μπορεί να οδηγεί στην δράση υποδοχέων αναφυλατοξινών στην επιφάνεια των γλοιωματικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων μπορεί να είναι εναρκτήρια κυτταρικών αποκρίσεων που ρυθμίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την έντονα διηθητική επιθετική συμπεριφορά και την ισχυρή αντίσταση των κυττάρων αυτών στη θεραπεία με ιονίζουσα ακτινοβολία .

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση της αυτόλογης επίδρασης της αναφυλατοξίνης C5a και του υποδοχέα της C5aR1 σε κομβικές κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με την επιβίωση, την ακτινοανθεκτικότητα και τον έντονα διεισδυτικό φαινότυπο κυττάρων πολύμορφου γλοιοβλαστώματος.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

- Παραγωγή ανθρώπινης αναφυλατοξίνης C5a.
- Φαινοτυπικός έλεγχος της έκφρασης υποδοχέα C5aR1 σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος.
- **In vitro** μελέτες ακτινοευαισθησίας σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος που εκφράζουν υποδοχέα C5aR1 (T98G & U-87MG): Μετρήσεις της ικανότητας πολλαπλασιασμού και ανάλυση κυτταρικού κύκλου μετά από επίδραση με C5a. Μελέτη της επιβίωσης μετά από επίδραση με C5a, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με θεραπευτικές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας.
- **In vitro** μελέτη της διεισδυτικότητας και της ικανότητας διήθησης των κυττάρων γλοιοβλαστώματος μετά από επίδραση με C5a, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με θεραπευτικές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας.

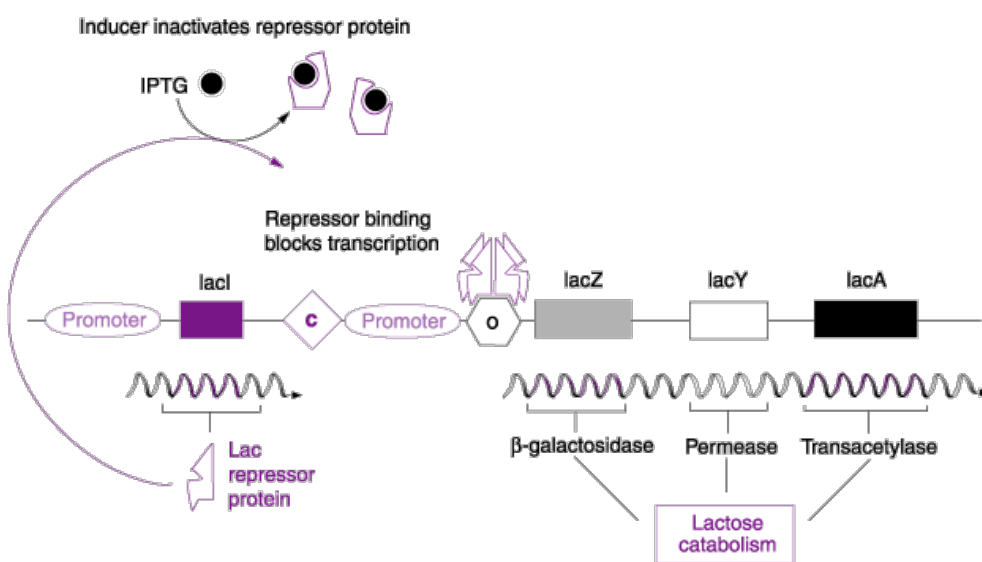
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 Παραγωγή ανθρώπινης ανασυνδυασμένης αναφυλατοξίνης C5a

B.1.1. Καλλιέργεια βακτηρίων και επαγωγή της έκφρασης ανθρώπινου γονιδίου C5a με IPTG

Η επαγωγή της έκφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης γίνεται με το σύστημα IPTG (ισοπροπυλο-β, D-θειογαλακτοζιδάση). Το IPTG είναι δομικό ανάλογο της λακτόζης που δε διασπάται από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση. Δεσμεύεται στον καταστολέα lac και τον αδρανοποιεί. Λειτουργεί επομένως ως επαγωγέας έκφρασης του οπερονίου της λακτόζης. Το IPTG δεν επιτρέπει τη πρόσδεση του καταστολέα στον υποκινητή και έτσι συνδέεται ελεύθερα η RNA πολυμεράση με αποτέλεσμα να αρχίζει η μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων που ακλουθούν (Εικ.7).



Εικ 2.1 : Επαγωγή της έκφρασης οπερονίου της λακτόζης με IPTG (116).

Η ανθρώπινη αναφυλατοξίνη C5a εκφράζεται από επιδεκτικά σε μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους M15, που μετασχηματίζονται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pQE30. Τα κύτταρα αυτά φέρουν ακόμη αντίγραφα του πλασμιδίου pREP4 repressor plasmid, που τους προσδίδει ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη. Το πλασμίδιο φορέας του C5a pQE30 περιέχει αλληλουχία που δίνει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, αλληλουχία που επιτρέπει την ελεγχόμενη επαγωγή της παραγόμενης πρωτεΐνης με IPTG (lac operator) και ετικέτα έξι ιστιδινών που είναι απαραίτητη για τον καθαρισμό.

Στο πλασμίδιο pQE30, το τμήμα του DNA που κωδικοποιεί το C5a, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της T5 πολυμεράσης η οποία παράγεται μέσα στα κύτταρα της καλλιέργειας. Με την προσθήκη του IPTG, η T5 πολυμεράση αναγνωρίζει τον υποκινητή της και έτσι αρχίζει η μεταγραφή του γονιδίου (117).

Η κλωνοποίηση του γονιδίου C5a και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο έλαβαν χώρα στο εργαστήριο του Dr.J.Lambris στο U-Penn και ο μετασχηματισμός σε M15 κύτταρα στο εργαστήριο Μοριακής Ανοσολογίας Δρ.Δ.Μαστέλλου στο Δημόκριτο. Τα κύτταρα αυτά φυλάσσονται στους -80°C σε μίγμα θρεπτικού μέσου για βακτήρια και γλυκερόλης, που χρησιμοποιείται ως κρουπροστατευτικό, και προέρχονται από αποικία που αναπτύχθηκε κατά το μετασχηματισμό παρουσία αντιβιοτικών.

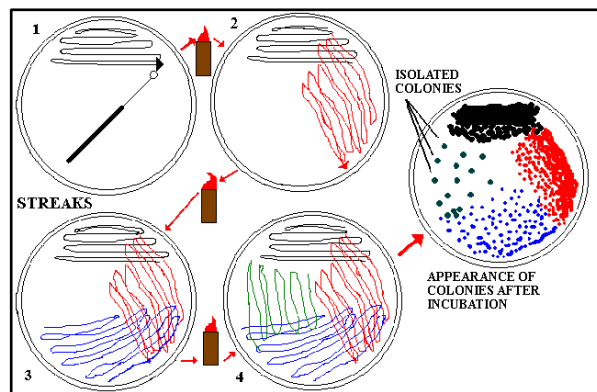
Υλικά και Όργανα

- Βακτηριακό στέλεχος E.Coli M15 μετασχηματισμένο με πλασμιδιακό φορέα PQE30 που φέρει το ανθρώπινο γονίδιο του C5a καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά Ampicillin/Kanamycin.
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας βακτηρίων LB /Agar (100ml: 1gr tryptone, 0,5g yeast extract , 1gr NaCl, 1,5gr Agar)
- Τρυβλία για στερεή καλλιέργεια.
- LB χωρίς άγαρ 2L.
- Φλάσκες για υγρή βακτηριακή καλλιέργεια.
- Αντιβιοτικό καναμυκίνη 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Appli-chem)
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Appli-chem)
- IPTG 400 μM (Appli-chem)
- Επωαστικός κλίβανος
- Φωτόμετρο
- Φλόγιστρο βουτανίου
- Φυγόκεντρος Sorvall
- Σωλήνες φυγοκέντρησης 250 ml (Sorvall) για rotor-HS4

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Επιστροφή σε τρυβλίο με LB/agar + amp/kan του κλώνου M15 και επιλογή αποικίας.

- Προσθήκη αντιβιοτικών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις σε θρεπτικό με άγαρ σε τρυβλία (15ml/plate). Αναμονή να στερεοποιηθεί το άγαρ.
- Επιστροφή του τρυβλίου με δείγμα από το μετασχηματισμένο κλώνο (glycerol stock).



Εικ.2.2 : Επιστροφή τρυβλίου που περιέχει στερεό άγαρ με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων.

- Η επίστρωση γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αραιωθεί το δείγμα από το stock και να έχουμε σε ένα σημείο μεμονωμένες αποικίες.βλ.εικ.2.2
- Επώαση για 14h στους 37⁰C στον επωαστικό κλίβανο.

2. Εμβολιασμός σε μικρή πυκνή καλλιέργεια

- Την επόμενη μέρα επιλογή μιας αποικίας και εμβολιασμός σε υγρή καλλιέργεια 5ml με τα αντιβιοτικά , επώαση στους 37⁰C σε κλίβανο ,υπό συνεχή ανάδευση στα 200 rpm.

3. Εμβολιασμός σε 40ml καλλιέργεια

- Η καλλιέργεια έχει θολώσει.Από αυτή την πυκνή καλλιέργεια φυλάσσεται δείγμα για καινούργιο glycerol stock M15 20%.Από την ίδια καλλιέργεια γίνεται εμβολιασμός σε μεγαλύτερη(→10ml σε 40ml LB). Ε
- Επώαση στους 37⁰C σε κλίβανο ,υπό συνεχή ανάδευση στα 200 rpm για 14h.

4.Εμβολιασμός και επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης σε καλλιέργεια 2L με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 400μM.

- Σε 4 μεγάλες φλάσκες προστίθενται (κοντά σε φλόγα) 500ml LB + ampicillin 100 μg/ml+ kanamycin 25 μg/ml.
- Εμβολιασμός: σε κάθε φλάσκα 500ml προστίθενται 10ml από την O/N καλλιέργεια (για 1L-20ml εμβολιασμός σύμφωνα με το πρωτόκολλο).
- Επώαση σε επωαστικό κλίβανο 37⁰C υπό συνεχή ανάδευση 200rpm.
- Ελέγχουμε την πορεία ανάπτυξης των βακτηρίων.Δείγματα 1ml από τις φλάσκες φωτομετρούνται σε λ=600nm.Σε απορρόφηση 0,6-0,9 ,όπου είναι η εκθετική φάση ανάπτυξης, προσθήκη IPTG.
- Τα κύτταρα επώαζονται με το IPTG για 4 ώρες, στους 37 °C με συνεχή ανάδευση στα 200 rpm και συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm στους 4⁰C. Η διαδικασία της επαγωγής ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 16% (υποκεφάλαιο Β.2).Έχουν φυλαχθεί δείγματα καλλιέργειας πριν και μετά την επαγωγή για αυτό το σκοπό.

B.1.2 Χρωματογραφία χημικής συγγένειας.Καθαρισμός C5a πρωτεΐνης σε στήλη αγαρόζης Ni⁺²- νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA)

Σε αλκαλικό περιβάλλον, πρωτεΐνες που περιέχουν στην αλληλουχία τους έξι μόρια ιστιδίνης (6xHis-tag), προσδένονται, με υψηλή συγγένεια, σε στήλη νικελίου-NTA, (Nitrilotriacetic acid, NTA). Το NTA δεσμεύει τέσσερις από τις έξι διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσής του στο ιόν του νικελίου. Στο αλκαλικό περιβάλλον τα μόρια ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά και ο ιμιδαζολικός δακτύλιος κάθε μορίου ιστιδίνης δεσμεύεται σε μια θέση πρόσδεσης ιόντος νικελίου.Τα ιόντα νικελίου είναι ήδη σταθεροποιημένα στα σφαιρίδια αγαρόζης-NTA. Επομένως το NTA συνδέει πιο σταθερά τα μεταλλικά ιόντα σε σχέση με άλλες ρητίνες, λειτουργεί ως χηλικός

υποκαταστάτης και μαζί με τα μόρια ιστιδίνης δημιουργούν ισχυρό χηλικό σύμπλοκο που συγκρατεί με μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης τα ιόντα νικέλιου (118) .

Η επιλογή πρωτεϊνών που φέρουν ετικέτα έξι ιστιδινών έγινε γιατί η αλληλεπίδραση μεταξύ κατιόντων της στήλης και της ετικέτας της πρωτεΐνης επιτρέπει την έκλυση της πρωτεΐνης τόσο σε αποδιατακτικές συνθήκες με μείωση του pH (παύει η αλληλεπίδραση σε χαμηλό pH 5.9-4.5) του διαλύματος, όσο και σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης φτάνει σε ποσοστό μέχρι 95%. Στο πρωτόκολλο καθαρισμού του C5a η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και στη συνέχεια, αφού απομονωθεί, γίνεται επαναδιάταξη και ανάκτηση της τριτοταγούς της δομής σε ειδικό διάλυμα επαναδίπλωσης (refolding buffer).

Υλικά και όργανα

- **Buffer B stock** (500 ml) αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με ουρία **pH=8.0**

6.0 g NaH₂PO₄

0.6 g Tris base

240.25 g Urea

8.77 g NaCl (300 mM)

- **Lysis Buffer B** (50 ml): αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης- στο buffer B stock προστίθεται 2-μερκαπτοαιθανόλη (10 mM)
- **Buffer C** (100 ml): αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης buffer B stock ρυθμίζεται το pH σε 6.3
- **Buffer D** (100 ml): αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης buffer B stock ρυθμίζεται το pH σε 5.9
- **Buffer E** (50 ml): αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης buffer B stock ρυθμίζεται το pH σε 4.5
- Refolding buffer : διάλυμα επαναδιάταξης-αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (4L):

48.4 g Tris base (0.1M)

200 μl Tween-80 (0,005%)

2.46 g Γλουταθειόνη-ανηγμένη (2 mM) Applichem

0.49 g Γλουταθειόνη -οξειδωμένη (0.2mM) Applichem

- Δοχείο διαπίδυσης
- Συσκευή μέτρησης pH
- Πρότυπα διαλύματα με pH=7,00 pH=9,00 pH=4,00
- φυγόκεντρος Sorvall
- Ομογενοποιητής υπερήχων (sonicator)
- σωλήνες φυγοκέντρησης 50 ml (Sorvall για rotor-SS34)
- αгарόζη νικέλιου-νιτριλοτριοξικού οξέος (Ni⁺²-NTA) (Qiagen)
- αντιδραστήριο Bradford* (BioRad)

Πειραματικό πρωτόκολλο

Το πρωτόκολλο καθαρισμού του C5a από κύτταρα M15 είναι της εταιρείας **QUIAGEN: qC5a Recombinant Protein Purification using pQE/M15 (vector/host) QUIAGEN expression system**

1.Το ίζημα των κυττάρων από την βακτηριακή καλλιέργεια M15 αποψύχεται.Καθαρισμός γίνεται σε 1L το πολύ καλλιέργειας.Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των βακτηρίων σε 20ml lysis buffer pH=8 (20ml).Πολύ καλή ανάδευση και ομογενοποίηση .

2.Ακολουθεί λύση με κύματα υπερήχων 6x10 sec σε πάγο (στο βιολογικό τμήμα).

3.Προσθήκη ειδικού μαγνήτη (stirbar) και επώαση στον αναδευτήρα 1h σε θ° περιβάλλοντος. Στο χρόνο αυτό γίνεται εξισορρόπηση της στήλης για τον καθαρισμό.

Εξισορρόπηση Ni-NTA στήλης

Η στήλη έχει σφαιρίδια αγαρόζης/ Ni^{2+} περίπου 1-2ml.Κάθε τέτοια στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ίδια πρωτεΐνη ~10 φορές και τα σφαιρίδια έως 3 φορές.

- Προσθήκη 10X όγκου των σφαιριδίων dH_2O με τρόπο που να μην διαταράσσει τα σφαιρίδια.
- Βάζουμε 10X όγκου των σφαιριδίων Buffer B stock pH8. Αφήνουμε λίγο Buffer B stock 2 ή 3X όγκο των σφαιριδίων.
- Κλείνουμε με το πώμα τη στήλη.

4.Αφαίρεση του μαγνήτη και φυγοκέντρηση στις 10000 rpm 30min σε RT (κανονικά πρέπει στους $4^{\circ}C$ αλλά δεν έχουμε αυτή τη δυνατότητα λόγω προβλημάτων λειτουργίας της μεγάλης φυγοκέντρου).

5.Συλλογή του διαυγούς υπερκειμένου, όπου βρίσκονται όλα τα πρωτεϊνικά κλάσματα.Φυλάσσεται ένα δείγμα ~50ml από αυτό το υπερκείμενο, ούτως ώστε να ελεγχθεί αργότερα αν χρειαστεί η παρουσία της πρωτεΐνης σε αυτό (lysate).

6.Το καθαρό υπερκείμενο αναμιγνύεται με τα σφαιρίδια Ni^{2+} -NTA αγαρόζης της στήλης,τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (B).

7.Σε σωληνάριο μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο της στήλης(agarose-υπερκείμενο) και επωάζεται,υπό περιστροφή για 1h.Στο στάδιο αυτό δεσμεύονται όλες οι πρωτεΐνες που φέρουν His-Tag ετικέτα στα σφαιρίδια.

8.Το περιεχόμενο μεταφέρεται στο stand και ξεκινά η έκλυση.Το έκλυσμα της στήλης που συλλέγεται και φυλάσσεται στους $4^{\circ}C$ ονομάζεται FLOW THROUGH και ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση SDS Page σε gel 16% η παρουσία C5a σε αυτό.Αν έχει δεσμευτεί η πρωτεΐνη στα σφαιρίδια δε θα πρέπει να φαίνεται η ζώνη του C5a στο gel.

9.Έναρξη έκλυσης με αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (B). Μη δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη αφού γίνονται τουλάχιστον 5 πλύσεις με το buffer B

stock. Ταυτόχρονα ελέγχονται τα κλάσματα για παρουσία πρωτεϊνών σε πλάκα με αντίδραστήριο Bradford (200μl Bradford +20μl έκλουμα) και συνεχίζεται η εκλούση μέχρις ότου το χρώμα να είναι ίδιο με του control (buffer B), που σημαίνει ότι δεν εκλύεται άλλη πρωτεΐνη σε αυτό το pH.

10. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με τα buffer C (pH=6,3) και buffer D (pH=5,9). Κάθε φορά χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας του Bradford το αντίστοιχο buffer. Σε κάθε στάδιο που αλλάζει το pH απομακρύνονται οι μη επιθυμητές πρωτεΐνες.

12. Με την έναρξη της προσθήκης buffer E (pH=4,5), αρχίζει η έκλουση του C5a. Προστίθεται 1ml από το buffer E, αναμονή 3min με τη στήλη κλειστή μέχρι την έκλουση. Συλλέγεται δείγμα του κάθε κλάσματος έκλουσης για την ηλεκτροφόρηση. Συνεχίζεται η διαδικασία έως ότου δεν εκλύεται άλλη πρωτεΐνη (έλεγχος με Bradford). Συλλέγονται συνήθως συνολικά 7 κλάσματα E1-E7.

13. Η απόδοση του καθαρισμού ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 16% σε αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. κεφ. Β.2). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται λυσοζύμη, καθώς έχει μοριακό βάρος κοντά σε αυτό του C5a. Η ζώνη της λυσοζύμης, γνωστής συγκέντρωσης, συγκρίνεται με αυτή του C5a.

**Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Η πιο ανιονική, μπλε, μορφή της χρωστικής είναι αυτή που συνδέεται με τις πρωτεΐνες. Κατά συνέπεια η ποσότητα μιας πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί με τον καθορισμό του ποσού της χρωστικής ουσίας στην μπλε ιοντική μορφή.*

Χρησιμοποιείται αντίδραστήριο Bradford της εταιρείας BIORAD σε αραιώση 1:4.

Η μέθοδος είναι απλή γιατί η μέτρηση γίνεται ύστερα από ανάμιξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής, είναι γρήγορη και πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό χαμηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

14. Τα κλάσματα που έχουν την περισσότερη πρωτεΐνη (με βάση την εικόνα του gel) μεταφέρονται σε ειδική ημιπερατή μεμβράνη διαπίδυσης (cutoff=1kDa)-1ml από κάθε δείγμα κλάσματος, και η μεμβράνη βυθίζεται σε διάλυμα αναδίπλωσης (refolding buffer-2 L) ο/n στους 4°C υπό ανάδευση (stirrer με πολύ μικρό μαγνητάκι). Το refolding buffer περιέχει γλουταθειόνη ανηγμένης & οξειδωμένης μορφής, που βοηθά στη δημιουργία S-S δεσμών και την ανάκτηση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να έχουμε μια ενεργή πρωτεΐνη. Η ενεργότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ένα ειδικό πρωτόκολλο (βλ. ΚΕΦ Β.5 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ NBT).

19. Την επόμενη μέρα μεταφέρεται η μεμβράνη σε PBS που έχει προψυχθεί στους 4°C και επωάζεται ξανά ο/n στους 4°C υπό ανάδευση.

20. Την επόμενη μέρα συλλέγεται η πρωτεΐνη, ο όγκος είναι λίγο αυξημένος 1-2 ml. Φυγοκεντρείται στους 4°C, 3000 rpm για να κατακρημνιστούν τυχόν υπάρχοντα

υπολείμματα μη σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Ελέγχεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (βλ. κεφ. Β.3).

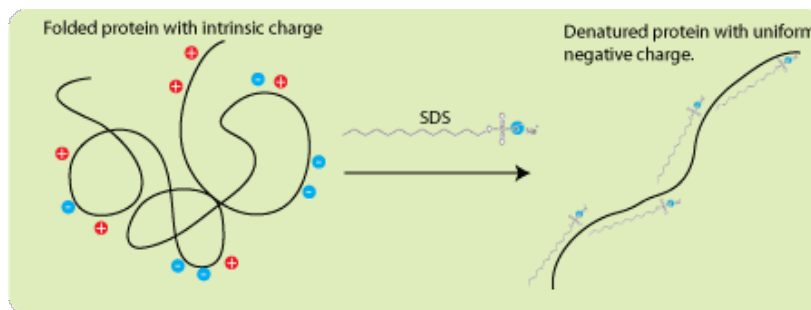
21. Ακολουθεί περαιτέρω καθαρισμός με HPLC και διπλή λυοφιλοποίηση της πρωτεΐνης.

Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

Η στατική φάση (HPLC στήλη), η οποία είναι μη πολική, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό. Οι διαλύτες των μιγμάτων αυτών πρέπει απαραίτητως να είναι αναμίξιμοι. Ξεκινώντας εξισορροπείται η κολόνα, ώστε να είναι ομοιόμορφη η κατανομή του διαλύτη και σταθερή η πίεση. Αρχικά έχει 95% H₂O (διαλύτης Α) και 5% οργανικό διαλύτη (διαλύτης Β). Αυξάνεται σταδιακά το ποσοστό του οργανικού διαλύτη και δημιουργείται μια διαβάθμιση στην αναλογία διαλυτών έως ότου συλληχθεί η πρωτεΐνη. Κάθε ένεση στην HPLC μπορεί να είναι **έως 25μg πρωτεΐνης**. Στα 220nm είναι η απορρόφηση του πεπτιδικού δεσμού.

Β.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

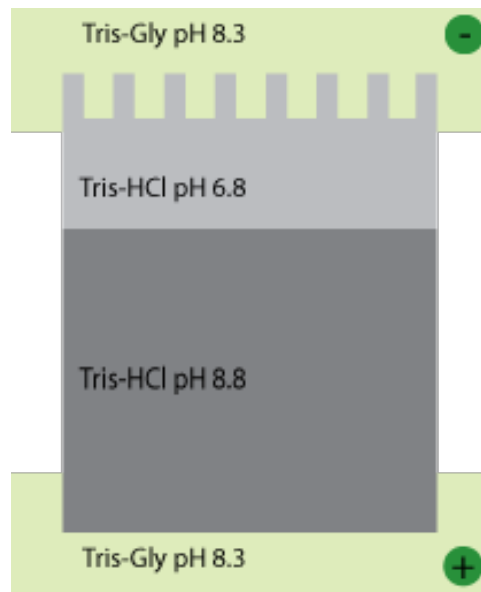
Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε διάλυμα που περιέχει μόρια πρωτεϊνών προκαλεί μετανάστευση των φορτισμένων μορίων μέσα στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση, με ταχύτητα που αντανακλά το μέγεθος και το καθαρό τους φορτίο. Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου προτιμάται διότι το υλικό είναι χημικά ουδέτερο, διάφανο και η παρασκευή της πηκτής εύκολη. Οι πόροι της πηκτής δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με το αντιδραστήριο μεθυλενο-δισακρυλαμίδιο. Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες αποδιάταξης γίνεται με έκθεση των πρωτεϊνών σε διάλυμα δωδεκακυλο-θεικού νατρίου (SDS). Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες αφού προσδεθεί στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες με σχέση μάζας 1,4g ανά g πρωτεΐνης, δημιουργώντας ηλεκτραρνητικά σύμπλοκα. Συνεπώς όλες οι πρωτεΐνες ανεξάρτητα από την αλληλουχία των αμινοξέων τους θα φορτιστούν αρνητικά.



Εικ.2.3: Αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής πρωτεΐνης με τη χρήση SDS (119).

Η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης και ο βρασμός στους 95°C ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και συμβάλλει στην δημιουργία συνθηκών αποδιάταξης έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να κινούνται με βάση τη μάζα τους. Ωστόσο, υπάρχουν και πρωτόκολλα στα οποία έχουμε μη αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. ΖΥΜΟΓΡΑΦΙΑ). Σε αυτά δεν προστίθεται στο διάλυμα φόρτωσης μερκαπτοαιθανόλη και δεν βράζονται τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Η σχετική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου χρησιμοποιείται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση διαλύματος πρωτεϊνών καθώς και για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σύστημα διπλής πήκτης, που εισήγαγε το 1970 ο Laemmli, το οποίο στηρίζεται στη διαφορά pH. Το δείγμα εισέρχεται στο πρώτο πήκτωμα, γνωστό ως πήκτωμα επιστοίβαξης, το οποίο έχει χαμηλό pH 6.8 και μικρή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο και στη συνέχεια κινείται στο δεύτερο πήκτωμα, γνωστό και ως πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο έχει υψηλότερο pH 8.8. Οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται κατά τη κίνηση τους στο πρώτο πήκτωμα και διαχωρίζονται στο δεύτερο σε ζώνες. Το υπερθειικό αμμώνιο (APS) που προκαλεί ελεύθερες ρίζες και ο καταλύτης N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED) που καταλύει τη μετάδοση ελεύθερων ριζών διευκολύνουν την αντίδραση του πολυμερισμού.



Εικ.2.4: Σχηματική απεικόνιση πήκτώματος πολυακρυλαμίδιου (119).

Υλικά και όργανα

- ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (Tris 0.5M, pH6.8, 0,04% SDS)
- ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Tris-HCl 1.5M, pH8.8, 0,04% SDS)
- ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x running buffer:15g/L Tris, 72g/L γλυκίνη, 5g/L SDS)
- αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης 5X (0,3 M Tris-HCl pH6.8, 10% w/v SDS, 50%v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη)

- ακρυλαμίδιο (BIORAD)
- APS, 10% (10 g NH₄SO₈ σε 100ml δισαπεσταγμένο H₂O)
- TEMED (Appli-chem)
- απιονισμένο H₂O
- εκμαγείο και χτένες (BIORAD)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIORAD)
- βαφή Coomassie Blue (3g Coomassie R250, 480 ml μεθανόλη, 100ml οξικό οξύ, 420ml H₂O)
- διάλυμα αποχρωματισμού (450ml μεθανόλη,450ml H₂O ,100ml οξικό οξύ)

Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους δείγματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) γίνεται με χρήση μάρτυρα που δίνει μπάντες γνωστών μοριακών βαρών. Η % περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο της πηκτής διαχωρισμού εξαρτάται από το μέγεθος που αναμένεται να έχει η προς ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνη.

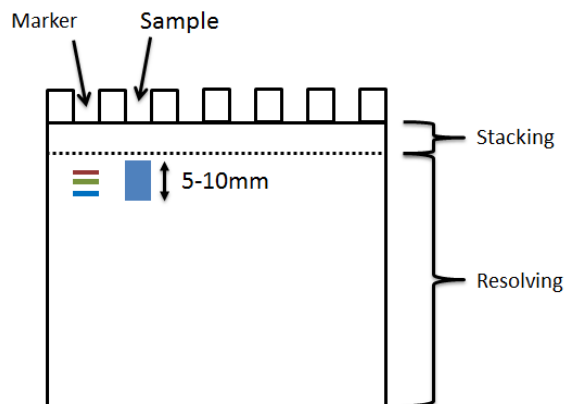
Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας και τοποθετείται σε εκμαγείο μέχρι συγκεκριμένο ύψος, ενώ το υπόλοιπο συμπληρώνεται με νερό (Πίν. 2). Τον πολυμερισμό της πηκτής διαχωρισμού ακολουθεί η παρασκευή της πηκτής επιστοιβάξης (Πίνακας 3). Το νερό απομακρύνεται από το εκμαγείο και με πιπέτα τοποθετείται το διάλυμα της πηκτής επιστοιβάξης πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και ενσωματώνεται χτένα για το σχηματισμό φρεατίων. Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοιβάξης, αφαιρείται η χτένα και μεταφέρεται η πηκτή σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με x1 ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ				
% acrylamide	<8 %	10%	12%	16%
Μέγεθος πρωτεΐνης MW Range(kDa)	>70	30-100	15-50	<30
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού	1,25ml	1,25ml	1,25ml	1,25ml
Ακρυλαμίδιο 40%	1ml	1,2ml	1,5ml	2666ml
Απιονισμένο H₂O	2,7ml	2,5ml	2,2ml	1045ml
APS 10%	50ul	50ul	50ul	50ul
TEMED	5ul	5ul	5ul	5ul

Πίνακας 2.1: πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel)

ΠΗΚΤΗ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ	
% acrylamide	4,5
Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης	1ml
Ακρυλαμίδιο 40%	0,45ml
Απιονισμένο H₂O	2,55ml
APS 10%	30ul
TEMED	5ul

Πίνακας 2.2: πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel)



Εικ.2.5: Φόρτωση δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Οι πρωτεΐνες μετά από ανάμιξη με το διάλυμα φόρτωσης και εφόσον το πρωτόκολλο απαιτεί αποδιατακτικές συνθήκες υφίστανται θερμική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα και ο μάρτυρας εισάγονται στα φρεάτια του πηκτώματος και το ρεύμα, 120 V, αναγκάζει τα ηλεκτραρνητικά σύμπλοκα SDS – πρωτεΐνης να κινηθούν προς την άνοδο που βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής. Ακολουθεί χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue R-250 για 30 λεπτά και αποχρωματισμός με το αντίστοιχο διάλυμα, έως ότου φαίνονται καθαρά οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Για ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων γίνεται σάρωση σε σαρωτή και ανάλυση με το λογισμικό IMAGE J. (βλ. κεφ. B3 & B7).

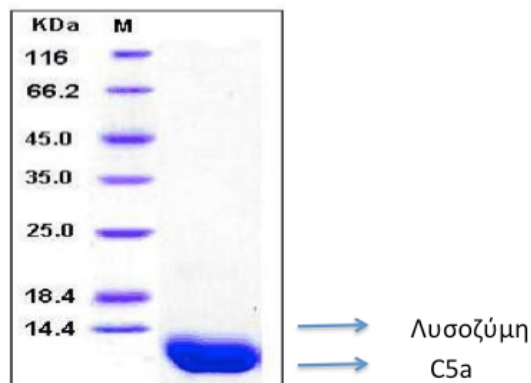
B.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Πολύ συχνά σε πειραματικά πρωτόκολλα (π.χ. καθαρισμός C5a, ζυμογραφία κ.ά.) απαιτείται για ένα δείγμα, εκτός από τον ποιοτικό, ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης που μελετάται. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης σε δείγμα γίνεται με δύο τρόπους.

- Βάσει πρότυπης καμπύλης ουσίας με γνωστή συγκέντρωση.
- Φωτομετρική μέθοδο.

B.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης C5a βάσει προτύπου καμπύλης βαθμίδωσης συγκέντρωσης

Η λυσοζύμη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 14,3 kDa. Το C5a έχει μοριακό βάρος που υπολογίζεται στα 11 kDa. Σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζονται σε πολύ κοντινές ζώνες, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικ.2.6: Ζώνες ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.Οι πρωτεϊνικές μπάντες μετακινούνται αντιστρόφως ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης.Η ηλεκτροφορητική μπάντα του C5a είναι πολύ κοντά σε αυτή της λυσοζύμης (120).

Για το λόγο αυτό η λυσοζύμη μπορεί να χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για σύγκριση με την μπάντα του C5a.Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων και με ανάλυση στο πρόγραμμα IMAGE J να υπολογιστεί η συγκέντρωση του C5a στο δείγμα που μελετάται.

Υλικά και Όργανα

- Διάλυμα Λυσοζύμης $c=1\text{mg/ml}$.
- Υλικά και όργανα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών βλ.αντίστοιχο κεφάλαιο.
- Η/Υ με εγκατεστημένο το πρόγραμμα IMAGE J.
- Σαρωτής για σάρωση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου.

Πειραματικό πρωτόκολλο

1.Παρασκευή πηκτώματος 16% για ηλεκτροφόρηση

2.Προετοιμασία δειγμάτων λυσοζύμης stock $c=1\text{mg/ml}$ και δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης σε αναγωγικές συνθήκες.Επιλέγεται η ποσότητα των δειγμάτων λυσοζύμης έτσι ώστε να βρεθεί εντός καμπύλης το άγνωστο δείγμα.Παρακάτω παρουσιάζεται ένας ενδεικτικός τρόπος παρασκευής των δειγμάτων.

ΠΗΓΑΔΑΚΙ	ΔΕΙΓΜΑ	W _{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ} (μg)	V _{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ} (μL)	VH ₂ O (μL)	V _{LOADING DYE} (μL)	V _{ΤΕΛ} (μL)
1	ΛΥΣΟΖΥΜΗ	5	5	7	3	15
2	>>	4	4	8	3	15
3	>>	3	3	9	3	15
4	>>	2	10 _(αρ. 1:5)	2	3	15
5	>>	1	10 _(αρ. 1:10)	2	3	15
6	>>	0.5	5 _(αρ. 1:10)	7	3	15
7	KENO					
8	C5a stock	?	5	7	3	15
9	C5a HPLC	?	2	10	3	15

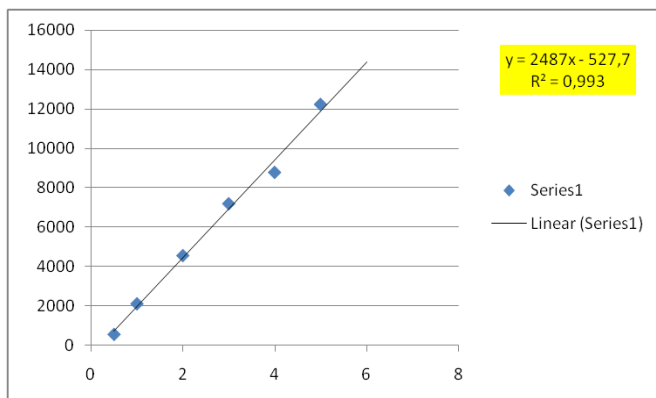
3.Θερμική αποδιάταξη στους 95⁰C (thermoblock) .

4.Φόρτωση και ηλεκτροφόρηση σε 95-120 V μέχρι η χρωστική να φτάσει στο τέλος του ηηκτώματος.

5. Χρώση της ηηκτής με Coomassie Blue.

6. Αποχρωματισμός με Destain Buffer.

7.Ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα IMAGE J. Το πρόγραμμα IMAGE J ποσοτικοποιεί την ένταση κάθε ζώνης στο ηηκτώμα,η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του δείγματος.Έτσι με βάση την πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται (γραμμική συνάρτηση) και δεδομένης της έντασης της μπάντας του αγνώστου δείγματος υπολογίζεται η συγκέντρωση του C5a σε αυτό. Στη συνέχεια παρουσιάζεται μια ενδεικτική πρότυπη καμπύλη λυσοζύμης, όπως προκύπτει μετά από ανάλυση στο πρόγραμμα IMAGE J.



ug lysozyme band intensity

6

5

12.223

4

8.771

3

7.183

2

4.549

1

2.105

0,5

551

C5a

13.716 outside curve

C5a

7.272

Βλέπουμε ότι στο άγνωστο δείγμα C5a που είναι εντός καμπύλης (2^ο) η ένταση της μπάντας είναι 7272.Βάσει της εξίσωσης προκύπτει ότι σε 3μl δείγματος περιέχονται 3,136μg C5a.Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται η συγκέντρωση $C_{C5a} \approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 1 \text{mg}/\text{ml}$. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω παράδειγμα υπάρχει περίπτωση σε μεγάλη συγκέντρωση πρωτεΐνης να μην είναι δυνατό να υπολογιστεί με αυτό τον τρόπο,διότι μπορεί να φορτωθεί περιορισμένη ποσότητα στο ηηκτώμα.Τότε επιλέγεται η φωτομετρική μέθοδος.

B.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης C5a με φωτομετρική μέθοδο.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του C5a πραγματοποιείται μετρώντας την οπτική απορρόφηση του σε μήκος κύματος 280nm (λ όπου μετράται η OD των πρωτεϊνών).

Το πεπτίδιο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Ex Pasy-protein sequence + 6 aa His + στοιχεία του φορέα PQE30 που εκφράζονται) έχει συντελεστή απόσβεσης $\epsilon=0.423$ (βλ. νόμος Lambert-Beer)

$$C_{C5a} = OD_{280nm} / \epsilon \text{ mg/ml}$$

Υλικά και όργανα

- Δείγμα προς φωτομέτρηση (π.χ. C5a σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS)
- Τυφλό δείγμα για μηδενισμό του φωτομέτρου.
- Φωτόμετρο UV-1800 SIMADZU με φίλτρο για 280nm.
- Κυβέτες χαλαζία (εργαστήριο Δρ.Λιβανίου).

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Ρύθμιση του φωτομέτρου σε $\lambda=280$ nm.
2. Οι κυβέτες καθαρίζονται πάρα πολύ προσεκτικά με νερό και αιθανόλη ! Είναι σημαντικό τα παραθυράκια από όπου περνά η δέσμη φωτός να είναι διαυγή.
3. Μηδενίζεται το φωτόμετρο με το τυφλό.
4. Δείγμα 100 μl εισάγεται με τη βοήθεια πιπέτας στη σχισμή της κυβέτας με προσοχή να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.Επειδή θέλουμε η τιμή που θα πάρουμε να μην υπερβαίνει το 1 αραιώνεται το δείγμα (1/10 αραιώση).
5. Λήψη οπτικής απορρόφησης OD_{280nm} C5a (1:10) .Υπολογισμός συγκέντρωσης βάσει του νόμου Lambert-Beer.

B.4 Συγκέντρωση διαλύματος πρωτεΐνης με φίλτρο

Πολλές φορές η ποσότητα της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα δεν είναι εύκολα ανιχνεύσιμη,ειδικά αν πρόκειται για μικρά πεπτίδια.Επίσης πολύ αραιωμένα δείγματα πεπτιδίων της τάξης μεγέθους αναφυλατοξινών ή κυτοκινών είναι αδύνατο να συντηρηθούν στους -80°C και τείνουν να προσκολλώνται στα τοιχώματα του πλαστικού υλικού των σωληναρίων.

Για τη φύλαξη ή χρήση των δειγμάτων σε πειραματικά πρωτόκολλα, πολλές φορές συγκεντρώνεται η πρωτεΐνη σε μικρότερο όγκο.Χρησιμοποιούνται ειδικά σωληνάκια, μεγέθους αναλόγου του αρχικού όγκου του δείγματος, που φέρουν απορροφητική μικροπλάκα διαπερατότητας ανάλογης με το μέγεθος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να συγκεντρωθεί.

Στα πειραματικά πρωτόκολλα της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια με φίλτρο για πρωτεΐνες ~30 kDa.

Υλικά και Όργανα

- Σωληνάριο χωρητικότητας 15ml με φίλτρο 30000MWCO (AMICON-Millipore).
- Φυγόκεντρος με δυνατότητα ψύξης στους 4°C.
- Ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline ,PBS: σε 1L απεσταγμένο νερό διαλύονται 8.5 g NaCl, 2,27 g Na₂HPO₄, 0.47 g NaH₂PO₄, ρύθμιση pH 7.4)
- Απεσταγμένο H₂O
- Διάλυμα Sodium Azide (NaN₃) 0,02% σε PBS

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Τα σωληνάρια εξισορροπούνται με απεσταγμένο H₂O (φυγοκέντρωση στους 4°C 3500 rpm για 20min) και στη συνέχεια με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
2. Απόρριψη του PBS που δεν πέρασε από το φίλτρο και προσθήκη του δείγματος της πρωτεΐνης το οποίο είναι συνεχώς σε πάγο.
3. Φυγοκέντρωση σε 3500 rpm για 30min στους 4°C και απόρριψη του υγρού που περνά από το φίλτρο.Επανάληψη έως ότου φτάσουμε τον επιθυμητό όγκο (συνήθως γίνεται συγκέντρωση 10X).
4. Φύλαξη δείγματος στους -80°C.
5. Αφού τελειώσουν οι φυγοκεντρήσεις στο σωληνάριο προστίθεται PBS και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στους 4°C για 30'. Αφαίρεση του PBS που πέρασε και προσθήκη PBS & Sodium Azide 0,02% (πρόκειται για αντιμικροβιακό διάλυμα που δεν επηρεάζει τις πρωτεΐνες) .Φύλαξη του σωληναρίου στους 4°C.

B.5 Έλεγχος ενεργότητας C5a μέσω δοκιμασίας αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT)

Η ενδοκυτταρική παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος (O₂⁻) ονομάζεται και αναπνευστική έκρηξη.Το NBT είναι μια κίτρινη,υδατοδιαλυτή χρωστική, η οποία έχει την ικανότητα να αντιδρά με τα κυτταρικά υπεροξειδικά ανιόντα προς σχηματισμό παραγώγων φορμαζανίου στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία έχουν μπλε χρώμα και προσδιορίζονται εύκολα σε οπτικό μικροσκόπιο.

Με τη δοκιμασία αυτή ελέγχεται η ενεργότητα του πεπτιδίου C5a που απομονώθηκε με καθαρισμό από καλλιέργεια βακτηρίων,ώστε να χρησιμοποιηθεί στα πειραματικά πρωτόκολλα.Ελέγχεται δηλαδή η ικανότητά του να προκαλεί οξειδωτικό stress που οδηγεί σε απόπτωση σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα του. Χρησιμοποιήθηκαν ουδετερόφιλα

και η κυτταρική σειρά Raw 264 (μακροφάγα ποντικού που καλλιεργούνται στο εργαστήριο). Σαν θετικός μάρτυρας, εκτός από τους κλασσικούς που αναφέρονται στα υλικά χρησιμοποιήθηκε και η *προθυμοσίνη-α*, καθώς είναι γνωστό από άλλες μελέτες ότι δίνει θετική αντίδραση NBT.

Υλικά και Όργανα

- Στείρο Διάλυμα EDTA/PBS 10mM για αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα.
- Διάλυμα HBSS (Hanks Balanced Salt Solution w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} and Phenol Red-BIOCHROM)
- Διάλυμα διαχωρισμού στιβάδων αίματος (Ficoll Histopaque 11191 -BIOCHROM)
- Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων 1X σε δις ή τρις απεσταγμένο νερό
Για 10X Lysis Buffer for erythrocytes(σε 2X ή 3X Distilled water):0,37% w/v EDTA, 8,02% w/v NH_4Cl , 0,84% w/v $NaHCO_3$
- Διάλυμα HBSS εμπλουτισμένο με 0,1% ζελατίνη(βοηθά στη μονιμοποίηση των κυττάρων).
- Διάλυμα PMA με συγκέντρωση 200 ng/ml (*PC1 :Phorbol myristate acetate φορβολικός μεθυλεστέρας-πολύ ισχυρή ενεργοποίηση NF-κB*)
- Διάλυμα fMLP σε HBSS-g με συγκέντρωση 5 μ M. (*PC2-macrophage activator δραστικότητα ~3X C5a*)
- Διάλυμα NBT (Nitro Blue Tetrazolium -Sigma Aldrich) σε HBSS-g με συγκέντρωση 500 ng/ml. Φύλαξη στο ψυγείο ως τη χρήση.
($C_{stock}=10mg/ml$, αραιώση $\times 5$: $2mg/ml$ η συγκέντρωση που δουλεύουμε –το diluted stock διατηρείται από 3-6μήνες στους $-20^{\circ}C$)
- Διάλυμα PFA (παραφορμαλδεΐδη) σε HBSS με τελική συγκέντρωση 4%.
- C5a peptide σε συγκεντρώσεις 1nM, 10nM, 100nM *.
- Κυτταρικό εναιώρημα Raw & Ουδετεροφίλων σε συγκεντρωση 2×10^6 cells/ml.
- Φυγόκεντρος.
- Υλικά για καλλιέργεια και μέτρηση κυττάρων βλ.κεφ.Β.6

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Α.Ρύθμιση συγκέντρωσης των υπό μελέτη κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS-gelatin.

Απομόνωση ουδετεροφίλων (κοκκιοκυττάρων).

1. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 40%-60% των λευκοκυττάρων του αίματος,είναι ο πολυπληθέστερος υποπληθυσμός των κοκκιοκυττάρων.Μετά από επιστίβαση σε διάλυμα διαχωρισμού λευκοκυττάρων (Ficoll Histopaque) και φυγοκέντρωση,τα ουδετερόφιλα καθιζάνουν στον πυθμένα του σωληναρίου μαζί με τα ερυθροκύτταρα.Για την απομόνωσή τους πραγματοποιείται λύση των ερυθρών.
2. Αιμοληψία σε σωληνάριο 10ml με αντιπηκτικό λεπιρουδίνη (δότης Δρ.Γ.Σφυρόερα).
3. Επιστίβαση: σε σωληνάριο falcon tube 50ml προστίθενται 5ml φικόλλης.Στη συνέχεια προστίθεται το αίμα στην επιφάνεια του διαλύματος απαλά με τέτοιο τρόπο,ώστε να μην αναδευτεί καθόλου με τη φικόλλη, αλλά να δημιουργηθεί μια στιβάδα.

4. Φυγοκέντρηση χωρίς φρένο σε 2000rpm ,RT, 20' .
5. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται οι ακόλουθες στιβάδες (από πάνω προς τον πυθμένα) : πλάσμα/μονοκύτταρα/φικόλη/ερυθροκύτταρα/κοκκιοκύτταρα.
6. Σε σωληνάριο falcon tube των 50ml προστίθενται 50ml 1x Lysis buffer for RBC και 2ml από το ίζημα ερυθρών/κοκκιοκυττάρων.(αρχικά χρησιμοποιούνται 2 tube για όλο το ίζημα)
7. Το μίγμα αναδεύεται με ημικυκλική κίνηση για 10'.
8. Φυγοκέντρηση 1100 rpm στους 4⁰C.Απόρριψη του υπερκειμένου.Επαναιώρηση σε 10ml HBSS (5+5 ml ένωση εναιωρημάτων σε 1 tube).
9. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος X2 για να πλυθούν τα κύτταρα και να απομακρυνθούν όσο δυνατόν περισσότερο τα ερυθρά.
10. Μετά τις πλύσεις επαναιωρείται το τελικό ίζημα σε 1ml HBSS.
11. Τα κύτταρα ελέγχονται για βιωσιμότητα και μετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer ώστε να ρυθμιστεί η συγκέντρωσή τους στην επιθυμητή για το NBT assay 2×10^6 cells/ml. Το Trypan blue βάφει τα νεκρά κύτταρα μπλε. Βέλτιστη βιωσιμότητα κυττάρων 100%.

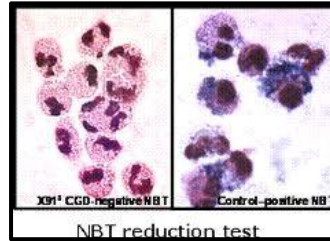
Raw κύτταρα

1. Τα Raw καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM+ 10% FBS+ 1%Glutamine (βλ.ΚΕΦ Β.6 κυτταροκαλλιέργειες) και η αποκόλληση των κυττάρων έγινε από φλάσκα 175cm² χρησιμοποιώντας αντί θρυψίνης PBS/EDTA(10mM).
2. Προστίθεται θρεπτικό για απενεργοποίηση της θρυψίνης, που είναι τοξική.
3. Φυγοκέντρηση στις 1100 rpm για 5'. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και ανασύσταση σε θρεπτικό 3ml.
4. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο. Ρυθμίζεται η συγκέντρωση στα 2×10^6 cells/ml.

Β.Αντίδραση

1. Σε σωληνάρια erpendorf που περιέχουν 25 μL NBT και τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του C5a **1 nM, 10 nM και 100 nM** * ή τους θετικούς μάρτυρες fMLP , PMA, prothymosin-α προστίθενται 50μL κυτταρικού εναιωρήματος (Raw/Neutrophils). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 100μL. Αποφεύγεται η ανάδευση σε συσκευή περιδύνησης (vortex) γιατί ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα .
***Τα πεπτίδια είναι συγκεντρωμένα 10X γιατί γίνεται αραιώση 10 φορές όταν προστίθενται στον τελικό όγκο της αντίδρασης που είναι 100μl. Οι υπολογισμοί γίνονται βάσει του νόμου των αραιώσεων $c_1V_1=c_2V_2$*
2. Τα δείγματα επωάζονται 10' ακριβώς στους 37⁰C, έπειτα 10' σε RT και ακολουθεί μονιμοποίηση με PFA (παραφορμαλδεΰδη) 4% σε HBSS-g στο ψυγείο.
3. Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5' στους 5⁰C. Επαναιώρηση κυτταρικών ιζημάτων σε 50μl.

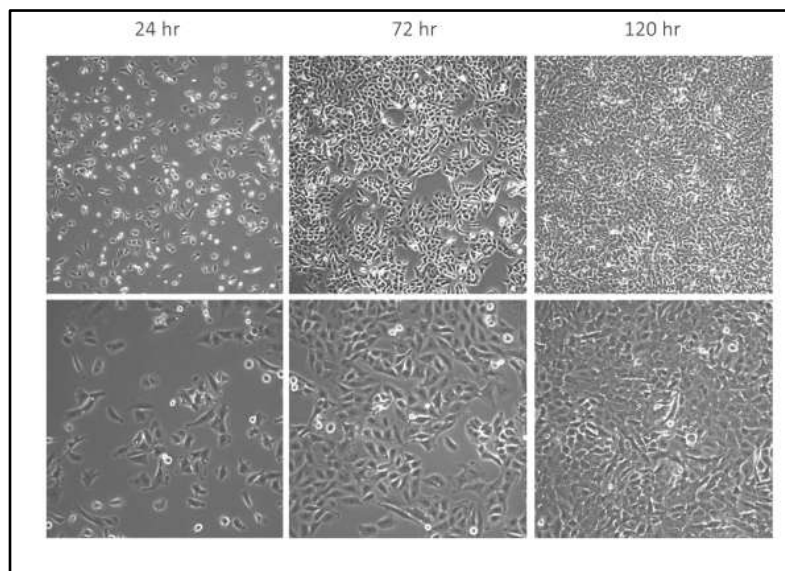
4. Έλεγχος στο μικροσκόπιο της παρουσίας μπλε κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά φέρουν ενδοκυττάριας εναποθέσεις φορμαζανίου στο εσωτερικό τους και θεωρούνται θετικά λόγω της αναγωγής του NBT από τα κυτταρικά ανιόντα υπεροξειδίου, τα οποία παράγονται σε οξειδωτικό stress. βλ. εικ. 2.7.



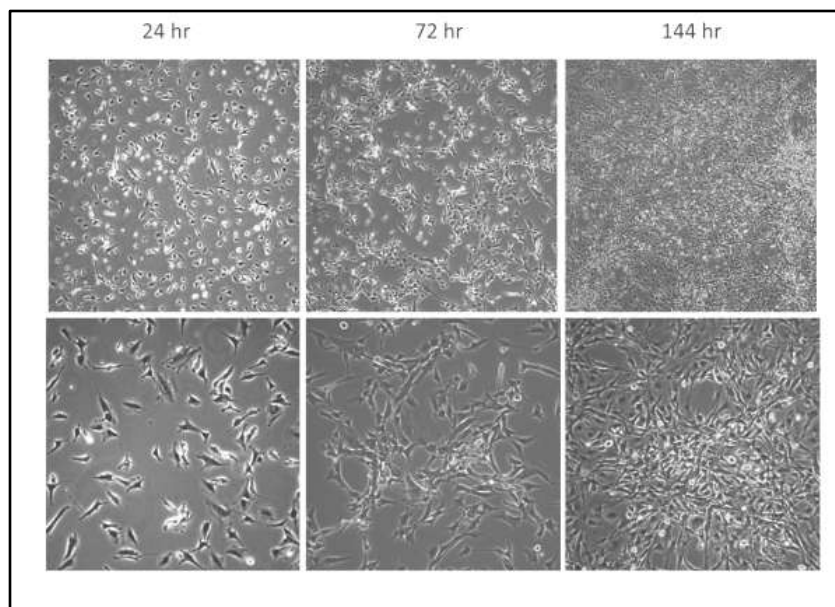
Εικ.2.7: Δοκιμασία NBT. Δεξιά απεικονίζεται η θετική αντίδραση.

B.6 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος U87MG, T98G in vitro

Για τη διεξαγωγή πειραμάτων σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος in vitro χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές ανθρωπίνων ιστών της ATCC. Οι σειρές αυτές ήταν κυρίως οι **U87MG** (γλοιοβλάστωμα –αστροκύττωμα βαθμού IV κατά WHO) και **T98G** (πολύμορφο γλοιοβλάστωμα). Τα κύτταρα είναι προσκολλώμενα σε υπόστρωμα και καλλιεργήθηκαν πρώτη φορά στο U-Penn. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων, όπως παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, σε συνθήκες καλλιέργειας σε φλάσκα πολυστυρενίου.



Εικ.2.8: Μικροφωτογραφία από κύτταρα **T98G** σε διάφορα χρονικά σημεία από την έναρξη της καλλιέργειας (3×10^4 κύτταρα/cm²) (121)



Εικ. 2.9: Μικροφωτογραφία από κύτταρα **U-87 MG** σε διάφορα χρονικά σημεία από την έναρξη της καλλιέργειας με πυκνότητα 4×10^4 κύτταρα/cm² (122)

B.6.1 Βασικές τεχνικές καλλιέργειας κυττάρων in vitro

Οι παρακάτω χειρισμοί εφαρμόζονται σε όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα και γίνονται σε στείρες συνθήκες, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow Hood-BIOAIR safemate 1.2). Ακολουθούνται όλοι οι κανόνες εργασίας και χειρισμών σε ασηπτικό περιβάλλον ενώ όλα τα υλικά και τα όργανα αποστειρώνονται πριν τη χρήση (123, 124).

ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΥΓΡΟ N₂

Υλικά και Όργανα

- Φλάσκες πολυστυρενίου 25 cm² με φίλτρο (Greiner)
- Πιπέτες στείρες 1ml, 5ml (Greiner)
- Πιπέττα καλλιερειών Maxi-Pette (Greiner)
- Θρεπτικό μέσο DMEM w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (BIOCHROM)
- Αντιβιοτικά Penicillin/Streptomycin (BIOCHROM)
- Βόειος εμβρυικός ορός –Fetal Bovine Serum (GIBCO)*
- L-Γλουταμίνη 200mM -low endotoxin (BIOCHROM)
- Αποστειρωμένο PBS με pH 7,2-7,4
- Στείρα μπουκάλια φύλαξης θρεπτικού μέσου
- Υδατόλουτρο
- Επωαστικός κλίβανος (ρυθμίσεις θ= 37⁰C ,παροχή CO₂ =5%) (Smartcell-Healforce)

**Ο ορός υφίσταται θερμική αδρανοποίηση στους 56°C για 1h προτού χρησιμοποιηθεί. Η διαδικασία αυτή εξουδετερώνει τη δράση πρωτεϊνών του συμπληρώματος που μπορεί να εμπεριέχονται στον ορό, καθώς και ενζύμων π.χ. πρωτεασών που θα μπορούσαν να αποδομήσουν το C5a και να επηρεάσουν τα πειράματα.*

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Ρύθμιση του υδατόλουτρου σε θερμοκρασία 37°C.
2. Κατά το άνοιγμα του DMEM προστίθενται 1% αντιβιοτικά. Παρασκευή θρεπτικού μέσου περιεκτικότητας 10% FBS και 1% glutamin σε στείρο μπουκάλι.
3. Τα κύτταρα φυλάσσονται στο υγρό N₂ σε ειδικά κρυοφιαλίδια ,σε μίγμα θρεπτικού μέσου με DMSO (βλ.φύλαξη κυττάρων σε υγρό N₂).Μετά την απομάκρυνση από το υγρό N₂ εμβαπτίζονται απευθείας στο υδατόλουτρο μέχρις ότου να επανακτήσουν τη μορφή υγρού εναιωρήματος.
4. Με στείρα πιπέτα μεταφέρεται το αποψυγμένο εναιώρημα των κυττάρων σε μικρή φλάσκα που περιέχει προθερμασμένο θρεπτικό μέσο.Τα κύτταρα τοποθετούνται οριζοντίως στον κλίβανο.Επώαση για μια ημέρα,ώστε να κολλήσουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας.
5. Την επόμενη μέρα ελέγχεται η βιωσιμότητα των κυττάρων στο μικροσκόπιο.Τα νεκρά κύτταρα δεν προσκολλώνται στην επιφάνεια και εμφανίζονται ως αιωρούμενα στο θρεπτικό μέσο.
6. Απομακρύνεται το θρεπτικό με τα νεκρά κύτταρα ,γίνεται 3 φορές πλύση των κυττάρων με στείρο PBS και προστίθεται νέο θρεπτικό με 10% ορό. Επώαση στον κλίβανο έως ότου τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας.

ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν για περιορισμένο χρονικό διάστημα σε φλάσκα . Όταν καλύψουν την επιφάνειά της , λόγω του περιορισμού του χώρου και της παραγωγής τοξικών προϊόντων μεταβολισμού στο θρεπτικό, που έχει ως αποτέλεσμα και την αλλαγή του pH, πρέπει να αραιωθούν,είτε μεταφερόμενα σε μεγαλύτερη φλάσκα/σε περισσότερες ,είτε μεταφέροντας στη νέα φλάσκα μέρος μόνο των κυττάρων ,πάντα αναλόγως του σκοπού καλλιέργειάς τους.

Αμέσως μετά την απόψυξη οι σειρές αυτές έχουν έναν αργό ρυθμό ανάπτυξης . Αυτός εξαρτάται και από τον αρχικό αριθμό κυττάρων που καλλιεργούνται . Συνήθως μετά από 2 ανακαλλιέργειες τα κύτταρα μπαίνουν σε εκθετική φάση ανάπτυξης με ρυθμό διπλασιασμού περίπου 34h (122). Δεν πρόκειται για αθανатоποιημένες σειρές , ειδικά τα κύτταρα U87MG μπορούν να ανακαλλιεργηθούν έως 4-5 φορές. Λόγω γήρανσης τότε αρχίζουν να χάνουν την ικανότητα προσκόλλησης στο υπόστρωμα και δεν έχουν καλή μορφολογία, ενώ τα περισσότερα πεθαίνουν.Έτσι στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν υποστεί 3-4 ανακαλλιέργειες το πολύ.

Κατά την ανακαλλιέργεια προστίθεται στη φλάσκα υπολογισμένη ποσότητα διαλύματος Trypsin-EDTA για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Η τρυψίνη είναι ένζυμο που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς, στα πρωτεϊνικής σύστασης, μόρια προσκόλλησης που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για να παραμένουν προσκολλημένα στην βασική μεμβράνη/ειδική πλαστική επιφάνεια πολυστυρενίου της φλάσκας. Το EDTA δεσμεύει τα ιόντα Ca^{2+}/Mg^{2+} που απαιτούν οι ιντεγκρίνες για τη διατήρηση της ικανότητας προσκόλλησης με δημιουργία χηλικού συμπλόκου και έτσι αποκολλά το κύτταρο γρηγορότερα από την επιφάνεια της φλάσκας.

Ο βόειος εμβρυϊκός ορός FBS περιέχει αναστολείς πρωτεασών, κυρίως α1-αντιθρυψίνη, που αναστέλλει την πρωτεολυτική δράση της θρυψίνης. Για το λόγο αυτό πρέπει οπωσδήποτε πριν από την προσθήκη θρυψίνης να γίνεται επαρκής πλύση των κυττάρων με PBS για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ορού που θα παρεμποδίσουν τη δράση του ενζύμου. Με την προσθήκη θρεπτικού με FBS, μετά την επώαση με θρυψίνη, αποφεύγεται η επιπλέον πέψη των πρωτεϊνών επιφανείας της μεμβράνης των κυττάρων.

Υλικά και Όργανα

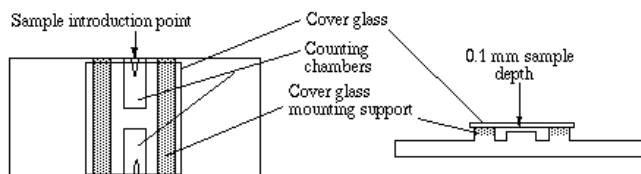
- Αποστειρωμένο PBS με pH 7,2-7,4
- Θρεπτικό μέσο DMEM με 10% ορό, 1% γλουταμίνη & αντιβιοτικά
- Φλάσκες πολυστυρενίου για καλλιέργεια κυττάρων με φίλτρο (Greiner) : υπάρχουν 2 μεγέθη, επιφανείας $75cm^2$ και $175cm^2$
- Διάλυμα αποκόλλησης κυττάρων: Trypsin /EDTA 0,05%/0,02% w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (BIOCHROM)
- Πιπέτες στείρες 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml (Greiner)
- Πιπέττα καλλιεργειών Maxi-Pette (Greiner)
- Επωαστικός κλίβανος με ρυθμίσεις θερμοκρασίας $37^{\circ}C$ και παροχής CO_2 5%

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Έλεγχος σε μικροσκόπιο της φλάσκας (ομοιόμορφη κατανομή, απουσία συσσωματωμάτων).
2. Απόρριψη υπερκειμένου καλλιέργειας.
3. Πλύση με PBS X 2-3 φορές .
4. Προσθήκη διαλύματος τρυψίνης/EDTA.Επώαση στους $37^{\circ}C$ μέχρι την αποκόλληση των κυττάρων .
5. Παρατήρηση της φλάσκας.Όταν τα κύτταρα αποκτήσουν στρογγυλό σχήμα και αιωρούνται στο θρεπτικό είναι έτοιμα για μεταφορά.Δεν πρέπει να παραμένουν με τρυψίνη πάνω από 10' γιατί ευνοείται η δημιουργία συσσωματωμάτων και μειώνεται η βιωσιμότητά τους.
6. Συλλογή κυττάρων και χώρισμα/μεταφορά τους σε φλάσκα που περιέχει νέο θρεπτικό.
7. Επώαση στον κλίβανο έως ότου τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας.

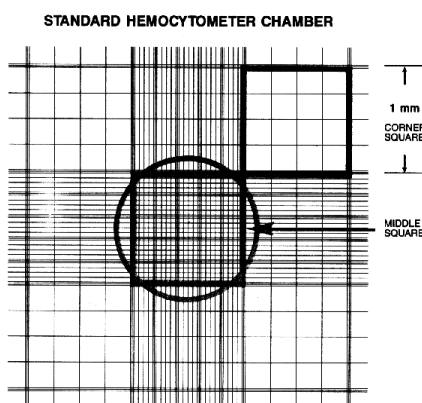
ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ

Σχεδόν σε κάθε πειραματικό πρωτόκολλο απαιτείται η ρύθμιση της συγκέντρωσης των κυττάρων. Τα κύτταρα μετρώνται σε πλάκα τύπου Neubauer (εικ.2.10), με παρατήρηση στο μικροσκόπιο .



Εικ.2.10: Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)(125)

Η πλάκα αυτή έχει επιφάνεια με τετράγωνα, στην οποία διαμορφώνονται 4 πεδία στις εξωτερικές γωνίες. Σε αυτά γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Επειδή τα κύτταρα βάφονται με χρωστική Trypan Blue, που χρωματίζει μπλε τα νεκρά, ελέγχεται έτσι παράλληλα και η βιωσιμότητα των κυττάρων.



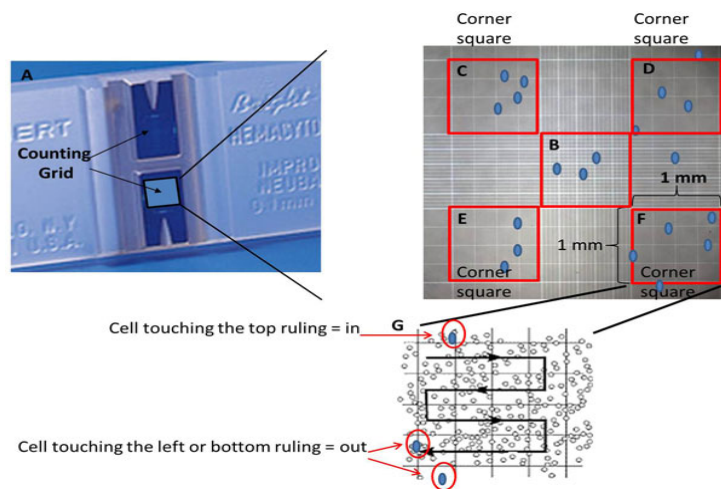
Εικ.2.11: Οπτικό πεδίο επιφανείας αιμοκυτταρόμετρου. Μετρώνται τα κύτταρα εντός των 4 τετραγώνων των εξωτερικών γωνιών (126).

Υλικά και Όργανα

- Εναιώρημα κυττάρων προς μέτρηση
- Θρεπτικό μέσο DMEM με 10% ορό, 1% γλουταμίνη & αντιβιοτικά
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss)
- Σωληνάρια 50ml με κωνική απόληξη
- Σωληνάρια 1,5 ml erpendorf
- Φυγόκεντρος Universal 320R (Hettich)
- Αιμοκυτταρόμετρο βάθους 0,1 mm (SIGMA-ALDRICH)
- Καλυπτρίδες
- Χρωστική Trypan blue
- Αυτόματες πιπέτες 2-20μl & 20-200μl και απολήξεις πιπετών

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Πλύση και αποκόλληση των κυττάρων όπως περιγράφεται στο κεφ. Ανακαλλιέργεια.
2. Μεταφορά εναιωρήματος κυττάρων σε κωνικό σωληνάριο 50ml.
3. Φυγοκέντρηση στις 1100-1200 rpm για 5'.
4. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου με πιπέτα 10ml με προσοχή ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα των κυττάρων.
5. Επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε DMEM 10% με τη βοήθεια της πιπέτας. Τα βήματα 3-4 επαναλαμβάνονται για να απομακρυνθεί η τρυψίνη, που είναι τοξική για τα κύτταρα.
6. Για τη μέτρηση η αναλογία χρωστικής Trypan blue-κυτταρικού εναιωρήματος είναι 1:10. Αν το εναιώρημα είναι πολύ πυκνό γίνεται αραιώση αυτού.
7. Τοποθετείται η καλυπτρίδα στην πλάκα μέτρησης με στεγανό τρόπο.
8. Με αυτόματη πιπέτα εισάγουμε 10 μ l ομοιογενούς διαλύματος κυτταρικού εναιωρήματος στην εσοχή της πλάκας. Λόγω τριχοειδών φαινομένων εναποτίθενται τα κύτταρα στην επιφάνεια της πλάκας.
9. Μέτρηση των κυττάρων σε 2 τουλάχιστον αντιδιαμετρικά πεδία και όχι στο κεντρικό τετράγωνο του νοητού σταυρού. Δεν προσμετρώνται κύτταρα εκτός ή στα κάτω όρια του πλαισίου των 16 τετραγώνων ή νεκρά κύτταρα (μπλε).



Εικ.2.12.: Μέτρηση κυττάρων.(119)

Διαίρεση του συνολικού αριθμού των κυττάρων δια τον αριθμό των πεδίων που μετρήθηκαν. Ο αριθμός που προκύπτει είναι η συγκέντρωση των κυττάρων:

$$C_{\text{κυττάρων}} = \# \text{ κυττάρων} \times 10^4 \text{ κύτταρα/ml εναιωρήματος}$$

Γνωρίζοντας τον όγκο του εναιωρήματός μας υπολογίζεται και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων. Ρύθμιση της συγκέντρωσης των κυττάρων στην επιθυμητή για το πειραματικό πρωτόκολλο.

ΨΥΞΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΓΡΟ N₂.

Το υγρό άζωτο είναι το τέλειο μέσο συντήρησης βιολογικών δειγμάτων για απεριόριστο χρονικό διάστημα. Ως εκ τούτου θεωρείται πολύτιμο για τη μακροχρόνια συντήρηση κυττάρων. Τα κύτταρα φυλάσσονται ιδανικά σε ειδικά κουτιά φύλαξης (cryoboxes), σε θερμοκρασία χαμηλότερη από -130 °C (φάση ατμών πάνω από το επίπεδο της στάθμης του υγρού N₂ στο δοχείο). Για μεταφορά των κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξηρός πάγος.

Τα κύτταρα φυλάσσονται υπό μορφή εναιωρήματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει DMSO 10%. Το DMSO (dimethyl-sulfoxide) είναι κρυσπροστατευτικό διάλυμα που αποτρέπει τη δημιουργία παγωμένων κρυστάλλων και την καταστροφή των μεμβρανικών δομών σε συνθήκες υπερκατάψυξης. Έτσι προστατεύεται η βιωσιμότητα των κυττάρων σε συνθήκες φύλαξης στο υγρό άζωτο. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα οπότε δεν προστίθεται απευθείας, αλλά σε διάλυμα με ορό. Για τον ίδιο λόγο της αποφυγής δημιουργίας κρυστάλλων και οσμωτικού σοκ είναι καλό τα κύτταρα να ψύχονται σταδιακά. Έτσι παραμένουν μια μέρα στους -80°C πριν τη μεταφορά τους σε ατμούς υγρού N₂ (127, 128).

Υλικά και Όργανα

- Κύτταρα σε καλλιέργεια, σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Φιάλη υγρού N₂
- Δοχείο φύλαξης βιολογικών δειγμάτων με μετακινούμενα ράφια.
- Κουτιά 81 θέσεων για φύλαξη σε υγρό N₂ (cryoboxes) Nalgene
- Φιαλίδια χωρητικότητας 1ml με βιδωτό πώμα για φύλαξη κυττάρων (Cryovials - Greiner)
- Σωληνάρια 50ml με κωνική απόληξη (Greiner)
- Αποστειρωμένο PBS με pH 7,2-7,4
- Θρεπτικό μέσο DMEM με 10% ορό, 1% γλουταμίνη & αντιβιοτικά
- Διάλυμα Trypsin /EDTA (BIOCHROM)
- Πιπέτες στείρες 1ml, 2ml, 5ml, 10ml (Greiner)
- Στείρο διάλυμα DMSO.
- Καταψύκτης -80°C

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Πλύση με PBS, αποκόλληση με θρυψίνη, απενεργοποίηση της θρυψίνης και φυγοκέντρηση των κυττάρων που πρόκειται να καταψυχθούν.
2. Με πολλή προσοχή αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται θρεπτικό. Τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται και φυγοκεντρούνται ξανά. Η πλύση είναι απαραίτητη για να αφαιρεθεί όλη η θρυψίνη από το εναιώρημα των κυττάρων που θα παγωθούν.
3. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο. Επιθυμητή συγκέντρωση των κυττάρων είναι 1X10⁶ κύτταρα/ml. Ρυθμίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων.
4. Στα vials αναγράφονται στοιχεία και ημερομηνία φύλαξης της κυτταρικής σειράς.

5. Προσθήκη με σύριγγα 100μl DMSO στα cryovials. Προσθήκη στη συνέχεια 900 μl κυττάρων (10% αναλογία με θρεπτικό).
6. Τα κύτταρα μεταφέρονται γρήγορα στους -80°C , όπου παραμένουν για 24h και στη συνέχεια αρχειοθετούνται σε κουτιά στο υγρό N_2 . Σημειώνεται πάντα η θέση των κυττάρων στο κουτί και ο αριθμός των vials, ενώ ελέγχεται και η στάθμη του N_2 .

ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΣΕ ΠΗΓΗ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ

Σε κάποια πειράματα της εργασίας αυτής, μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολήσης σε συνδυασμό με την επώαση με C5a . Έγινε ακτινοβολήση σε πιάτα ή φλάσκες και ακολούθησε επώαση ή συλλογή του υπερκειμένου των καλλιιεργειών.

Για την ακτινοβολήση χρησιμοποιήθηκε γ-ακτινοβολητής Gamma Cell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd. Ottawa, Canada), με πηγή κοβαλτίου Co-60 .



Εικ 2.13: Ακτινοβολητής πηγής κοβαλτίου(129).

Αναλόγως του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν διάφορες δόσεις ακτινοβολήσης της κλίμακας Gray. Πάντοτε η ακτινοβολήση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με ρυθμό δόσης 30 cGy /min . Έτσι για δόση 1Gy παραμένουν τα κύτταρα στην πηγή για 3 λεπτά. Για πειράματα διαδοχικά αυξανόμενων δόσεων ακτινοβολήσης η κλίμακα είναι το 1Gy . Δεν χρησιμοποιήθηκαν ενδιάμεσες δόσεις.

B.6.2 Δοκιμασία Επιβίωσης Κλώνων (CLONOGENIC ASSAY)

Η δοκιμασία επιβίωσης κλώνων είναι μια δοκιμασία επιβίωσης κυττάρων στην οποία ελέγχεται η δυνατότητα δημιουργίας ενός κλώνου (αποικίας) από ένα μεμονωμένο κύτταρο. Ελέγχεται δηλαδή η ικανότητα κάθε μεμονωμένου κυττάρου ενός πληθυσμού να υφίσταται απεριόριστες διαιρέσεις . Ως κλώνος ορίζεται μια αποικία κυττάρων που αποτελείται τουλάχιστον από 50 κύτταρα . Είναι ενδεδειγμένη δοκιμασία για ποσοτική μελέτη της ικανότητας επιβίωσης των κυττάρων μετά από επίδραση με ιονίζουσα ακτινοβολία ή με άλλους κυτταροτοξικούς παράγοντες . Μόνο ένα μέρος των κυττάρων που έχουν στρωθεί θα διατηρεί την ικανότητα διαίρεσης και παραγωγής αποικιών . Μετά την επίδραση με ακτινοβολία ή με άλλο παράγοντα τα κύτταρα επώάζονται για διάστημα 10-15 ημερών . Οι αποικίες-κλώνοι που δημιουργούνται μονιμοποιούνται με διάλυμα μεθανόλης-οξικού οξέος και βάφονται με crystal violet (0.5% w/v) .

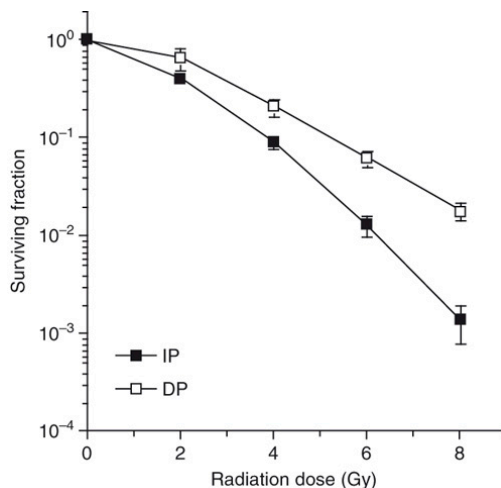
Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης της δοκιμασίας:

- Η καταμέτρηση κλώνων με παρατήρηση στο οπτικό στερεομικροσκόπιο και ανάλυση με βάση καμπύλες επιβίωσης- δόσης ακτινοβολίας. Ο αριθμός των κλώνων που μετρώνται μετά από την επίδραση με κυτταροτοξικό παράγοντα στα κύτταρα, εκφράζεται σε συνάρτηση με την αποτελεσματικότητα της σποράς (PE: plating efficiency= κλάσμα # κλώνων/# κυττάρων που έχουν στρωθεί Χ100%) και καλείται κλάσμα επιβίωσης (surviving fraction SF):

ΚΛΑΣΜΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ= # Κλώνων μετά από επίδραση με κυτταροτοξικό παράγοντα

κυττάρων σποράς Χ συντελεστή PE

Παρακάτω φαίνεται μια ενδεικτική εικόνα καμπύλης επιβίωσης συναρτήσει της δόσης ιονίζουσας ακτινοβολίας για κύτταρα γλοιοβλαστώματος.



Εικ.2.14: Καμπύλες επιβίωσης κυττάρων γλοιοβλαστώματος μετά από ακτινοβολία. Τα σύμβολα αφορούν σπορά αμέσως μετά (κλειστά σύμβολα) ή με καθυστέρηση (ανοιχτά σύμβολα) από το χρονικό σημείο της ακτινοβολίας (130) .

Εναλλακτικά , όταν είναι δύσκολος ο καθορισμός συμπαγών κλωνικών αποικιών (π.χ. στην κυτταρική σειρά U87MG) γίνεται διαλυτοποίηση των μονιμοποιημένων και βαμμένων κυττάρων και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 540nm σε Elisa plate reader. Αντιστοιχίζεται τότε η οπτική απορρόφηση (ένταση χρώσης) στον αριθμό των κυττάρων.

Υλικά και Όργανα

- Κύτταρα σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Αναφυλατοξίνη human C5a σε PBS (HPLC purified)
- Διάλυμα poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)
- Πιάτα πολυστυρενίου 6 ή 12 φρεατίων (Greiner)
- Αποστειρωμένες αυτόματες πιπέτες ακριβείας και απολήξεις πιπετών (tips)
- Θρεπτικό μέσο πλήρες σε ορό (DMEM 10% FBS ,1% γλουταμίνη)
- Θρεπτικό μέσο χαμηλό σε ορό (DMEM 1% FBS ,1% γλουταμίνη)
- Λοιπά υλικά και όργανα για ανακαλλιέργεια & μέτρηση κυττάρων
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Διάλυμα μονιμοποίησης (10% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ σε dH₂O)
- Βαφή Crystal Violet (0,4% crystal violet,20% αιθανόλη σε dH₂O)
- Διάλυμα διαλυτοποίησης (33% οξικό οξύ σε dH₂O)
- Πλάκα με κινούμενη επιφάνεια ανάδευσης (rocking plate shaker)
- Πηγή κοβαλτίου για ακτινοβολήση

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Καλλιεργούνται κύτταρα T98G/U87MG (1-2 ανακαλλιέργειες μετά την απόψυξη).Γίνεται 3X πλύση των κυττάρων με PBS.
2. Αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη,απενεργοποίηση τρυψίνης με θρεπτικό με 10% ορό. Συλλογή των κυττάρων σε κωνικό σωληνάριο 50ml και φυγοκέντρηση 5' στις 1100 rpm.
3. Απόρριψη υπερκειμένου και ανασύσταση ιζήματος σε νέο θρεπτικό.Φυγοκέντρηση.
4. Ανασύσταση και λήψη δείγματος κυτταρικού εναιωρήματος για μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο.
5. Ρύθμιση συγκέντρωσης κυττάρων έτσι ώστε σε κάθε φρεάτιο να στρωθούν 1000 κύτταρα.

Σπορά –θα στρωθούν 1000 κύτταρα/ φρεάτιο σε πιάτα ,τα οποία έχουν προηγουμένως προαιρετικά καλυφθεί με πολυλυσίνη *.Επώαση των πιάτων στους 37°C ο/ν.

Στα πειράματα με τη σειρά U87MG τα πιάτα καλύπτονται με πολυλυσίνη χρησιμοποιώντας πιπέτα. Σε κάθε well σχηματίζεται έτσι ένα λεπτό υπόστρωμα που ευνοεί την προσκόλληση των κυττάρων. Η διαδικασία αυτή προηγείται της σποράς διότι είναι πολύ μικρός ο αριθμός των κυττάρων που στρώνονται και αυτά έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στο κέντρο του φρεατίου.

- 6. Επίδραση με C5a-Ακτινοβόληση** -Την επόμενη μέρα αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό και αντικαθίσταται με θρεπτικό μέσο DMEM με 1% FBS που περιέχει C5a σε καθορισμένες συγκεντρώσεις. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται DMEM+1%FBS χωρίς το πεπτίδιο. Απαιτούνται τουλάχιστον 3 φρεάτια ανά συγκέντρωση για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων.
** Χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο χαμηλό σε ορό για να αποφευχθεί τυχόν πρωτεολυτική δράση ενζύμων που μπορεί να περιέχονται στον ορό και που θα αποδομούσαν το C5a.*
- 7.** Επώαση σε επωαστικό κλίβανο για 6 ώρες.
- 8.** Στη συνέχεια γίνεται ακτινοβόληση σε πηγή κοβαλτίου με αυξανόμενες δόσεις ξεκινώντας από το 1Gy. Κάθε δόση είναι +1 Gy.
- 9.** Επώαση σε επωαστικό κλίβανο για 2 ώρες.
- 10.** Αντικατάσταση του θρεπτικού που περιέχει C5a με θρεπτικό μέσο πλήρες σε ορό.
- 11.** Επώαση σε επωαστικό κλίβανο για 10-14 μέρες. Μετά την 8^η μέρα παρατηρείται η πορεία δημιουργίας κλώνων στα κύτταρα. Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτύξει κλώνους σε όλα τα φρεάτια, θα μονιμοποιηθούν και θα βαφτούν με χρωστική Crystal violet.
- 12. Μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων.**
- Αφαίρεση του θρεπτικού και πλύση με PBS με προσοχή να μην αποκολληθούν τα κύτταρα.
 - Αφαίρεση του PBS και προσθήκη διαλύματος μονιμοποίησης. Επώαση σε RT 10min.
 - Αφαίρεση του μονιμοποιητικού διαλύματος και προσθήκη διαλύματος χρωστικής **Crystal Violet**. Επώαση σε RT 10min.
 - Πλύσιμο των πλακών X2 βυθίζοντας απαλά σε δοχείο με H₂O βρύσης ,έως ότου απομακρυνθεί η χρωστική.
 - Οι πλάκες στεγνώνουν ο/π.
- 13. Διαλυτοποίηση/Μέτρηση κλώνων.**
- Προσθήκη 300 μl διαλύματος 33% acetic acid στα φρεάτια και σχολαστική διαλυτοποίηση των βαμμένων κλώνων-ανάδευση σε rocking plate ~20min.
 - Το εναιώρημα των κυττάρων από κάθε φρεάτιο μεταφέρεται σε μικρό tube. Vortex και μεταφορά 100 μl σε elisa plate. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε ELISA PLATE READER στα 540nm(δύο μετρήσεις /well).

Στα κύτταρα T98G δεν ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της διαλυτοποίησης αλλά έγινε καταμέτρηση κλώνων σε στερεομικροσκόπιο, όπως υποδεικνύεται από το Nature protocols.

B.6.3 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Μέθοδος: “MTT assay”

Το MTT (**3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue**) είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου που χρωματίζεται κίτρινο όταν διαλυθεί σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας χωρίς βασικό δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το διαλυμένο MTT μετατρέπεται σε αδιάλυτους μωβ κρυστάλλους φορμαζανίου, λόγω της διάσπασης του δακτυλίου τετραζολίου από ενεργές αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζώντων κυττάρων. Σε νεκρά κύτταρα δε γίνεται αυτή η αναγωγή. Το μη υδατοδιαλυτό φορμαζάνιο μπορεί στη συνέχεια εύκολα να διαλυτοποιηθεί με οργανικό διαλύτη (εδώ χρησιμοποιείται ισοπροπανόλη) και το διάλυμα να φωτομετρηθεί. Οι απορροφήσεις αντιστοιχίζονται στο ποσοστό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (131) .

Υλικά και Όργανα

- Κύτταρα σε καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης
- Αναφυλατοζίνη human C5a σε PBS (HPLC purified)
- Πιάτα πολυστυρενίου 24 φρεατίων για καλλιέργεια (Greiner)
- Αποστειρωμένες αυτόματες πιπέτες ακριβείας και απολήξεις πιπετών (tips)
- Θρεπτικό μέσο πλήρες σε ορό (DMEM 10% FBS ,1% γλουταμίνη)
- Θρεπτικό μέσο χαμηλό σε ορό (DMEM 1% FBS ,1% γλουταμίνη)
- Λοιπά υλικά και όργανα για ανακαλλιέργεια & μέτρηση κυττάρων
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Αντιδραστήριο MTT ($C_{\text{MTT}} = 1\text{mg/ml}$ ζύγιση mg σε ζυγό ακριβείας)
- Θρεπτικό μέσο RPMI χωρίς δείκτη ερυθρό της φαινόλης
- Διάλυμα ισοπροπανόλης
- Πηγή κοβαλτίου για ακτινοβόληση
- Συσκευή αναρρόφησης θρεπτικού
- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης για πλάκα 96 θέσεων (ELISA plate reader)

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Κύτταρα γλοιοβλαστώματος σε καλλιέργεια παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Πρέπει να καλύπτουν σε ποσοστό 70-80% την επιφάνεια της φλάσκας.
2. Πλύσιμο x2 με PBS sterile και αποκόλληση των κυττάρων με trypsin/EDTA. Φυγοκέντρηση για 5min σε 1100rpm, απόρριψη του υπερκειμένου και ανασύσταση σε πλήρες ορού θρεπτικό μέσο
3. Λήψη δείγματος εναιωρήματος για μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο. Ρύθμιση συγκέντρωσης κυττάρων έτσι ώστε σε κάθε φρεάτιο να στρωθούν 80.000 κύτταρα.
4. **Σπορά** : Θα χρησιμοποιηθούν πιάτα 24 φρεατίων. Σε κάθε φρεάτιο στρώνονται 80.000 κύτταρα. Επώαση για μια ημέρα στους 37°C.
5. **Προσθήκη C5a** : Την επόμενη μέρα αφαίρεση του θρεπτικού από τα φρεάτια. Προσθήκη 400μl DMEM+1%FBS που περιέχει C5a σε καθορισμένες συγκεντρώσεις. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται DMEM+1%FBS χωρίς το πεπτίδιο.

- Απαιτούνται τουλάχιστον 3 φρεάτια ανά συγκέντρωση για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων.
6. Επώαση στους 37°C για 6h.
 7. Ακτινοβόληση σε πηγή κοβαλτίου με δόση ιονίζουσας ακτινοβολίας 3Gy. Τα πιάτα 0 Gy βγαίνουν επίσης από τον επωαστικό κλίβανο.
 8. Επώαση στους 37°C για 2h.
 9. Αφαίρεση του θρεπτικού που περιέχει το C5a και προσθήκη 500μl /φρεάτιο DMEM+10%FBS.
 10. Επώαση στους 37°C για καθορισμένα χρονικά σημεία (2 πιάτα/χρονικό σημείο).
 11. Όταν ολοκληρωθεί ο καθορισμένος χρόνος επώασης, τα πιάτα βγαίνουν από τον επωαστικό κλίβανο.
 12. Διαλύουμε σκόνη MTT σε RPMI without phenol red ,έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση διαλύματος στα φρεάτια 1mg/ml.
 13. Αφαίρεση του θρεπτικού με αναρρόφηση υπό κενό με ένα tip. ΠΡΟΣΟΧΗ, πρέπει να φυγει όλο το θρεπτικό από τα πηγαδάκια.
 14. Προστίθενται ~500μl διαλύματος MTT /φρεάτιο.
 15. Επώαση σε σκοτάδι (κάλυψη πιάτων με αλουμινόχαρτο) για 4h σε 37°C προς δημιουργία μωβ κρυστάλλων.
 16. Μετά την επώαση τα κύτταρα έχουν χρωματιστεί μωβ. Αφαιρείται το MTT με αναρρόφηση .
 17. Προσθήκη ισοπροπανόλης (ρυθμίζεται ο όγκος ώστε να μην αραιωθεί πολύ το δείγμα) και η πλάκα αναδεύεται σε shaker υψηλή ταχύτητα -RT για χρόνο ≤ 10 min. ***Είναι πολύ σημαντικό να σιγουρευτούμε ότι οι κρύσταλλοι έχουν διαλυτοποιηθεί πλήρως.*
 18. Τα δείγματα μεταφέρονται σε κωνικά σωληνάρια erpendorf και στη συνέχεια μετά από ανάδευση σε vortex ,σε πιάτο ELISA (x2 μετρήσεις /δείγμα) .
 19. Μετράται η οπτική απορρόφηση σε ELISA plate reader σε 540nm και με μήκος κύματος αναφοράς 620nm.
 20. Ανάλυση δεδομένων.

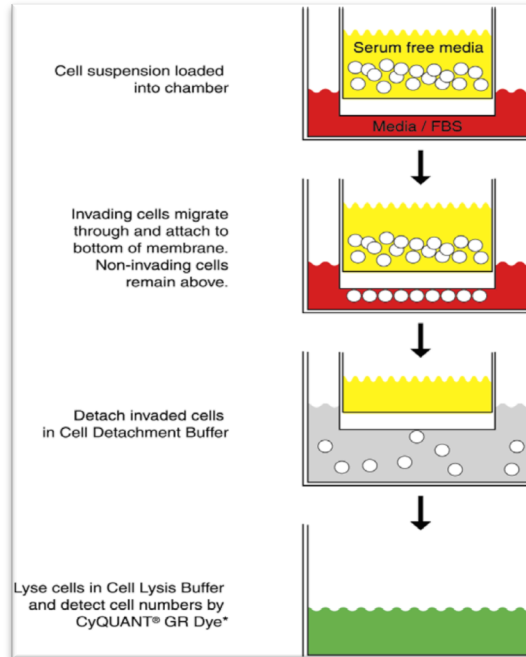
B.6.4 Δοκιμασία ελέγχου της ικανότητας διήθησης

Η διείσδυση των γλοιωματικών κυττάρων σε παρακείμενο υγιή ιστό και στη βασική μεμβράνη του τοιχώματος του αγγειακού ενδοθηλίου διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας είναι σημαντικό βήμα για τη δημιουργία μεταστάσεων.

Μέθοδος: “Cell invasion assay” (132)

Χρησιμοποιείται το kit Millipore QCM™ 96-well Invasion Assay. Η μεμβράνη την οποία διαπερνούν τα κύτταρα (ECMatrix™) ,είναι μοντέλο ανάλογο της βασικής μεμβράνης καρκίνου ποντικού Engelbreth Holm-Swarm (EHS). Πρόκειται για μια πλάκα διήθησης 96 φρεατίων με κατασκευή και αρχή μεθόδου ανάλογη του Boyden chamber. Η πλάκα έχει 96 φρεάτια -κάθε φρεάτιο έχει στον πυθμένα του μια μεμβράνη πολυανθρακικού πολυμερούς με πόρους 8 μm κεκαλυμμένη με ένα λεπτό στρώμα ECMatrix™. Η μεμβράνη την οποία διαπερνούν τα κύτταρα (ECMatrix™), με πρωτεϊνική σύσταση ανάλογη της βασικής μεμβράνης καρκίνου ποντικού EHS, φράσσει τους πόρους της πολυκαρβονικής μεμβράνης, αποτρέποντας τη μετανάστευση των μη διεισδυτικών καρκινικών κυττάρων . Τα διεισδυτικά κύτταρα όμως

διασπούν την ECM στρώση και μένουν κολλημένα στον πυθμένα της πολυκαρβονικής μεμβράνης. Τα κύτταρα αυτά αποκολλώνται με ένα ειδικό Cell Detachment Buffer (περιέχεται στο kit) και στη συνέχεια γίνεται μερική λύση και χρώση των κυττάρων με χρωστική CyQuant GR dye (Molecular Probes). Η πράσινη αυτή χρωστική εκπέμπει έντονο σήμα φθορισμού όταν προσδεθεί σε νουκλεϊικά οξέα και έτσι μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 480/520nm σε φθορισμόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης (TECAN τμήμα Βιολογίας ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος , εργ.Δρ.Ιατρού). Η τιμή της απορρόφησης αντιστοιχίζεται στον αριθμό των κυττάρων που πέρασαν τη μεμβράνη και επομένως έχουν διηθητική ικανότητα.

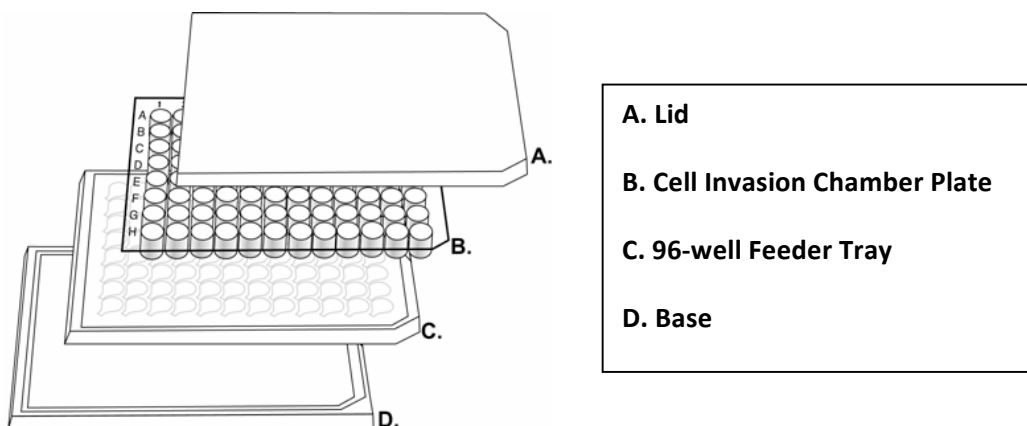


ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Υλικά και όργανα

- Κύτταρα γλοιοβλαστώματος σε καλλιέργεια
- Αναφυλατοξίνη human C5a σε PBS (HPLC purified)
- PMX /C5aR ανταγωνιστής
- Θετικός μάρτυρας δοκιμασίας που ευνοεί τη διήθηση με χημειοπροσέλκυση:
*Συνήθως χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο πλήρες ορού. Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη σαν *chemoattractants* στην εργασία αυτή:
 - Ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου **VEGF-165 200ng/ml**
 - Ανθρώπινη κυτταροκίνη **IL-8** (ImmunoTools)
- Στείρες πιπέτες ακριβείας και απολήξεις πιπετών.
- Θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ορό (1% γλουταμίνη, αντιβιοτικά)
- Στείρο PBS για πλύση κυττάρων.
- Λοιπά υλικά για ανακαλλιέργεια και μέτρηση κυττάρων
- **Millipore 96-well Cell Invasion Plate Assembly** : το kit περιέχει (βλ.εικ.)

- πλάκα με 96 φρεάτια που φέρουν τη μεμβράνη διήθησης (Chamber plate with ECMatrix™ –coated inserts).
 - Πλάκα με 96 υποδοχείς φρεατίων για προσθήκη χημειοελκτικών ουσιών (feeder tray)
 - Πλάκα με υποδοχείς φρεατίων για πλύση κυττάρων (wash tray)
 - Διάλυμα αποκόλλησης κυττάρων (Cell Detachment Solution)
 - 4X Λυτικό διάλυμα (Cell Lysis Buffer)
 - Φθορίζουσα χρωστική CyQuant GR Dye®
 - Βάση και καπάκι
- Συσκευή μέτρησης φθορισμού σε πλάκα 96 θέσεων(Tecan)



Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. **Στέρηση ορού για συγχρονισμό των κυττάρων με DMEM w/o FBS.** Χρησιμοποιούνται κύτταρα από 2^{n} - 3^{n} ανακαλλιέργεια, σε στάδιο που καλύπτουν τη φλάσκα κατά 80%.
2. Γίνεται στέρηση ορού για 24h: Αφαιρείται το θρεπτικό, πλένονται τα κύτταρα και προσθήκη DMEM με 1% γλουταμίνη μόνο.
3. Επώαση για 24h.
4. Την επόμενη μέρα βγάζουμε το kit σε RT 25°C.
5. Μέσα στη hood ανοίγεται το kit και προστίθενται 100μL προθερμασμένο θρεπτικό μέσο χωρίς ορό στο εσωτερικό των πηγαδιών όπου θα μπουν τα κύτταρα (layer B- inserts) ώστε να υγρανθεί η μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 h.

A. Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα.

- Πριν την αποκόλληση ελέγχονται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και πλένονται 2 φορές με sterile PBS.
- Προσθήκη trypsin/EDTA και αποκόλληση των κυττάρων. Φυγοκέντρηση (1100 RPM, 5') και ανασύσταση σε DMEM χωρίς ορό FBS. Φυγοκέντρηση και ανασύσταση pellet).
- Λήψη δείγματος και μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο. Ρύθμιση συγκέντρωσης κυττάρων σε 1×10^6 κύτταρα/ml.

B. Δοκιμασία

6. Μετά την εφύγρανση της μεμβράνης αφαίρεση του θρεπτικού από τις εσοχές (inserts) με προσοχή για να μην τρυπήσει η μεμβράνη στα πηγαδάκια. Η πλάκα με τις εσοχές αφαιρείται και τοποθετείται στη βάση.
7. **Προσθήκη C5a /θετικών μαρτύρων (chemoattractant).**Ετοιμάζονται τα δείγματα 150μl που θα μπουν στα πηγαδάκια του feeder tray, δηλαδή καθορισμένες συγκεντρώσεις C5a και χημειοελκτικών μαρτύρων. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται DMEM χωρίς ορό.
8. Εισάγονται στα πηγαδάκια 150μl από τα δείγματα.
9. Στη συνέχεια τοποθετείται το tray B πάνω στο C (Feeder tray). Στις εσοχές του B εισάγονται μετά από ανάδευση 100μl εναιωρήματος κυττάρων. Στην περίπτωση που ελέγχεται η ειδική δράση του C5a με ανταγωνιστή του υποδοχέα, αυτός προστίθεται μαζί με το εναιώρημα των κυττάρων στις εσοχές.
10. Αφού βεβαιωθεί ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας ανάμεσα στις πλάκες B-C καλύπτεται η πλάκα και επωάζεται στους 37⁰C για 24h.
11. Το κιτ περιέχει ένα καθαρό 2^o wash tray - C. Στα φρεάτια που αντιστοιχούν σε αυτά που είχαν τα δείγματά μας στο feeder tray έχουμε βάλει 150μl PBS. Προσεκτικά αφαιρείται το περιεχόμενο των εσοχών με πιπέτα.
12. Στη συνέχεια τοποθετείται το tray B πάνω στο wash tray, ώστε να πλυθούν 1' τα κύτταρα που έχουν διαπεράσει τη μεμβράνη.
13. Απομακρύνεται το tray B και από το tray C, αφαιρείται το PBS και προστίθενται στα πηγαδάκια 150μl προθερμασμένο διάλυμα αποκόλλησης. Καλύπτεται η πλάκα με το tray B και το καπάκι και επωάζεται για 30' στους 37⁰C. Ανά διαστήματα ανακινείται με ελαφρύ χτύπημα στο πλάι ελαφρώς η πλάκα ώστε να ξεκολλήσουν όλα τα κύτταρα. Στο διάστημα αυτό ετοιμάζεται και το διάλυμα λύσης /χρώσης των κυττάρων.
14. Αραιώνεται η χρωστική CyQuant GR Dye 1:75 με 4X Lysis Buffer (πχ. 4 μl dye σε 300 μl 4X Lysis Buffer). Παρασκευάζεται περίσσεια ώστε να χρησιμοποιηθεί και για τυφλό στη μέτρηση.
15. Μετά την επώαση προστίθενται στα πηγαδάκια του wash tray που ήδη περιέχουν 150μl διαλύματος αποκόλλησης με τα κύτταρα που έχουν περάσει από τη μεμβράνη και ξεκόλλησαν, επιπλέον 50μl από το διάλυμα CyQuant GR Dye 1:75 που παρασκευάστηκε. Επώαση 15' σε RT.
16. Η μέτρηση γίνεται στο TECAN σε λ=480/520nm σε black plate 96wells. Μετά από καλή ανάδευση μεταφέρονται τα δείγματα στο black plate (100μl) αφήνοντας κενό το πλαίσιο του και παρεμβάλλοντας κενά πηγαδάκια ανάμεσα στα δείγματα. Επίσης χρησιμοποιείται σαν τυφλό ίσος όγκος από το μίγμα διαλύματος χρωστικής/διαλύματος αποκόλλησης, ώστε να αφαιρεθεί σαν background.
17. Ανάλυση αποτελεσμάτων. Η ένταση του φθορισμού που μετράται αντιστοιχίζεται στον αριθμό των κυττάρων που πέρασαν τη μεμβράνη.

B.6.5 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου

Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται διαφοροποίηση της ακτινοευαισθησίας ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Ως πιο ανθεκτική στην ακτινοθεραπεία φάση για τα κύτταρα θεωρείται η φάση S (φάση σύνθεσης του DNA), ενώ πιο ακτινοευαίσθητες φάσεις οι G₂ και M (μιτωτική) .

Μέθοδος : Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS), μετά από χρώση των κυτάρων με ειδική χρωστική Vybrant® DyeCycle™ και με τη βοήθεια του προγράμματος ModFit.

Η χρωστική αυτή βάφει το DNA και κατ'αντιστοιχία με τον αριθμό των αντιγράφων διαμορφώνεται το προφίλ της κατανομής των φάσεων σε ένα πληθυσμό ζώντων κυττάρων. Οι κορυφές G₀/G₁ και G₂/M χωρίζονται από την S. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με χρήση του προγράμματος ModFIT υπό μορφή ιστογραμμάτων. Η κατανομή των φάσεων εκφράζεται σε ποσοστά επί του συνολικού πληθυσμού.

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο ανοσολογίας του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, υπό την καθοδήγηση της Δρ. Ράνιας Τσιτσιλώνη και με τη βοήθεια του φοιτητή της Νίκου Παπαϊωάννου. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν από το εργαστήριό τους.

Υλικά και Όργανα

- Κύτταρα σε καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Αναφυλατοξίνη human C5a σε PBS (HPLC purified)
- Θρεπτικό μέσο DMEM πλήρες 10% FBS
- Θρεπτικό μέσο DMEM 1% FBS.
- Θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ορό, για συγχρονισμό της καλλιέργειας στη φάση G₁
- Πιάτα 6 φρεατίων για καλλιέργεια
- Λοιπά υλικά για ανακαλλιέργεια και μέτρηση κυττάρων
- Χρωστική Vybrant® DyeCycle™
- Σωληνάρια για FACS με καπάκι
- Κυτταρόμετρο: BD FACS Canto II, με 3 laser και δυνατότητα ανάλυσης 8 παραμέτρων & FSC και SSC

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Κύτταρα ανθρωπίνου γλοιοβλαστώματος καλλιεργούνται αρχικά σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα πρέπει να προέρχονται από 3^η ανακαλλιέργεια. Ελέγχονται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και πλένονται 2 φορές με sterile PBS.
2. Προσθήκη trypsin/EDTA και αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα. Φυγοκέντρηση (1100 RPM, 5') και ανασύσταση σε DMEM 10% FBS.
3. Φυγοκέντρηση-πλύση με θρεπτικό και ανασύσταση ιζήματος.
4. Λήψη δείγματος και μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο. Για την ανάλυση στο FACS χρειαζόμαστε 10⁶ κύτταρα/ml και τουλάχιστον 150μl εναιωρήματος κυττάρων/σωληνάκι. Σπορά 100.000 κυττάρων ανά φρεάτιο σε πιάτα 6 φρεατίων.
5. Ρύθμιση συγκέντρωσης κυττάρων σε 50.000 κύτταρα/ml.

6. **Σπορά:** στρώνεται κάθε πιάτο με 100.000 κύτταρα (2ml εναιωρήματος).
7. Επώαση στους 37°C 5% CO₂ για 48h.
8. Προσθήκη C5a: Μετά το πέρας των 48h απομάκρυνση θρεπτικού και προσθήκη στα φρεάτια C5a σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις σε **DMEM-1%FBS** .Σαν αρνητικός μαρτυρας χρησιμοποιήθηκε DMEM 1%.
9. Επώαση στους 37°C , 5% CO₂ για 24h,48h ,72h αναλόγως του προκαθορισμένου χρονικού σημείου του πειράματος.
10. **Μέτρηση FACS :**
 - Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο.Έχουμε σχεδόν πλήρη κάλυψη της επιφάνειας των φρεατίων.
 - Πλύση κυττάρων προσεκτικά με PBS ,αποκόλληση με 800μl τρυψίνη και ξεπλυμα με 1ml θρεπτικό των φρεατίων.Το εναιώρημα από κάθε φρεάτιο συλλέγεται σε διαφορετικό κωνικό σωληνάριο 15ml.Επιβεβαιώνεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο ότι έχουν αποκολληθεί όλα τα κύτταρα.
 - Φυγοκέντρηση των κυττάρων 5' στις 1100rpm.Ανασύσταση όλων των εναιωρημάτων σε 800-1000μl θρεπτικό μέσο.Λήψη δείγματος από κάθε εναιώρημα και μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο μετά από καλή ανάδευση.
 - Για την ανάλυση στο FACS χρειαζόμαστε 10⁶ κύτταρα/ml και τουλάχιστον 150μl εναιωρήματος κυττάρων/σωληνάκι.Ρυθμίζεται η συγκέντρωση όλων των δειγμάτων σε 1X10⁶κύτταρα/ml, βάσει του νόμου των αραιώσεων.
 - Τα δείγματα μεταφέρονται στο τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ.Σε κάθε σωληνάκι για FACS προσθήκη 150μl του εκάστοτε εναιωρήματος κυττάρων μετά από καλή ανάδευση με πιπέτα για να σπάσουν τυχόν υπάρχοντα συσσωματώματα.
 - Προσθήκη 3μl αραιωμένου 1:10 dye (τελική συγκέντρωση χρωστικής 10μM).Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδύνησης vortex.
 - Επώαση στους 37°C , 5% CO₂ για 30'.
 - Μέτρηση στο FACS.
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα ανάλυσης κυτταρικού κύκλου ModFIT.

B.7 Ζυμογραφία για ανίχνευση δράσης μεταλλοπρωτεασών

Οι μεταλλοπρωτεάσες που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία είναι ενδοπεπτιδάσες που περιέχουν δάκτυλα Zn. Αποδομούν πρωτεΐνες με διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού.Περισσότερες από 20 έχουν ταυτοποιηθεί και διαχωριστεί σε 6 ομάδες βάσει της δομής τους και της εξειδίκευσής τους ως προς το υπόστρωμα (κολλαγενάσες, ζελατινάσες, κ.ά.). Παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην διήθηση των καρκινικών κυττάρων (133) .

Η ζυμογραφία είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική που επιτρέπει την οπτικοποίηση του μεγέθους και της ποσότητας πρωτεΐναιών σε ένα δείγμα.Η μέθοδος βασίζεται στην υδρόλυση ενός ενσωματωμένου σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου υποστρώματος, όπως είναι η ζελατίνη (134) . Η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη της λειτουργίας μεταλλοπρωτεΐναιών που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία (135, 136) .

Η ζυμογραφία με υπόστρωμα ζελατίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της δράσης μεταλλοπρωτεϊνών, υπό την προϋπόθεση ότι το ένζυμο διατηρεί την βιολογική ενεργότητά του μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανάκτηση της στερεοδομής του . Εδώ παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πρωτόκολλο .

Για ομοιόμορφη κατανομή του υποστρώματος, η ζελατίνη προστίθεται στα συστατικά υλικά του διαλύματος πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα πολυμερίζεται ως συνήθως. Επειδή το υπόστρωμα παγιδευεται στους πόρους του πηκτώματος δεν διαφεύγει κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Οι ζελατινάσες αποκτούν γραμμική μορφή με τη χρήση sodium dodecyl sulfate (SDS) αλλά δεν αποδιατάσσονται με βρασμό ή μερκαπτοαιθανόλη. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται τα δείγματα. Οι ζελατινάσες που έχουν τώρα διαχωριστεί ανακτούν την τριτοταγή τους δομή , που καθιστά ενεργό το ένζυμο, στη θέση που έχουν στο πήκτωμα με αντικατάσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης που περιέχει SDS με διάλυμα που περιέχει ανιονικό detergent όπως το Triton X-100. Ακολουθεί επώαση του πηκτώματος σε ένα διάλυμα κατάλληλο για εκκίνηση της ενζυματικής δραστηριότητας, κατά τη διάρκεια της οποίας οι επαναδιαταγμένες πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα καταναλώνουν το υπόστρωμα στην περιοχή της ζώνης την οποία έχουν καταλάβει κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία. Αυτές οι ζώνες γίνονται ορατές με βαφή του πηκτώματος με Coomassie brilliant blue R250 και αποχρωματισμό με dH_2O . Οι περιοχές όπου έχει δράσει το ένζυμο φαίνονται λευκές, εν αντιθέσει με το βαμμένο μπλε φόντο με την ζελατίνη που δεν έχει υδρολυθεί (137) .

Όσο πιο καθαρές είναι οι ζώνες τόσο πιο συγκεντρωμένο είναι το ένζυμο στο δείγμα. Η ένταση της μπάντας ποσοτικοποιείται με τη βοήθεια του λογισμικού Image J, που επιτρέπει τη σύγκριση των δειγμάτων (133).

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην MMP-2 (ζελατινάση τύπου A με $\text{MB}=66\text{kDa}$ με Ca^{2+} - εξαρτώμενη δράση) (138), μια ευρέως εκφραζόμενη MMP, και στην MMP-9 μια μεταλλοπρωτεάση απαραίτητη για τη μετανάστευση των ουδετροφίλων και ηωσινοφίλων . Τα κύτταρα των πολύ επιθετικών σειρών T98G και U87MG έχουν μεγάλη διειδυτική ικανότητα. Πιθανόν να διασπούν την εξωκυττάρια ουσία εκκρίνοντας MMPs που είναι αρχικά ανενεργές και ενεργοποιούνται με τη δράση εξωκυττάρων πεπτιδασών. Μελετήθηκε η ενζυμική ενεργότητα των μεταλλοπρωτεασών σε υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών σειρών γλοιοβλαστώματος. Τα υπερκείμενα προέρχονται από καλλιέργεια χωρίς ορό, καθώς αυτός περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα που θα επηρέαζαν τα αποτελέσματα (139).

B.7.1 Συλλογή υπερκειμένων καλλιέργειας κυττάρων U87MG

Υλικά και Όργανα

- Κύτταρα γλοιοβλαστώματος σε καλλιέργεια
- Αναφυλατοξίνη human C5a σε PBS (HPLC purified)
- PMX /C5aR ανταγωνιστής

- Πιάτα πολυστυρενίου 12 φρεατίων
- Θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ορό
- Λοιπά υλικά και όργανα για ανακαλλιέργεια και μέτρηση κυττάρων
- Πηγή κοβαλτίου για ακτινοβολήση

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Έχουμε σε καλλιέργεια κύτταρα U87MG.Γίνεται πλύση των κυττάρων με PBS, αποκόλληση και μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο .
2. Ρύθμιση συγκέντρωσης κυττάρων σε 150.000 κύτταρα/ml και σπορά 150.000 κυττάρων /φρεάτιο.
3. Επώαση για 24h για να κολλήσουν τα κύτταρα στα πηγαδάκια.
4. Προσθήκη C5a/PMX53 antagonist: Την επόμενη μέρα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα, γίνεται πλύση με PBS και προσθήκη θρεπτικού DMEM χωρίς θρεπτικό με διαφορετικές συγκεντρώσεις C5a.Ελέγχεται η ειδικότητα της δράσης με τη χρήση ανταγωνιστή για τον υποδοχέα C5aR.
5. Ακτινοβολήση με δόση 3Gy σε πηγή κοβαλτίου.
6. Επώαση για 48 h σε επωαστικό θάλαμο 37⁰C με παροχή 5% CO₂.
7. **Συλλογή υπερκειμένων:** Συνελέχθη 1ml υπερκειμένου για κάθε συγκέντρωση C5a σε μικρά κωνικά σωληνάκια. Τα υπερκείμενα φυγοκεντρούνται για την απομάκρυνση τυχόν αποκολληθέντων κυττάρων για 5'-7' σε 10000 rpm στους 4⁰C για να μη χάσουν τη δραστηρότητά τους οι πρωτεΐνες. Μετά τη φυγοκέντρηση μεταφέρεται το καθαρό υπερκείμενο σε νέα.Φύλαξη δειγμάτων στους -80⁰C.
8. **Μέτρηση κυττάρων:** Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται με 400μl Trypsin/EDTA. Η θρυψινοποίηση υποβοηθείται με πιπετάρισμα και ελέγχεται στο μικροσκόπιο η αποκόλληση των κυττάρων. Ωστόσο προσπαθούμε να αποφύγουμε τη δημιουργία συσσωματωμάτων.Στη συνέχεια προστίθενται 200ml DMEM w/o FBS +200ml με τα οποία ξεπλένονται τα πηγαδάκια για να συλλεχθούν όλα τα κύτταρα.Τα κύτταρα μετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο για να υπολογιστεί η ποσότητα του δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί στο ενζυμογράφημα.Γίνονται προσαρμογές στον όγκο των δειγμάτων έτσι ώστε να προέρχονται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων.

B.7.2 Ζυμογραφία.

Υλικά και Όργανα

- Δείγματα υπερκειμένων από καλλιέργεια.
- Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 9% με 0,1% ζελατίνη:

ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (separating gel)

- 1,25 ml διάλυμα διαχωρισμού

- 1,5 ml 30% ακρυλαμίδιο
- 2,2 ml dH₂O (από αυτά το 1ml είναι διάλυμα stock 1%gelatin)
- 50 μl APS
- 5 μl TEMED

ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (stacking gel)

- 1ml διάλυμα επιστοίβαξης
- 600 μl 30% acrylamide
- 2,4ml dH₂O
- 30ul APS
- 5ul TEMED

400ml/gel Renaturing Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα ανάκτησης της τρισδιάστατης δομής)

50mM TRIS Base
200mM NaCl
1μM ZnCl₂
5mM CaCl₂
0,02% NaN₃

Ρύθμιση Ph= 7,5
+2,5% TRITON X100

(Μετά τη ρύθμιση του pH 800ml από τα παραπάνω->> Renaturing Buffer)

- **Denaturing Buffer** (διάλυμα για έναρξη πρωτεολυτικής δραστηριότητας -Όπως το renaturing buffer χωρίς TRITON): 200ml/gel
- ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x running buffer) (15g/L Tris, 72g/L γλυκίνη, 5g/L SDS)
- ακρυλαμίδιο (BIORAD)
- Πρωτεϊνικός μάρτυρας-δείκτης για ηλεκτροφόρηση (Bio-labs)
- APS, 10% (10 g NH₄SO₈ σε 100ml δισαπασταγμένο H₂O)
- TEMED (Appli-chem)
- απιονισμένο H₂O
- εκμαγείο και χτένες (BIORAD)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIORAD)
- **μη-αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης 5X** (0,3 M Tris-HCl pH6.8, 10% w/v SDS, 50%v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης)
- βαφή Coomassie Blue (3g Coomassie R250, 480 ml μεθανόλη, 100ml οξικό οξύ, 420ml H₂O)
- Επωαστικός κλίβανος με δυνατότητα ανάδευσης
- Πλάκα με επιφάνεια ανακίνησης

Πειραματικό πρωτόκολλο

1.Παρασκευή πηκτής 9% που περιέχει 0.1% gelatin.

2.Προετοιμασία δειγμάτων. Τα δείγματα τρέχουν χωρίς να προηγηθεί thermoblock και σε μη αναγωγικές συνθήκες (με non-reducing loading dye) για να μην χάσουν την δραστηριότητά τους

τα ένζυμα. Για τον ίδιο λόγο καθ'όλη τη διάρκεια των χειρισμών αυτά φυλάσσονται συνεχώς σε πάγο.

3. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε 95mV για 3h. Παρακολουθείται η θέση της 4^{ns} ζώνης του πρωτεϊνικού δείκτη, με μοριακό βάρος κοντά σε αυτό της MMP-2.

4. Ακολουθεί πλύση του πηκτώματος σε 100ml renaturing buffer για 1h συνολικά σε RT υπό πολύ αργή ανάδευση 20-30 rpm (αφαίρεση του προηγούμενου και προσθήκη νέου buffer κάθε 15min).

5. Μεταφορά σε 100ml denaturing buffer και επώαση σε R/T υπό πολύ αργή ανάδευση για 30'.

6. Απόρριψη του παλιού και προσθήκη νέου denaturing buffer και επώαση για 16-18 h υπό πολύ αργή ανάδευση στους 37°C για να δράσουν τα ένζυμα.

7. Την επόμενη μέρα αφαιρείται το denaturing buffer και γίνονται 3x πλύσεις με dH₂O (5'/πλύση υπό αργή ανάδευση).

8. Βάψιμο του πηκτώματος με χρωστική COOMASIE BLUE ~30min-1h.

9. Αφαίρεση της χρωστικής με dH₂O μέχρις ότου οι μπάντες να είναι ορατές. Το gel χρωματίζεται μπλε και οι περιοχές όπου υπάρχει ενζυμική δράση μεταλλοπρωτεασών φαίνονται λευκές γιατί έχει καταναλωθεί το υπόστρωμα.

10. Φωτογράφιση του πηκτώματος με οπίσθιο φωτισμό & ανάλυση με IMAGE J.H ανάλυση γίνεται σε εικόνα ασπρόμαυρη (8bit).

B.8 Ενζυμική ανοσοπροσοροφητική μέθοδος προσδιορισμού (Sandwich ELISA)

Τα αντισώματα παρέχουν εξαιρετική εξειδίκευση ως αντιδραστήρια καθορισμού μιας πρωτεΐνης ή κάποιου άλλου αντιγόνου. Η τεχνική λέγεται ενζυμική ανοσοπροσοροφητική μέθοδος προσδιορισμού (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Η Sandwich ELISA συνεπάγεται προσκόλληση αντισωμάτων σύλληψης σε ένα υπόστρωμα στερεάς φάσης. Δείγματα που περιέχουν γνωστά ή άγνωστα αντιγόνα στη συνέχεια προστίθενται σε μία μήτρα ή σε ρυθμιστικό διάλυμα που θα ελαχιστοποιήσει την προσάρτηση στη στερεά φάση. Ένα αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο προστίθεται στη συνέχεια για την ανίχνευση. Η ενζυμική ενεργότητα ανιχνεύεται με την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος στο διάλυμα μετά την οξείδωση κατάλληλου χρωμογόνου υποστρώματος.

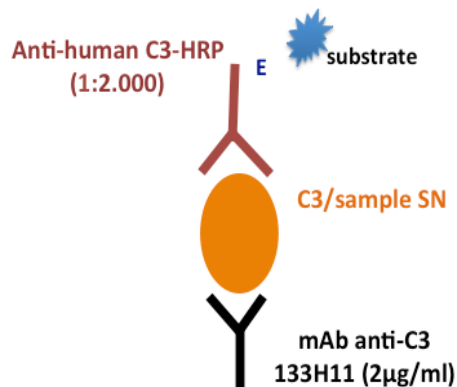
Η Sandwich ELISA πραγματοποιεί ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων (δηλ. μεταξύ αντισώματος σύλληψης και αντισώματος ανίχνευσης). Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο αντιγονικούς επιτόπους ικανούς για πρόσδεση με το αντίσωμα, αφού τουλάχιστον δύο αντισώματα δρουν στο σάντουιτς. Μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντισώματα σύλληψης και ανίχνευσης σε συστήματα Sandwich ELISA (140).

Υλικά και όργανα

- ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS: σε 1L απεσταγμένο νερό διαλύονται 8.5 g NaCl, 0.95 g Na₂HPO₄, 0.39 g NaH₂PO₄, pH 7.4)
- διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων που παρασκευάζεται με προσθήκη 1% (w/v) BSA (BSA-bovine serum albumin) σε PBS
- διάλυμα έκπλυσης που παρασκευάζεται με προσθήκη 0.05%(v/v) Tween - 20 σε PBS
- διάλυμα εμφάνισης ABTS : 10ml Citrate, 10 μl H₂O₂, 5 mg ABTS (υπόστρωμα ενζύμου HRP).
- πλάκες μικροτιτλοδότησης υψηλής δέσμησης 96 φρεατίων (NUNC)
- φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης (ELISA plate reader)
- απορροφητικό χαρτί
- ελαστική ταινία παραφίνης (parafilm)
- ορθογώνια πλαστικά δοχεία
- πολυπιπέτες και αυτόματες πιπέτες 50, 200 μl

B.8.1 Δοκιμασία ELISA για ανίχνευση ανθρώπινου C3

Η δοκιμασία έχει ως στόχο να ανιχνευτεί και να προσδιορισθεί ποσοτικά σε δείγματα υπερκειμένου από καλλιέργεια κυττάρων γλοιοβλαστώματος η παρουσία ενδογενώς παραγόμενης ανθρώπινης πρωτεΐνης C3 .



Εικ.2.15: Σχηματική απεικόνιση μεθόδου

Υλικά και Όργανα

- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό 133H11 αντι-ανθρώπινης πρωτεΐνης C3 (αντι-C3c).
- Δείγματα υπερκειμένων από καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό.
- Πολυκλωνικός ορός αντι-ανθρώπινης πρωτεΐνης C3 από αίγα, συζευγμένος με HRP (Υπεροξειδάση του ρεπανιού)

- Λοιπά υλικά για δοκιμασία elisa

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Κάλυψη Elisa plate με 2μg/ml mAb 133H11 (50μl/φρεάτιο) και ο/η επώαση στους 4⁰C.
2. Την επόμενη μέρα γίνεται κάλυψη μη ειδικών θέσεων (blocking) με 1% BSA/PBS για 1h σε RT (200ul/φρεάτιο).
3. Απομάκρυνση του BSA/PBS. Το διάλυμα απομακρύνεται με τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας σε απορροφητικό χαρτί .
4. Τα δείγματα προς μέτρηση αραιώνονται διαδοχικά σε BSA/PBS, ξεκινώντας από 100μl/φρεάτιο.Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται human C3 ξεκινώντας διαδοχικές αραιώσεις από 5μg/ml.Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται DMEM w/o FBS.
5. Τα δείγματα επωάζονται με το mAb για 60 min.
6. Απομάκρυνση των δειγμάτων με τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας σε απορροφητικό χαρτί.
7. Ακολουθούν πλύσεις X 2 με PBS-TWEEN(200ul/φρεάτιο) .Κάθε φορά τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας σε απορροφητικό χαρτί.
8. Προσθήκη του πολυκλωνικού ορού anti-human C3-HRP σε αραιώση 1:2000 σε BSA/PBS (50μl/well).Επώαση 30'.
9. Ακολουθούν πλύσεις X3 με PBS-TWEEN.Κάθε φορά τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας σε απορροφητικό χαρτί.
10. Προσθήκη εμφανιστικού 50ul/φρεάτιο
11. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης σε ELISA READER - 405nm.

B.8.2 Δοκιμασία ELISA για έμμεσο προσδιορισμό της ενεργοποίησης του συμπληρώματος

Ο παράγων δηλητηρίου κόμπρας -Cobra venom factor (CVF) είναι ένα δομικό και λειτουργικό ανάλογο του συστατικού C3 του συμπληρώματος, που έχει απομονωθεί από το δηλητήριο της κόμπρας.Ο CVF λειτουργεί όπως το θραύσμα C3b, που είναι η ενεργοποιημένη μορφή του C3,μετά από πέψη από τη C3 κονβερτάση.Όπως το C3b,ο CVF συνδέεται με τον factor B ,τμήμα του οποίου στη συνέχεια κόβεται για να δημιουργηθεί το διμοριακό σύμπλοκο CVF,Bb (εν αντιστοιχία με το C3b,Bb). Το σύμπλοκο C3bBb έχει ενεργότητα C3 κονβερτάσης που, καθώς παράγεται συνεχώς C3b, δημιουργεί ένα C3bBb3b σύμπλοκο που έχει ενεργότητα C5 κονβερτάσης με αποτέλεσμα να ενισχύεται η ενεργοποίηση του συμπληρώματος (141).Η κονβερτάση CVF,Bb διασπά και τα δύο συστατικά του συμπληρώματος C3 και C5 .Τα δύο ομόλογα ένζυμα CVF,Bb και C3b,Bb έχουν κάποιες διαφορές ,σημαντικότερη εκ των οποίων είναι η φυσικοχημική σταθερότητα,που επιτρέπει στον CVF συνεχή ενεργοποίηση του συμπληρώματος με πέψη του C3 and C5 (142, 143).

Σκοπός της δοκιμασίας είναι να ανιχνευτούν στο θεραπευτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων γλοιοβλαστώματος τυχόν υπάρχοντα ενεργοποιημένα θραύσματα C3, δηλαδή C3b/iC3b, ενδεικτικά της ενεργοποίησης του συμπληρώματος στο περιβάλλον των κυττάρων. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ορός με ενεργοποιημένο από το αντιγόνο CVF συμπλήρωμα.

Υλικά και Όργανα

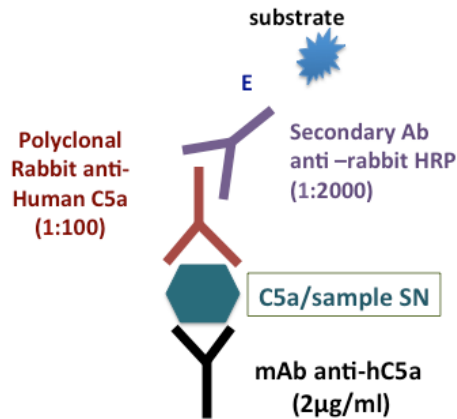
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό :Αντι-C3 mAb C3-9.
- Ανθρώπινος ορός ενεργοποιημένος από αντιγόνο δηλητηρίου κόμπρας -CVF(Combra Venom Factor)
- Πολυκλωνικός ορός αντι-ανθρώπινης πρωτεΐνης C3 από αίγα, συζευγμένος με HRP (Υπεροξειδάση του ρεπανιού)
- Λοιπά υλικά για δοκιμασία elisa

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Κάλυψη πιάτου Elisa με mAb C3-9, σε συγκέντρωση 2μg/ml. Επώαση ο/η στους 4⁰C.
2. Απομάκρυνση του αντισώματος με τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων με 1% BSA/PBS για 1h σε RT (200μl/φρεάτιο).
3. Απομάκρυνση του BSA/PBS με τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας.
4. Διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων ξεκινώντας από 100μl/φρεάτιο και σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται CVF-ενεργοποιημένο πλάσμα ξεκινώντας διαδοχικές αραιώσεις από 1:200. Επώαση για 30' σε RT.
5. Πλύσιμο 2x PBS-Tween και προσθήκη του πολυκλωνικού ορού anti-human C3-HRP σε αραιώση 1:2000. Επώαση 30'.
6. Πλύσιμο 3x PBS-Tween και εμφάνιση. Μέτρηση πιάτου σε ELISA reader OD 405nm.

B.8.3 Δοκιμασία ELISA για ανίχνευση C5a

Σκοπός της δοκιμασίας είναι να ανιχνευτεί η παρουσία αναφυλατοξίνης C5a σε υπερκείμενα καλλιιεργειών κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Σε αυτή τη δοκιμασία απαιτείται υψηλή ευαισθησία γιατί η συγκέντρωση του πεπτιδίου στο υπερκείμενο είναι πολύ μικρή. Για το λόγο αυτό τα υπερκείμενα συγκεντρώνονται με κατακρήμνιση με TCA (βλ. κεφ. B9) και στη δοκιμασία χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα ανίχνευσης. Ένα πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι που αναγνωρίζει ανθρώπινο C5a. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται δευτερογενές πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το πρωτογενές, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ρεπανιού-Horseradish Peroxidase(HRP).



Εικ.2.16: Σχηματική απεικόνιση μεθόδου

Υλικά και Όργανα

- Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα δέσμευσης: αντι-hC5a (R&D Systems)
- rhC5a σε PBS, HPLC purified
- Δείγματα υπερκειμένων από καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό.
- Πολυκλωνικό Ab αντι-ανθρώπινης πρωτεΐνης C5a από κουνέλι : Rabbit Anti-Human C5a Affinity Purified Polyclonal Antibody (UP2003)
- Δευτερογενές πολυκλωνικό Ab από αίγα συζευγμένο με HRP: Secondary Ab anti-rabbit HRP conjugated (BIORAD)
- Λοιπά υλικά για δοκιμασία elisa

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Κάλυψη ELISA plate με mAb anti-hC5a σε τελική συγκέντρωση 2µg/ml.Επώαση ο/η στους 4C.
2. Απομάκρυνση του anti-hC5a με τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας.
3. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων με 1% BSA/PBS για 1h σε RT (200ul/φρεάτιο).
4. Απομάκρυνση του BSA/PBS με τίναγμα και δυνατό χτύπημα της πλάκας.
5. Διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων ξεκινώντας από 100µl/φρεάτιο.Σαν θετικός μάρτυρας για πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη human C5a ξεκινώντας διαδοχικές αραιώσεις από 5µg/ml.Επώαση για 60' σε RT.
6. Πλύσιμο 2x PBS-Tween και προσθήκη του πολυκλωνικού αντισώματος anti-human C5a σε αραιώση 1:100. Επώαση 30'.
7. Πλύσιμο 2x PBS-Tween και προσθήκη του πολυκλωνικού αντισώματος anti-rabbit-HRP σε αραιώση 1:2000 (φυλάσσεται στους 4C). Επώαση 30'.
8. Πλύσιμο 3x PBS-Tween και εμφάνιση.Μέτρηση πιάτου σε ELISA reader OD 405nm.

B.9 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τριχλωροοξικό οξύ TCA και ακετόνη

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για συγκέντρωση πρωτεϊνών σε πολύ αραιά δείγματα. Στόχος είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση του δείγματος έως και 400-500 φορές.

Υλικά και Όργανα

- Άνυδρο τριχλωροοξικό οξύ TCA 100% Appli-chem
- Ακετόνη
- Απεσταγμένο H₂O
- Φυγόκεντρος με δυνατότητα ψύξης (Βιολογία ΕΚΕΦΕ: ΚΥΝΟΤΑ Rotor: AG6512C)
- Μικροφυγόκεντρος με δυνατότητα ψύξης για σωληνάρια 1-2ml (Thermo Electron Corporation Centrifuge)
- Σωληνάρια με κωνική απόληξη erpendorf 1,5ml
- Σωληνάρια με κωνική απόληξη falcon 50ml
- Ζυγός ακριβείας
- Πιπέτες ακριβείας και απολήξεις πιπετών.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Παρασκευή διαλύματος stock TCA 100%(w/v).
2. Στο δείγμα προς συγκέντρωση προσθήκη 13% διαλύματος τριχλωροοξικού οξέος TCA 100%.
3. Καλή ανάδευση και επώαση ο/η στους 4⁰C.
4. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρείται το δείγμα στο falcon όπου περιέχεται, με ισοζυγισμένο με ακρίβεια 2⁰⁰ δεκαδικού ψηφίου αντίβαρο, για 45' στις 8000rpm στους 4⁰C. (τμήμα ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ)
5. Δε διακρίνεται ίζημα με γυμνό μάτι, παρά μόνο κάτι λευκοί κόκκοι στο τοίχωμα του σωληναρίου. Αφαίρεση του υπερκειμένου και αναμονή να στεγνώσει εντελώς το ίζημα.
6. Προσθήκη παγωμένης ακετόνης 1ml. Συλλογή ιζήματος (χρειάζεται επιμονή στην περιβρέση των τοιχωμάτων για να συλλέξουμε όλο το δείγμα).
7. Μεταφορά σε erpendorf tube και φυγοκέντρωση για 30' στις 13000rpm στους 4⁰C.
8. Απομάκρυνση υπερκειμένου και αναμονή να στεγνώσει το ίζημα.
9. Ανασύσταση σε 100-120 μl απεσταγμένου H₂O. Η ανασύσταση είναι δύσκολη γιατί το ίζημα είναι πολύ συμπαγές. Μετά από συνεχές πιπετάρισμα και μηχανική διάσπαση του ιζήματος, γίνεται spin και συλλέγεται το καθαρό δείγμα σε νέο tube.
10. Φύλαξη του δείγματος στους -80⁰C.

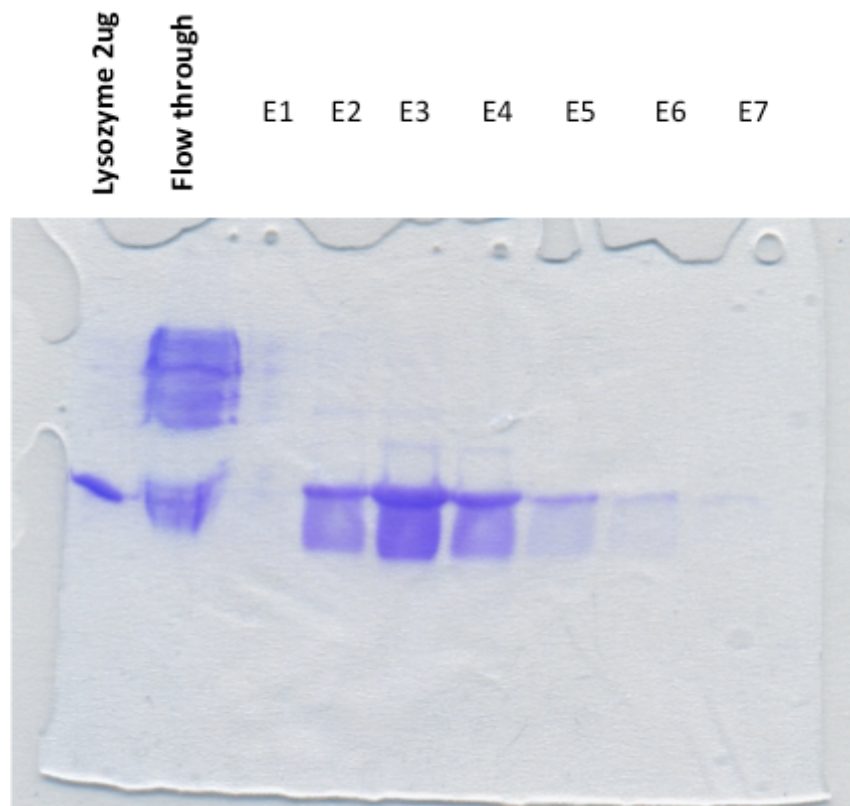
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 Παραγωγή ανθρώπινης αναφυλατοξίνης C5a

Γ.1.1 Καθαρισμός C5a με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή της έκφρασης σε βακτηριακό σύστημα

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης κρίθηκε αναγκαία η παραγωγή ικανής ποσότητας του ανθρώπινου μορίου C5a. Έγινε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου σε βακτηριακό σύστημα πλασμιδίου-φορέα και καθαρισμός της πρωτεΐνης σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο κεφ.Β.1. Παρουσιάζεται η εικόνα του πηκτώματος ελέγχου των κλασμάτων έκλουσης για την παρουσία του πεπτιδίου C5a, με τη χρήση μάρτυρα λυσοζύμης, ως μάρτυρα μοριακού μεγέθους.

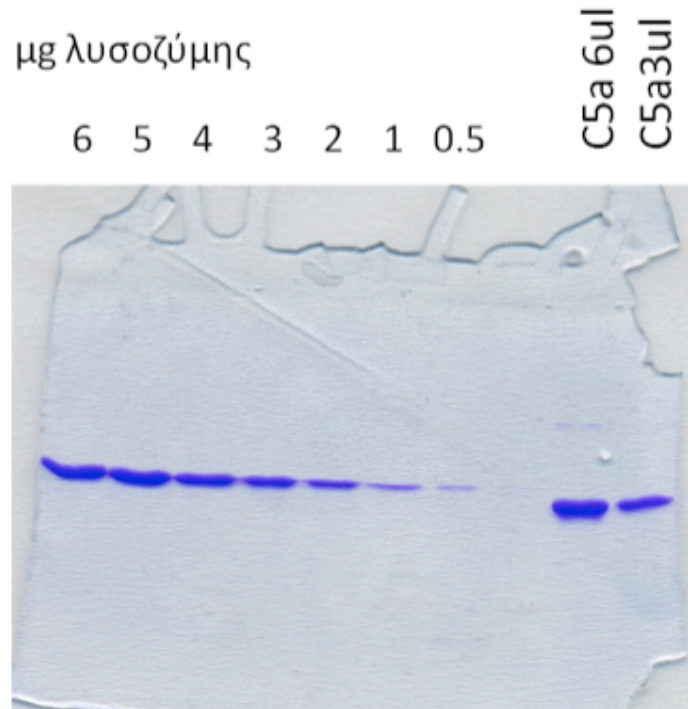


Εικ.3.1.: Από τον καθαρισμό συλλέγονται 7 κλάσματα έκλουσης όπου περιέχεται το C5a. Στην 1^η θέση από αριστερά φαίνεται η ζώνη του μάρτυρα και στη 2^η το «flow through», που είναι το πρώτο έκλουσμα μετά την επώαση του εναιωρήματος λύσης των βακτηρίων με τα σφαιρίδια αγαρόζης-NTA.

Παρατηρήθηκε ότι τα κλάσματα E2-E5 έχουν την περισσότερη πρωτεΐνη οπότε αυτά επιλέχθηκαν για διαπίδυση. Επίσης ότι η ηλεκτροφορητική ζώνη του C5a λείπει από την αντίστοιχη θέση στο flow through. Αυτό σημαίνει ότι όλη η πρωτεΐνη δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια και έχει συλλεχθεί στα κλάσματα έκλουσης.

Το δείγμα του πεπτιδίου που συλλέχθηκε μετά τη διαπίδυση συγκεντρώθηκε 10X ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφ.Β.4.

Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί το C5a στα πειράματα με τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος έγινε έλεγχος της καθαρότητας και ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πεπτιδίου με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και κατάστρωση πρότυπης καμπύλης βαθμίδωσης συγκέντρωσης λυσοζύμης (κεφ.Β.3.1) . Παρουσιάζεται η εικόνα από το πήκτωμα:

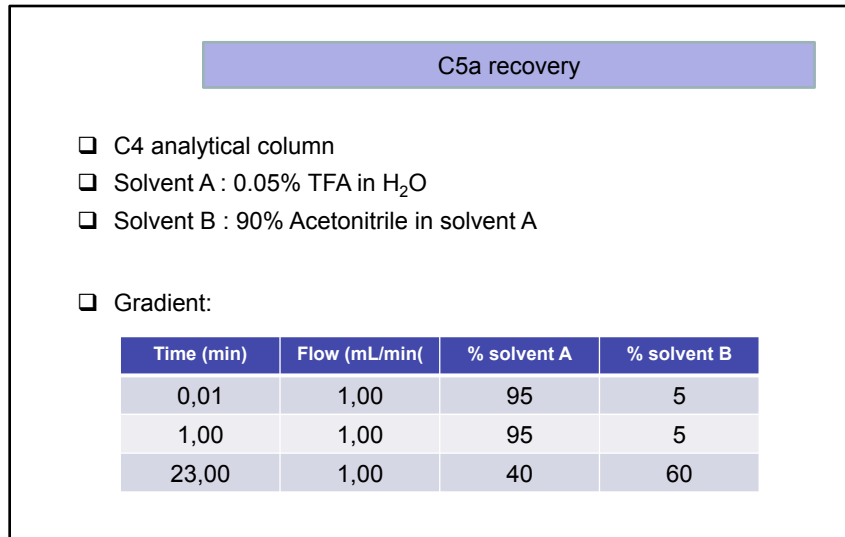


Εικ.3.2. : Πήκτωμα ποσοτικοποίησης C5a. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα λυσοζύμης συγκέντρωσης από 6 έως 0,5 μg/ml. Η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος υπολογίστηκε από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

Γ.1.2 Καθαρισμός C5a με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (HPLC) και υπολογισμός της τελικής του συγκέντρωσης

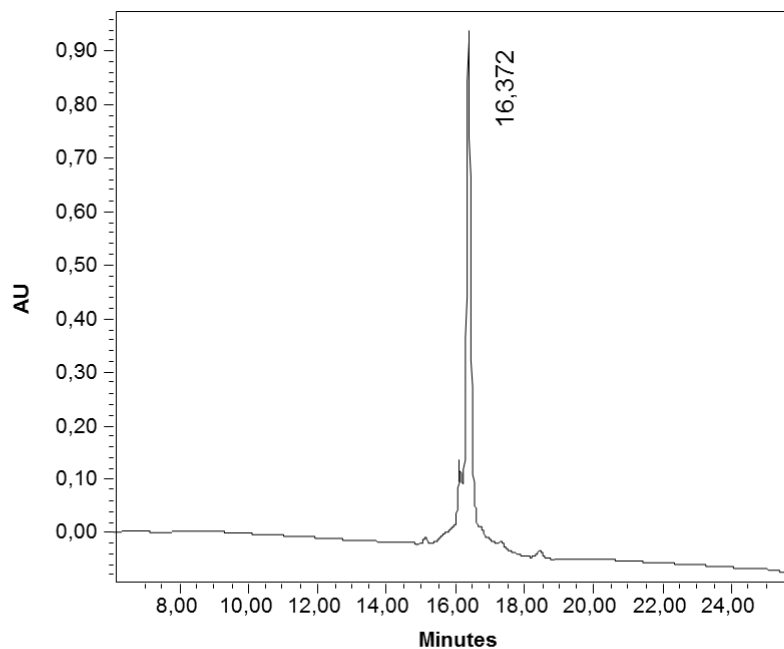
Για τη χρήση του πεπτιδίου σε πειραματικά πρωτόκολλα ήταν απαραίτητο να γίνει περαιτέρω καθαρισμός με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (HPLC) , ώστε να επιτευχθεί υψηλή καθαρότητα δείγματος.Ο καθαρισμός με HPLC και η λυοφιλοποίηση έγιναν στο εργαστήριο Ανοσοπεπτιδικής χημείας της Δρ.Ε.Λιβανίου, από τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ.Χ.Καραχάλιου.

Στη στήλη SiO₂ που χρησιμοποιήθηκε η στατική μη πολική φάση φέρει αλκύλια με τέσσερα άτομα άνθρακα, ενώ η κινητή φάση μίγμα H₂O/TFA (συντηρητικό) με ακετονιτρίλιο.



Πίν.3.1.: Χρησιμοποιήθηκε στήλη (C4) και μίγμα H₂O/TFA (ανόργανος διαλύτης) με ACN (οργανικός διαλύτης). Ο χρόνος έκλουσης του μορίου C5a ήταν 23 λεπτά περίπου.

Το χρωματογράφημα φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικ.3.3.: Χρωματογράφημα C5a. Όσο πιο καθαρό είναι το δείγμα τόσο μικρότερο το εύρος της κορυφής.

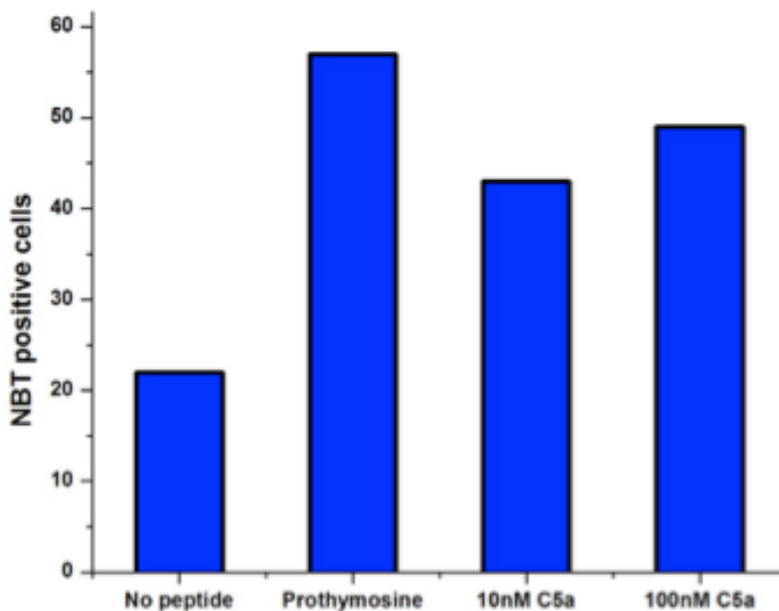
Ακολούθησε διπλή λυοφιλοποίηση και ανασύσταση της πρωτεΐνης σε στείρο διάλυμα PBS.

Γ.1.3 Έλεγχος ενεργότητας C5a πεπτιδίου.

Ο έλεγχος της ενεργότητας του μορίου C5a κρίθηκε απαραίτητος προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η αναδίπλωση (refolding) του μορίου μετά από τον καθαρισμό ήταν επιτυχής, επαναφέροντας τη σωστή τριτοταγή διαμόρφωση του μορίου και επιτρέποντας εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί το C5a στα πειράματα με τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος.

Για τον έλεγχο της βιοδραστικότητας του C5a χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (NBT) σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR και ανταποκρίνονται άμεσα με επαγωγή οξειδωτικής «έκρηξης» και ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τέτοια κύτταρα είναι τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα Raw 264. Ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφ. Β.5, έγινε επώαση με το μόριο C5a σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις 10 και 100 nM. Χρησιμοποιήθηκε προθυμοσίνη-α ως θετικός μάρτυρας γιατί είναι γνωστό από άλλες μελέτες ότι επάγει την παραγωγή ελευθερών ριζών O₂ (ROS), δίνοντας θετική χρώση στη δοκιμασία NBT με ουδετερόφιλα.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Ανοσολογίας του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ο. Τσιτσιλώνη και με τη βοήθεια της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Π. Σαμαρά. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των κυττάρων που έδωσαν θετική χρώση συνοψίζονται στο παρακάτω γράφημα, όπου υπολογίστηκε το ποσοστό ενεργοποίησης για κάθε ουσία.



Εικ.3.4.: Δοκιμασία NBT. Απεικονίζεται το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων που έδωσαν θετική αντίδραση.

Όπως είναι φανερό στην εικόνα, το C5a επάγει διαμέσω πρόσδεσής του στον C5aR1 απόκριση οξειδωτικής έκρηξης στα κύτταρα και αναγωγή του κυανού του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT), σε ποσοστά που πλησιάζουν τα επίπεδα του θετικού μάρτυρα, και στις δύο συγκεντρώσεις 10 και 100 nM που ελέγχθηκαν. Αυτό σημαίνει ότι το πεπτίδιο είναι βιολογικά ενεργό και κατάλληλο για πειράματα μελέτης της δράσης του στα κύτταρα.

Γ.2 Έλεγχος της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 (CD88) σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος.

Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι τα αστροκύτταρα και τα προγονικά τους κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς αναφυλατοξινών και μπορούν να παράγουν συστατικά του συμπληρώματος, και με δεδομένο ότι το γλοιοβλάστωμα προέρχεται από αυτό τον κυτταρικό τύπο, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι αυτό θα συμβαίνει και στο σύστημα των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος που μελετώνται. Έτσι ακολούθησαν πειράματα ελέγχου της έκφρασης του υποδοχέα C5aR1 στην επιφάνεια των κυττάρων και ανίχνευσης της έκκρισης συστατικών του συμπληρώματος στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών.

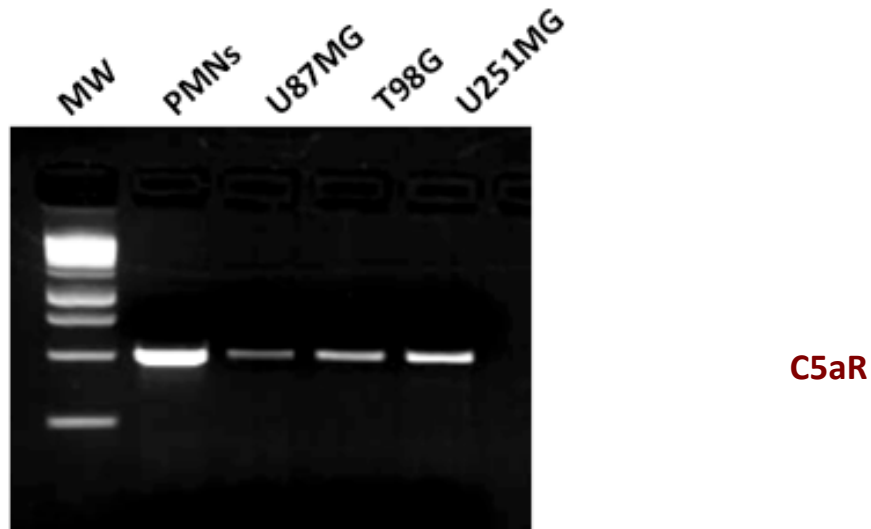
Γ.2.1 Οι κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος εκφράζουν τον υποδοχέα του C5a, C5aR1

Για τη διεξαγωγή *in vitro* πειραμάτων που αφορούν την επίδραση του C5a σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος ήταν αναγκαίο πρωτίστως να ελεγχθεί εάν αυτά εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1. Ελέγχθηκαν οι κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87-MG, T98-G, U251-MG και σαν κύτταρα-μάρτυρες επιλέχθηκαν ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (PMNs), τα οποία είναι γνωστό ότι αποκρίνονται σε χημειοτακτικά σήματα φλεγμονωδών μορίων, μεταξύ άλλων και στο C5a.

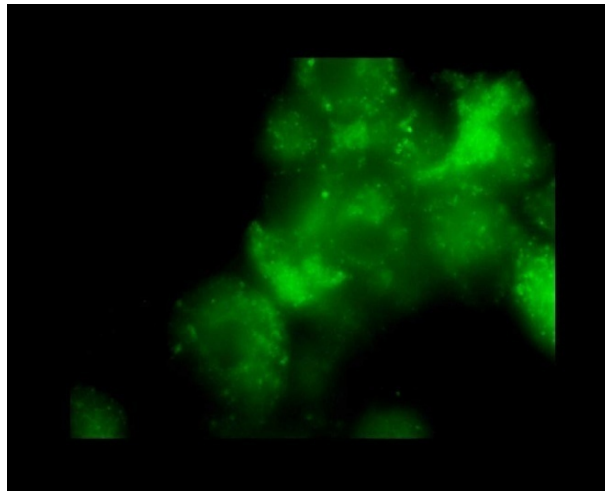
Πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος για την έκφραση του υποδοχέα C5aR1 τόσο σε επίπεδο mRNA, με RT-PCR, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής, όπου χρησιμοποιήθηκε C5a συζευγμένο με φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Ακόμα έγινε και ανάλυση με ανοσοτύπωμα κατά Western, όπου χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα C5aR1.

Από όλες τις παραπάνω μεθόδους επιβεβαιώθηκε ότι τα γλοιοβλαστωματικά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1 (CD88). Όλες οι σειρές εκφράζουν το γονίδιο του υποδοχέα, όπως προκύπτει από τη δοκιμασία RT-PCR μετά από σύγκριση με τη ζώνη DNA των ουδετεροφίλων και το μάρτυρα μοριακών μεγεθών (Εικ 3.5). Επώαση κυττάρων με πεπτίδιο C5a συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (GFP-C5a) δίνει έντονο σήμα φθορισμού, μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα ίδια συμπεράσματα εξάγονται και ποσοτικά, από τα πειράματα FACS, στα οποία έχουμε αυξημένο φθορισμό με την προσθήκη του GFP-C5a και μείωση αυτού όταν προστίθεται μη σημασμένο πεπτίδιο. Το μη σημασμένο C5a ανταγωνίζεται το σημασμένο για την πρόσδεση στον υποδοχέα και έτσι έχουμε

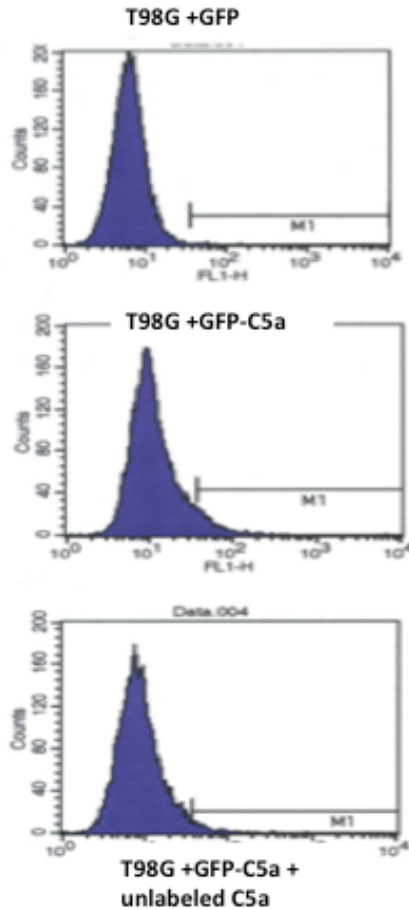
μειωμένο σήμα. Άρα το C5a προσδένεται σε ειδικό για το πεπτίδιο υποδοχέα στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων γλοιοβλαστώματος (Εικ.3.5-3.8).



Εικ.3.5: Έλεγχος έκφρασης mRNA με RT-PCR.Γίνεται αντίστροφη μεταγραφή του mRNA που έχει παραχθεί στο κύτταρο και παραγωγή cDNA του γονιδίου του C5aR.Τα δείγματα τρέχουν σε πήκτωμα αгарόζης, για μερικό προσδιορισμό της ποιότητας και ποσότητας του DNA, καθώς και εκτίμηση του μεγέθους των μορίων με τη χρήση γνωστού δείκτη-marker.Το πήκτωμα περιέχει βρωμιούχο-αιθίδιο, το οποίο φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. Έτσι ποσοτικοποιούνται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με ανάλυση της έντασης της ζώνης στα δείγματα.

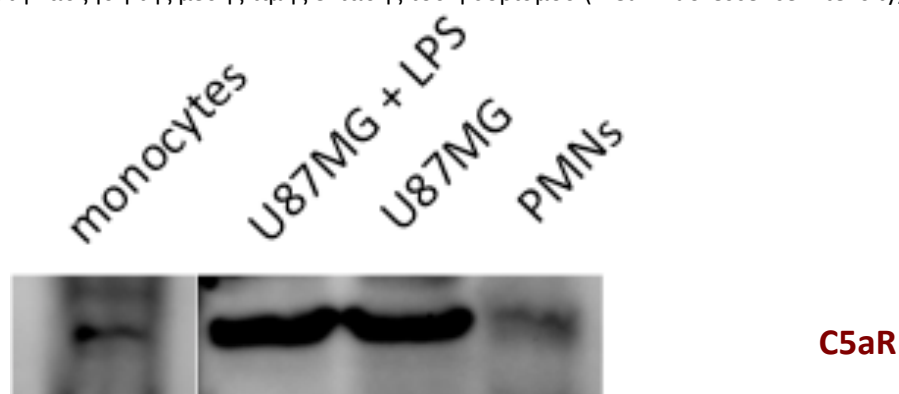


Εικ.3.6: *In situ* ανοσοφθορισμός με χρήση GFP-C5a για ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα σε μονιμοποιημένα κύτταρα της σειράς T98-G. Φωτογραφία από μικροσκόπιο φθορισμού.Η πράσινη στίξη στα κύτταρα δηλώνει παρουσία του υποδοχέα C5aR1.



Sample	Mean fluorescence (M1 values)
T98G glioma (cells only)	5,49 (M1=56,10)
T98G glioma +GFP(250 nM)	6,50 (M1=56,39)
T98G glioma +GFP-C5a (250nM)	14,29* (M1=859,45)*
T98G glioma +GFP-C5a +unlabeled C5a	9,94* (M1=60,74)*

Εικ.3.7: Κυτταρομετρία ροής (FACS) για μελέτη της έκφρασης του C5aR1 στη μεμβράνη των κυττάρων T98-G. Έγινε επώαση με GFP-C5a και με μη σημασμένο C5a, ώστε να ελεγχθεί η ειδικότητα πρόσδεσης στον C5aR1 σε πείραμα εκτόπισης του σημασμένου GFP-C5a. Η δεξιά μετατόπιση του ιστογράμματος αντιστοιχεί στην αύξηση της μέσης τιμής έντασης του φθορισμού (mean fluorescence intensity, MFI).



Εικ.3.8: Ανοσοαποτύπωμα (Western-Blot) πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων σειρών γλοιοβλαστώματος με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος anti-C5aR1. Χρησιμοποιήθηκε επιπλέον σαν θετικός μάρτυρας έκφρασης C5aR, εκχύλισμα κυττάρων που είχαν προεπωστεί με LPS (συστατικό της μεμβράνης των βακτηρίων που επάγει φλεγμονώδη απόκριση και αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης C5aR1).

Γ.2.2 Τα καρκινικά κύτταρα U87-MG παράγουν ενδογενώς συστατικά του συμπληρώματος.

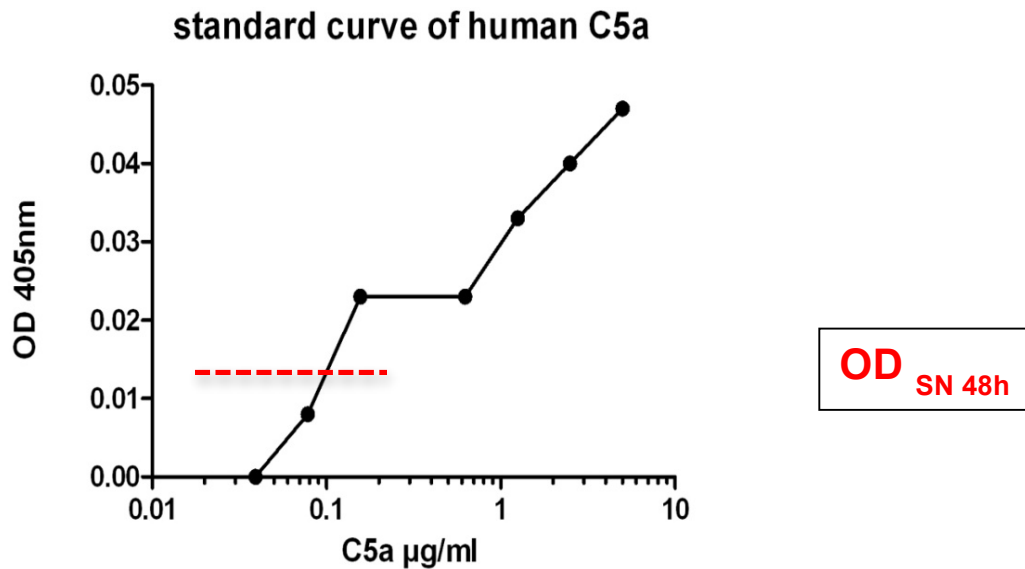
Γνωρίζοντας ότι διάφοροι τύποι καρκίνου παράγουν ενδογενώς μόρια του συμπληρώματος και ειδικότερα το μόριο C5a (38) καθώς επίσης ότι οι κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος που μελετήσαμε εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1, εξετάστηκε κατά πόσον τα ίδια τα κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν στο υπερκείμενο καλλιέργειας το φυσιολογικό προσδέτη του υποδοχέα, το μόριο C5a . Επίσης ελέγχθηκε στη συνέχεια αν παράγουν βασικά συστατικά του συμπληρώματος, όπως το C3 και το C5. Γνωρίζοντας ότι η ακτινοβολήση (π.χ. σε πρωτόκολλα ακτινοθεραπείας) έχει συνδεθεί με ένα μικροπεριβάλλον φλεγμονής στον καρκίνο (9), εξετάστηκε κατά πόσον η ακτινοβολήση προκαλεί ενεργοποίηση του κεντρικού συστατικού του καταρράκτη του συμπληρώματος, C3. Η μέτρηση της ενεργοποίησης εστιάστηκε στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό της παρουσίας θραυσμάτων του C3 (C3b/iC3b/C3c) σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων U87MG τόσο πριν όσο και μετά από έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

Για όλες τις ανοσοενζυμικές δοκιμασίες (ELISA) συλλέχθηκαν υπερκείμενα καλλιέργειών κυττάρων U87MG με ή/και χωρίς επίδραση με ακτινοβολήση με μια μέση θεραπευτική δόση 3Gy. Τα υπερκείμενα προέρχονται από 24h ή 48h καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό, καθώς σε αυτόν μπορεί να περιέχονται πρωτεάσες που θα μπορούσαν να αποδομήσουν τα πεπτίδια . Πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων μετά τη συλλογή για κανονικοποίηση των δειγμάτων ως προς τον αριθμό των κυττάρων.

Τα κύτταρα U87MG παράγουν και εκκρίνουν στο θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο C5a

Για να ελεγχθεί εάν τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG παράγουν ενδογενές C5a στο υπερκείμενο καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε ανοσοενζυμική δοκιμασία C5a ELISA, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα εμπορίου αντι- ανθρώπινου C5a έναντι δείγματος υπερκείμενου 48h καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό (κεφ Β.8.3). Προηγήθηκε κατακρήμνιση του δείγματος με TCA και συγκέντρωση 400X (κεφ Β.9), επειδή η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι επαρκής για την ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων, όπως αυτές των αναφυλατοξινών, στο δείγμα.

Σαν θετικός μάρτυρας στη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένο ανθρώπινο C5a υψηλής καθαρότητας, με τις αραιώσεις του οποίου προκύπτει μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς γνωστής βαθμίδωσης συγκέντρωσής του, που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του C5a στο δείγμα του υπερκείμενου (Εικ.3.9). Το δείγμα του υπερκείμενου είχε μια τιμή απορροφήσεως που αντιστοιχεί στο σημείο της καμπύλης μεταξύ 0,08 και 0,15μg/ml C5a. Άρα με υπολογισμούς προέκυψε ότι στο υπερκείμενο καλλιέργειας 48h U87MG ανιχνεύθηκε μόριο C5a σε συγκέντρωση **0,25ng/ml ή 25pM**.



Εικ.3.9: Καμπύλη αναφοράς C5a. Το δείγμα του υπερκειμένου είχε τιμή οπτικής απορρόφησης =0,013.

Το πείραμα αυτό επιβεβαιώνει ότι πηγή του C5a είναι τα ίδια τα κύτταρα, U87MG . Μια πιθανή εξήγηση για το πώς έχει παραχθεί το πεπτίδιο είναι να προκύπτει από πέψη ενδογενώς παραγόμενου και εκκρινόμενου στο θρεπτικό μέσο C5 από πρωτεάσες που εκκρίνονται από τα ίδια καρκινικά κύτταρα και δρουν ενζυμικά στην ίδια θέση με τη C5 κονβερτάση. Άλλη μια υπόθεση που συμφωνεί με τα δεδομένα από μελέτη υπερκειμένων καλλιιεργειών νευρικών κυττάρων είναι ότι τα κύτταρα του συστήματός μας είναι ικανά προς παραγωγή όλων των πρωτεϊνών του συμπληρώματος,μαζί και αυτών που απαιτούνται για την παραγωγή της κονβερτάσης.Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκε η C3 ELISA.

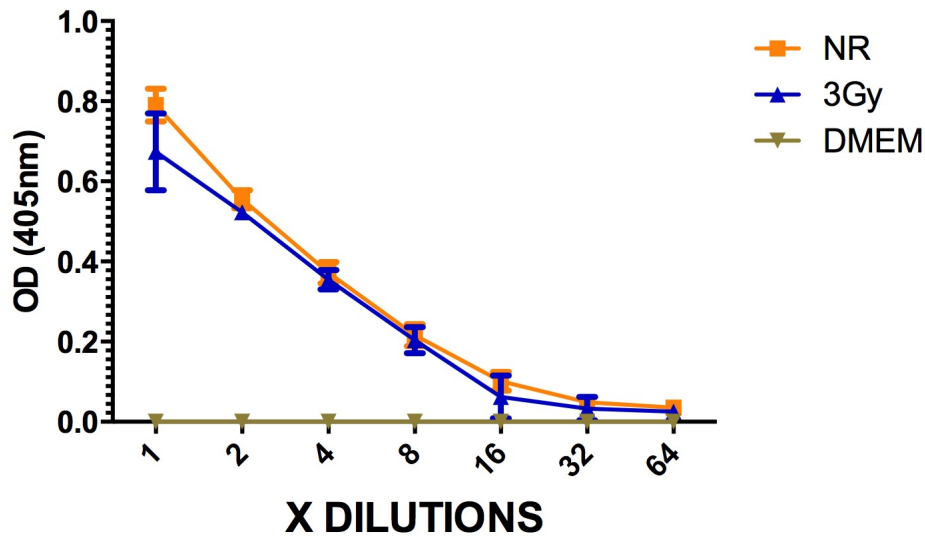
Τα κύτταρα U87MG παράγουν και εκκρίνουν στο θρεπτικό καλλιιεργητικό μέσο C3.

Εκτός από τον έλεγχο της παραγωγής του βασικού συστατικού ενεργοποίησης του συμπληρώματος C3, ερευνήθηκε επιπλέον και η επίδραση της ακτινοβολίας στην ενδογενή παραγωγή του μορίου, καθώς προσφάτη μελέτη υποδεικνύει ότι η ακτινοβολία κατά την ακτινοθεραπεία οδηγεί σε τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε καρκινικούς ιστούς (36) .

Για την ανίχνευση ενδογενούς παραγωγής C3 πραγματοποιήθηκε ανοσοενζυμική δοκιμασία C3 ELISA (κεφ.Β.8.1), χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-C3 έναντι δείγματος υπερκειμένου 24h καλλιιεργειας σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό. Συλλέχθηκαν υπερκείμενα 24h από κύτταρα που είχαν/δεν είχαν ακτινοβοληθεί με ιοντίζουσα ακτινοβολία σε δόση 3Gy.Τα δείγματα των υπερκειμένων συγκεντρώθηκαν 40 X με φίλτρο AMICON (κεφ.Β.4).

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων μετρήθηκαν λιγότερα κύτταρα, όπως αναμένεται, από τις φλάσκες που είχαν ακτινοβοληθεί, όμως έγινε ανάλογη προσαρμογή των δειγμάτων για τη δοκιμασία. Ο λόγος του αριθμού των κυττάρων ήταν αντιστρόφως ανάλογος με το δείγμα υπερκειμένου που ελέγχθηκε. Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό σαν αρνητικός μάρτυρας και C3 πρωτεΐνη ως θετικός μάρτυρας για τη δοκιμασία και για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Όπως διαπιστώθηκε αναλύοντας τα δεδομένα του πειράματος, στα δείγματα των υπερκειμένων ανιχνεύτηκαν μεγάλες ποσότητες ενδογενώς παραγομένου μορίου C3 (Εικ.3.10).

C3 levels in U87MG culture sup.24h post IR



Εικ.3.10: Καμπύλη έκκρισης C3 από κύτταρα U87MG σε υπερκείμενα καλλιέργειας 24h.

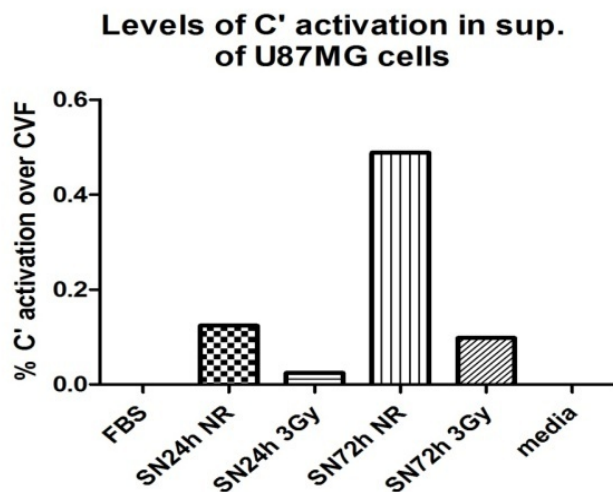
Η παραγωγή και η έκκριση C3 στο υπερκείμενο καλλιέργειας U87MG παραμένει σταθερή σε συνθήκες ακτινοβολίας .

Καμία αλλαγή στα επίπεδα παραγωγής του μορίου δεν παρατηρήθηκε έπειτα από επίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία . Ωστόσο, ίσως η ακτινοβολία να επάγει την ενεργοποίηση του κεντρικού συστατικού του συμπληρώματος C3, μέσω της οδού των κονβερτασών . Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα έγινε ανοσοενζυμικός προσδιορισμός της παρουσίας θραυσμάτων του C3 (C3b/iC3b/C3c) σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων U87MG, τόσο πριν όσο και μετά από έκθεση αυτών σε ιοντίζουσα ακτινοβολία .

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση C3 θραυσμάτων ήταν η ELISA μέτρησης ενεργοποίησης C3 (κεφ.Β.8.2). Συλλέχθηκαν από καλλιέργεια U87MG, υπερκείμενα 24h & 72h, μετά από/ χωρίς επίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία σε δόση 3Gy. Τα δείγματα ήταν συγκεντρωμένα 40X. Σαν θετικός μάρτυρας στη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο πλάσμα με ενεργοποιημένο συμπλήρωμα από το αντιγόνο του δηλητηρίου της κόμπρας (CVF-Cobra Venom Factor). Με βάση τις αραιώσεις του CVF -ενεργοποιημένου πλάσματος δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς, όπου αντιστοιχίζεται η οπτική απορρόφηση κάθε

αραιώσης με το ποσοστό ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Εκτός από τα δείγματα των υπερκειμένων ελέγχθηκε και ο ορός που περιέχεται στο καλλιεργητικό μέσο για την παρουσία ενεργών συστατικών του συμπληρώματος (συγκεντρώθηκε 40 X, όπως και τα δείγματα).

Με βάση την αραιώση του CVF-ενεργ.πλάσματος που αντιστοιχεί σε 50% ενεργοποίηση του συμπληρώματος, υπολογίστηκε το ποσοστό ενεργοποίησης για τα δείγματα (εικ.3.11).



Εικ.3.11: Ποσοστό % ενεργοποίησης συμπληρώματος σε δείγματα υπερκειμένων καλλιέργειας κυττάρων U87MG πριν και μετά την επίδραση με ακτινοβολήση.Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο.

Όπως διαπιστώθηκε μετά από την ανάλυση των μετρήσεων για τα δείγματα των 24h και 72h, οι τιμές ενεργοποίησης ήταν πρακτικά μηδενικές, λαμβάνοντας υπόψη ότι πρόκειται για συγκεντρωμένα δείγματα.Το ίδιο αποτέλεσμα έδωσαν και οι μετρήσεις στο δείγμα βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS).

Δεν ανιχνεύεται στο υπερκείμενο καλλιέργειας U87MG ενεργοποίηση του συμπληρώματος που να επάγεται από ακτινοβολήση.

Η ακτινοβολήση δεν είχε κάποια επίδραση στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C3. Η μείωση που φάνηκε στο γράφημα οφείλεται σε μείωση του αριθμού των κυττάρων λόγω του επαγόμενου από την ακτινοβολήση κυτταρικού θανάτου, καθώς δεν έγινε ποσοτική προσαρμογή των δειγμάτων.Από τα παραπάνω δεδομένα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει ενεργοποίηση των συστατικών του συμπληρώματος σε in vitro καλλιέργεια κυττάρων U87MG μέσω της οδού των κονβερτασών, και το ενδογενές C5a που ανιχνεύτηκε προέρχεται από άλλο μονοπάτι παραγωγής.

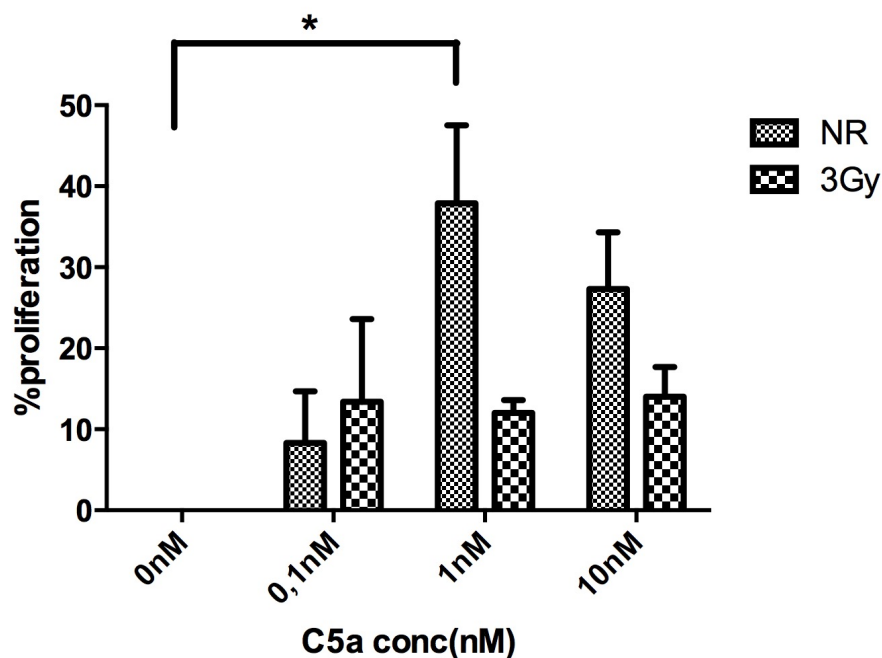
Γ.3 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

Βάσει ερευνητικών δεδομένων, σύμφωνα με τα οποία συστατικά του συμπληρώματος προάγουν τον πολλαπλασιασμό σε καρκινικά κύτταρα, και γνωρίζοντας ότι το C5a προάγει τον πολλαπλασιασμό αδιαφοροποίητων ανθρωπίνων κυττάρων νευροβλαστώματος (87) και νευρικών κυττάρων σε καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης του C5a, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της καρκινικής σειράς γλοιοβλαστώματος U87MG. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε τυχόν διαφοροποίηση της δράσης του C5a παρουσία ιοντίζουσας ακτινοβολίας .

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με το δείκτη μιτοχονδριακής αναπνοής MTT. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται αναλυτικά στο κεφ. Β.6.3 . Έγινε επώαση με το μόριο C5a, σε συγκέντρωση 0,1-1-10nM, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με ακτινοβολία .Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο.

Το C5a αυξάνει τον πολλαπλασιασμό στα κύτταρα U87MG ακόμα και παρουσία ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

%U87MG cell proliferation C5a treatment 48h

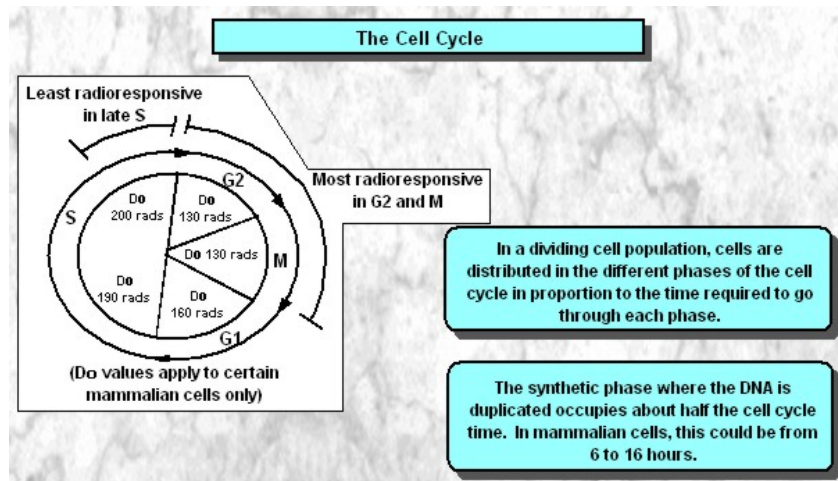


Εικ.3.12: Ποσοστό % πολλαπλασιασμού U87MG μετά από επώαση με C5a ,χωρίς (λεπτόστικτες μπάρες) και με (μπάρες με τετράγωνα) επίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία 3Gy.

Στη μέτρηση του ποσοστού των ζώντων κυττάρων μετά από 48h, εντοπίστηκε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλες τις δόσεις C5a που ελέγχθηκαν, με τη δόση 1nM να επάγει στατιστικά σημαντική αύξηση (T-test) που πλησιάζει το 40%. Η ευνοϊκή δράση του C5a στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων συνέχισε να υφίσταται ακόμα και υπό την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, όπου παρά τη σαφή πτώση του πολλαπλασιασμού λόγω του επαγόμενου από την ακτινοβολία θανάτου των κυττάρων, οι τιμές σε όλες τις δόσεις C5a ήταν αυξημένες σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (θρεπτικό μέσο).

Γ.4 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG.

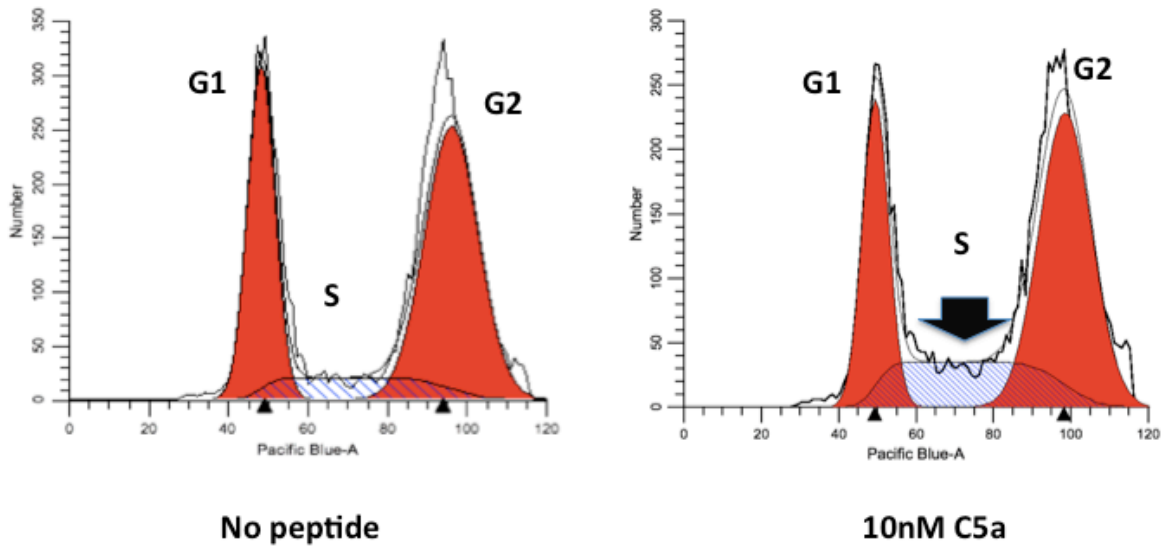
Γνωρίζοντας ότι οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου **G1**, **S**, **G2**, **M** διαφέρουν ως προς την ακτινοευαισθησία και ότι η φάση **S** του κυτταρικού κύκλου (φάση αντιγραφής του γενετικού υλικού) είναι μια από τις πιο ανθεκτικές στην ακτινοβολία, κρίθηκε αναγκαία η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα της σειράς U87MG. Στα πειράματα αυτά διερευνήθηκε εάν το C5a επηρεάζει την κατανομή των φάσεων κυτταρικού κύκλου σε ένα δεδομένο πληθυσμό κυττάρων, ωθώντας τα κύτταρα προς είσοδο σε μια περισσότερο ή λιγότερο ανθεκτική φάση.



Εικ.3.13: Κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου (144) .

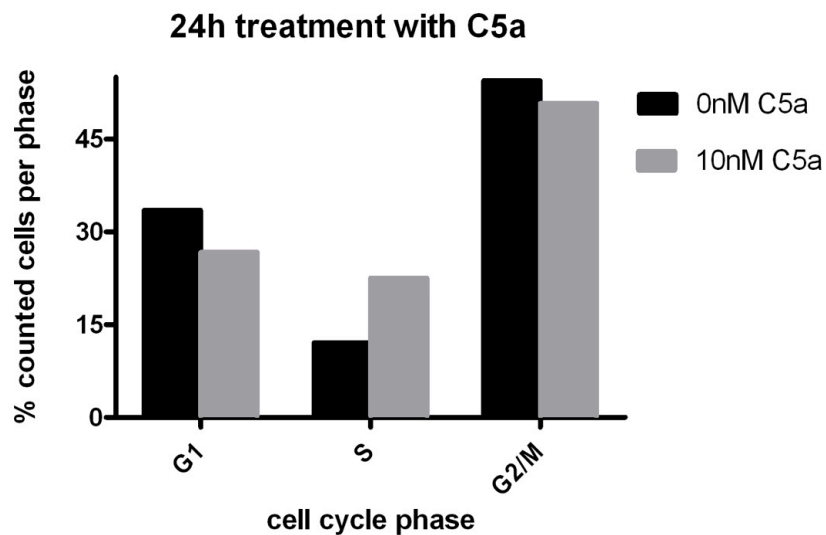
Έγιναν πειράματα ανάλυσης κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACS -κεφ.Β.6.5.) σε δύο ομάδες συγχρονισμένης/ασυγχρόνιστης καλλιέργειας κυττάρων της σειράς U87-MG. Στη συγχρονισμένη καλλιέργεια έγινε στέρωση ορού, έτσι ώστε όλα τα κύτταρα να εκκινούν από τη φάση G1. Ελέγχθηκαν οι δόσεις C5a 0,1-1-10nM και συλλέχθηκαν τα κύτταρα έπειτα από επώαση 24h-48h. Οι μετρήσεις έγιναν στο τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ σε συνεργασία με το μεταπτυχιακό φοιτητή Ν. Παπαϊωάννου και υπό την επίβλεψη της Δρ. Ο. Τσιτσιλώνη.

Τόσο στη συγχρονισμένη όσο και στην ασυγχρόνιστη καλλιέργεια παρατηρήθηκε ότι επώαση των κυττάρων για 24h με 10nM C5a είχε ως αποτέλεσμα μείωση του ποσοστού κατανομής τους στην φάση G1 με ταυτόχρονη αύξηση της φάσης S (διαγραμματισμένο εμβαδό, βλ.Εικ.3.14-3.15).



Εικ.3.14: Ιστογράμματα, κατανομής των κυττάρων U87MG στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, όπως προκύπτουν μετά από επεξεργασία στο πρόγραμμα ModFit, μετά από την μέτρηση με FACS.

Το C5a προάγει την είσοδο των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87MG στην ακτινοανθεκτική φάση S του κυτταρικού κύκλου



Εικ.3.15: Κατανομή φάσεων κυτταρικού κύκλου κυττάρων U87MG, έπειτα από 24^h επώαση με C5a. Η φάση S σχεδόν διπλασιάζεται, ενώ μειώνεται το ποσοστό των κυττάρων στην G1.

Τα κύτταρα δηλαδή ενεργοποιούνται παρουσία του μορίου και μεταπίπτουν από τη φάση ηρεμίας G1 στη φάση S, που είναι η φάση αντιγραφής του DNA. Επομένως το C5a φαίνεται ότι κατευθύνει τα κύτταρα προς μια ανθεκτική στην ακτινοβολία φάση, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι ίσως με αυτό τον τρόπο να ευνοεί την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες ακτινοθεραπείας. Έτσι ακολούθησε μελέτη του ρόλου του C5a στην επιβίωση των κυττάρων U87MG, παρουσία ιοντίζουσας ακτινοβολίας, με μια κλασική μέθοδο, που είναι η δοκιμασία επιβίωσης κλώνων .

Γ.5 Μελέτη της επίδρασης του μορίου C5a στην επιβίωση των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

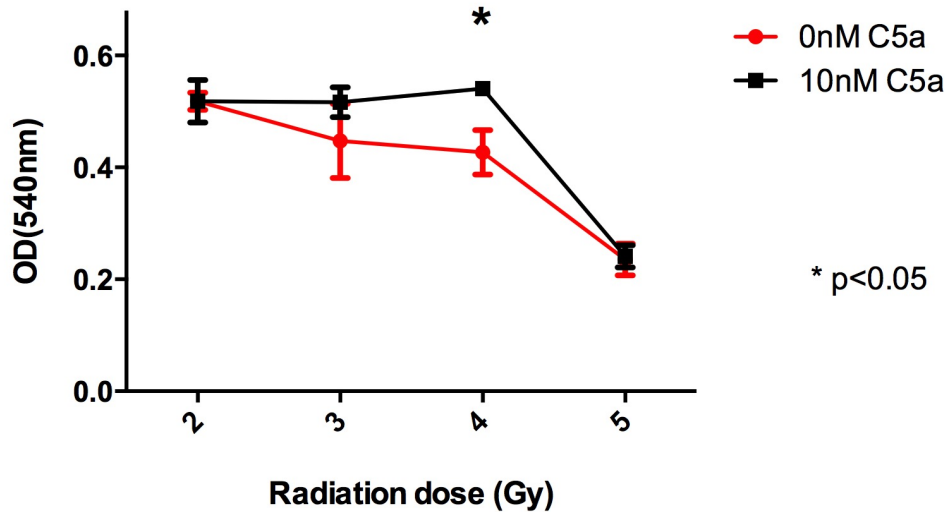
Είναι γνωστό ότι το γλοιοβλάστωμα είναι καρκίνος με αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα σε θεραπείες με ακτινοβολία. Έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και μετά την ακτινοθεραπεία, ο καρκίνος επανεμφανίζεται μάλιστα με πιο διεισδυτικό φαινότυπο (145). Στόχος των ακόλουθων πειραμάτων ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της αναφυλατοξίνης C5a στην επιβίωση των κυττάρων και στην ικανότητα δημιουργίας κλώνων που θα δώσουν γένεση σε νέους όγκους , μετά από επίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία, σε δόσεις που πλησιάζουν αυτές που εφαρμόζονται στα διάφορα ακτινοθεραπευτικά σχήματα.

Για τη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε δοκιμασία επιβίωσης κλώνων (Clonogenic survival assay) , ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφ.Β.6.2 . Έγινε έλεγχος της επιβίωσης σε κύτταρα U87-MG, προσθέτοντας C5a σε συγκέντρωση 10nM και ακτινοβολώντας στη συνέχεια τα κύτταρα σε πηγή κοβαλτίου με διαδοχικές δόσεις από 1 έως 5 Gy.

Το C5a έχει ακτινοπροστατευτικό ρόλο και ευνοεί την επιβίωση σε συνθήκες ακτινοβολίας

Στα κύτταρα χωρίς C5a παρατηρήθηκε ,όπως αναμενόταν, πτώση στην επιβίωση, λόγω του επαγόμενου από την ακτινοβολία κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, στις δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας 3-4Gy, όπου έχουμε μια εμφανή αρνητική επίδραση στα κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη C5a αύξησε αισθητά την επιβίωση των κυττάρων U87MG, σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό, για την δόση 4Gy (T-test ανάλυση, βλ.γράφημα εικ.3.16).

Clonogenic survival assay U87MG



Εικ.3.16: Δοκιμασία επιβίωσης κλώνων σε κύτταρα της σειράς U87MG. Απεικονίζεται η οπτική απορρόφηση, που είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων που επιβίωσαν μετά την ακτινοβολία, σε συνάρτηση με τη δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Τα ευρήματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι το C5a δρα προστατευτικά στα κύτταρα κατά την επαγωγή οξειδωτικού stress που προκαλείται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, ευνοώντας την επιβίωση των κυττάρων και την ικανότητα δημιουργίας νέων κλωνικών αποικιών.

Γ.6 Έλεγχος της επίδρασης του μορίου C5a στη διεισδυτικότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG

Μια πολύ σημαντική ιδιότητα που καθιστά επιθετικό τον καρκινικό όγκο είναι η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της εξωκυττάριας μήτρας, είτε σε γειτονικούς υγιείς ιστούς, είτε στο αγγειακό ενδοθήλιο και διαμέσου της κυκλοφορίας σε απομακρυσμένους ιστούς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων. Η ικανότητα αυτή των κυττάρων σχετίζεται τόσο με την έκκριση μεταλλοπρωτεασών, ενζύμων που αποδομούν τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, όσο και με την ικανότητα διήθησής τους. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες και των δύο ιδιοτήτων στα κύτταρα της σειράς U87MG.

Γ.6.1. Έλεγχος της επίδρασης του μορίου C5a στην παραγωγή και έκκριση μεταλλοπρωτεασών στο υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων U87-MG.

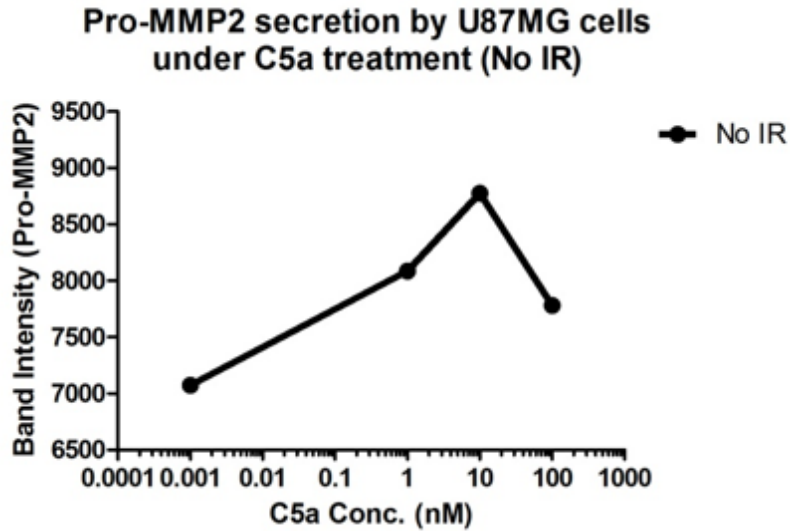
Είναι γνωστό ότι τα συστατικά του συμπληρώματος προάγουν την διείσδυση του καρκίνου σε παρακείμενους ιστούς και τη μετάσταση(87). Σύμφωνα με μελέτες,στη διαδικασία αυτή, εμπλέκονται μονοπάτια που έχουν συνδεθεί με ενεργοποίηση του υποδοχέα C5aR (113), όπως το PI3K-AKT (145) ,(146) και ERK (146), καθώς επάγουν την έκκριση μεταλλοπρωτεασών , όπως η MMP-2 (145). Ακόμα γνωρίζουμε ότι το C5a επάγει σε ουδετερόφιλα την έκκριση και ενεργοποίηση της μεταλλοπρωτεάσης MMP-9 (147). Στόχος των πειραμάτων ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει ανάλογη δράση του C5a σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, δηλαδή επαγωγή διαμέσου πρόσδεσης του C5a στον υποδοχέα C5aR1 της έκκρισης μεταλλοπρωτεασών MMP-2 & MMP-9 στο καλλιεργητικό μέσο , αφού όπως έχει επιβεβαιωθεί από προηγούμενα πειράματα, αυτά εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1.

Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενζυμικής δράσης μεταλλοπρωτεασών MMP-2 & MMP-9 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ζυμογραφίας ζελατίνης. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο συλλογής υπερκειμένων και ζυμογραφήματος που περιγράφεται στο κεφ.Β7. Συλλέχθηκε υπερκείμενο 48h καλλιέργειας κυττάρων U87MG, στην οποία έγινε επώαση με C5a σε συγκεντρώσεις 1-10-100 nM και με περίσσεια του ανταγωνιστή του C5aR1 PMX53, για να ελεγχθεί η ειδικότητα της δράσης του μορίου.

Ανιχνεύθηκε στα δείγματα των υπερκειμένων ενζυμική δράση και των δύο μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9, όμως η ανάλυση της πυκνότητας των ζωνών με το πρόγραμμα IMAGE J κατέστη εφικτή μόνο για την Pro-MMP2 .

Το C5a αυξάνει την έκκριση της μεταλλοπρωτεάσης MMP-2 στο υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων U87-MG.

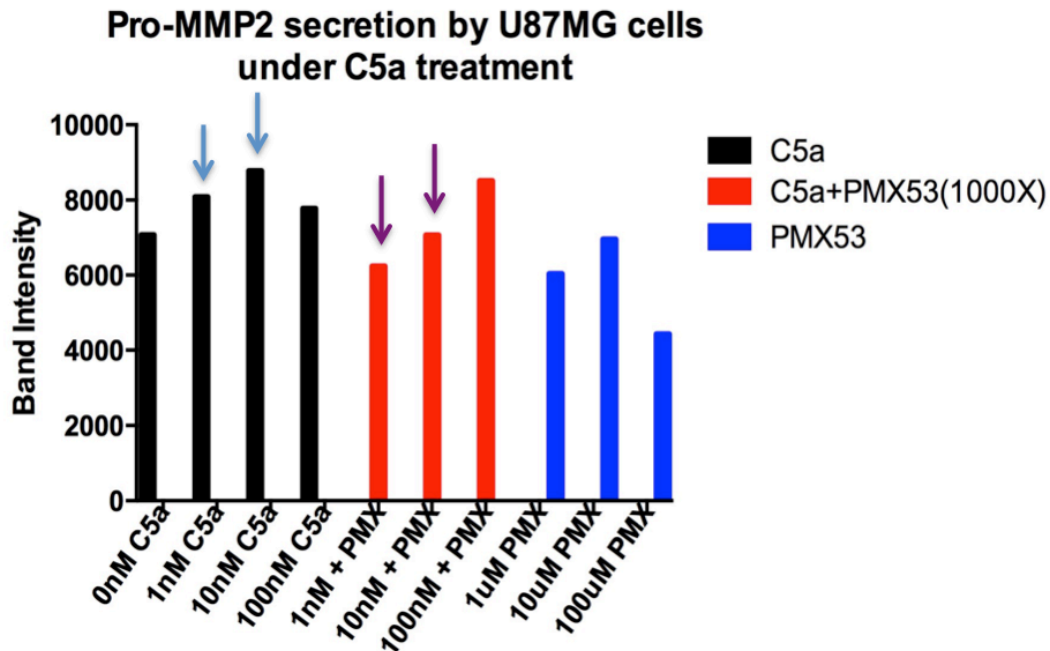
Παρατηρήθηκε μετά από ανάλυση των πηκτωμάτων στο IMAGE J ότι η επώαση των κυττάρων με C5a οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής και έκκρισης MMP-2 στο καλλιεργητικό μέσο. Στην συγκέντρωση των 10nM παρατηρήθηκε και η μέγιστη τιμή της MMP-2. Στα 100nM C5a μειώθηκε η τιμή της MMP2, κάτι που είναι αναμενόμενο,καθώς η απόκριση των κυττάρων σε ενεργοποίηση του C5aR1 έχει τη μορφή κωδωνοειδούς (bell-shaped) καμπύλης (148).



Εικ.3.17: Έκκριση προ-MMP-2 , παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μορίου C5a σε υπερκείμενα καλλιέργειας U87MG.

Η αύξηση των επιπέδων της μεταλλοπρωτεάσης MMP-2 είναι ένα φαινόμενο που σχετίζεται αποκλειστικά με την αλληλεπίδραση C5a-C5aR1.

Παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με περίσσεια ειδικού ανταγωνιστή για τον υποδοχέα του C5a (PMX53) είχε ως αποτέλεσμα την ανατροπή του φαινομένου της αύξησης της έκκρισης της MMP-2 από τα κύτταρα . Αυτό υποδεικνύει ότι το φαινόμενο είναι ειδικό και οφείλεται στην αλληλεπίδραση του C5a με τον C5aR1 (εικ.3.18).



Εικ.3.18: Μελέτη της έκκρισης MMP-2 σε υπερκείμενα καλλιέργειας U87MG, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μορίου C5a, με ή χωρίς την προσθήκη ειδικού ανταγωνιστή σε 1000πλάσια συγκέντρωση.

Επώαση μόνο με PMX53 είχε αποτέλεσμα πτώση των επιπέδων MMP-2 κάτω από αυτά του αρνητικού μάρτυρα. Θα αναμενόταν να είναι στα ίδια επίπεδα με τα αντίστοιχα δείγματα C5a+PMX53. Το φαινόμενο που παρατηρήθηκε εικάζεται ότι οφείλεται στο ότι ο ανταγωνιστής PMX53, ο οποίος προστέθηκε σε περίσσεια, ανέστειλε επιπλέον τη δράση ενδογενώς παραγομένου, από τα κύτταρα U87MG, C5a. Η υπόθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα της C5a elisa. Υπάρχουν και άλλες μελέτες που αναφέρουν αυτοκρινή δράση των αναφυλατοξινών σε καρκινικές σειρές (95).

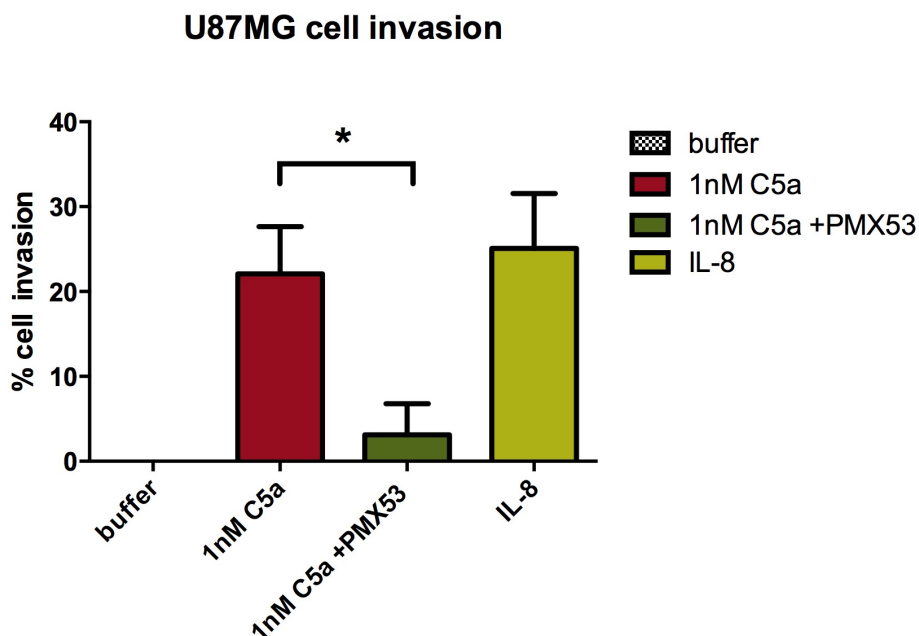
Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η επαγωγή της έκκρισης MMP-2 από το C5a μάλλον καθιστά τα κύτταρα της σειράς U87MG περισσότερο διεισδυτικά, καθώς διευκολύνεται η διήθηση της εξωκυττάριας μήτρας μέσω της ενζυμικής διάσπασης των πρωτεϊνών από τις οποίες αυτή αποτελείται. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης πραγματοποιήθηκε μια κυτταρική δοκιμασία.

Γ.6.2 Έλεγχος της επίδρασης του μορίου C5a στην ικανότητα διήθησης της εξωκυττάριας μήτρας σε κύτταρα U87MG.

Ο χημειοτακτικός ρόλος του C5a στην διεισδυτικότητα των κυττάρων U87MG και την ικανότητά τους να διαχέονται σε γειτονικούς ιστούς μελετήθηκε και άμεσα, με μια ημιποσοτική κυτταρική δοκιμασία, στην οποία ελέγχεται η ικανότητα των κυττάρων να διηθούν μια μεμβράνη πλούσια σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφ.Β.6.4.Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h με C5a σε συγκέντρωση 1nM .Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη IL-8, η οποία είναι γνωστό ότι προάγει τη διήθηση της εξωκυττάριας μήτρας σε γλοιοβλαστωματικές σειρές, μεταξύ άλλων στη σειρά U87MG (149). Ακόμα, έγινε και ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με τον ειδικό ανταγωνιστή PMX53 σε συγκέντρωση 1000X για έλεγχο της ειδικότητας του φαινομένου.

Το C5a αυξάνει την ικανότητα διείσδυσης των κυττάρων U87MG διαμέσου της εξωκυττάριας μήτρας.

Όπως φαίνεται στο ακόλουθο γράφημα, το C5a αύξησε το ποσοστό των κυττάρων που διαπέρασαν τη μεμβράνη σε ποσοστό που πλησιάζει τα επίπεδα του θετικού μάρτυρα (IL-8) . Επιβεβαιώθηκε και σε αυτό το πείραμα η ειδικότητα της επίδρασης του πεπτιδίου, καθώς με την προσθήκη PMX53 ανταγωνιστή για τον C5aR1 είχαμε σχεδόν πλήρη αναστροφή του φαινομένου, με στατιστικά σημαντική ισχύ(T-test <0,05).



Εικ.3.18: Μελέτη της ικανότητας διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας σε κύτταρα U87MG, παρουσία C5a, με ή χωρίς την προσθήκη ειδικού ανταγωνιστή PMX53. Απεικονίζεται το ποσοστό % των κυττάρων που διαπέρασαν τη μεμβράνη.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα πειράματα ζυμογραφίας και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το C5a αυξάνει την ικανότητα διείσδυσης διαμέσου της εξωκυττάριας μήτρας σε γειτονικούς ιστούς, μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών παραγωγής και έκκρισης μεταλλοπρωτεασών (π.χ. MMP-2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ. Συζήτηση

Η μελέτη της παθοφυσιολογίας του καρκίνου του εγκεφάλου είναι ένα πεδίο έρευνας ιδιαίτερα σημαντικής, εξαιτίας του πολύ χαμηλού προσδόκιμου ζωής των ασθενών εξαιτίας του πολύ χαμηλού προσδόκιμου ζωής των ασθενών με εγκεφαλικές νεοπλασίες και της συχνής επανεμφάνισης δευτερογενών εστιών νεοπλασίας, ακόμα και μετά από την εφαρμογή επιθετικών σχημάτων ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας. Κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. γίνεται διάγνωση 70.000 νέων περιστατικών πρωτογενών γλοιοβλαστωμάτων, ενώ 14.000 ασθενείς χάνουν τη μάχη με τη νόσο. Οι εγκεφαλικοί καρκίνοι είναι οι πιο κοινοί σε ηλικίες κάτω των 20 ετών και στα δύο φύλα και αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο σε άνδρες ηλικιών 20-39 (με πρώτη τις λευχαιμίες) (150). Η κλινική έκβαση αυτών των περιστατικών δεν έχει αλλάξει σημαντικά τα τελευταία χρόνια, παρά τη χρήση συνδυαστικών σχημάτων θεραπείας και την πρόοδο στην κατανόηση των γενετικών και μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την περίπλοκη διαδικασία δημιουργίας νεοπλασιών στο εγκέφαλο (151, 152). Δυστυχώς υπάρχει εξαιρετικά υψηλό ποσοστό υποτροπής και επανάκαμψης του όγκου (5) που μπορεί να αγγίζει >50% των περιστατικών. Μερικές φορές τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν στον περιφερικό ιστό και δίνουν γένεση σε νέους όγκους (2), οι οποίοι συχνά είναι πιο επιθετικοί και έχουν αυξημένο βαθμό κακοήθειας. Εντούτοις οι παράγοντες που συνδέονται με την υποτροπή και την κακή αυτή πρόγνωση παραμένουν αδιευκρίνιστοι (153).

Προκλήσεις για την επιτυχία ενός θεραπευτικού σχήματος είναι η ετερογένεια των καρκινικών υποπληθυσμών, σε συνδυασμό με την χαμηλή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, που καθιστά δύσκολη την αποτελεσματική χορήγηση φαρμάκου που να στοχεύει κύτταρα του εγκεφάλου μέσω της περιφερικής κυκλοφορίας (3). Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως εμβόλια, μονοκλωνικά αντισώματα και εξατομικευμένες ανοσοθεραπείες είναι υπό κλινικές δοκιμές σε διάφορα στάδια, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν είναι έως τώρα ενθαρρυντικά.

Η ακτινοθεραπεία έπειτα από χειρουργική αφαίρεση του όγκου σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία είναι η επικρατέστερη σύγχρονη στρατηγική αντιμετώπισης της νόσου. Επιπλοκές στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας προκύπτουν εξαιτίας της επαγόμενης από το υποξικό περιβάλλον αντίστασης των γλοιομάτων στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία, η οποία ενισχύεται από την παρουσία της πηγής βλαστικών νεοπλασματικών κυττάρων που δίνει συνεχώς γένεση σε νέους όγκους ανεξαρτήτως θεραπείας (7, 154).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναζητήσει το ενδιαφέρον για την εδώ και αρκετά χρόνια γνωστή συσχέτιση καρκίνου-φλεγμονής (βλ. κεφ. Α.3.2.). Η ανάπτυξη νεοπλασίας διακρίνεται από μια φλεγμονώδη απόκριση που έχει ρόλο «δίκου μαχαιριού» στην καρκινογένεση. Τα φλεγμονώδη μονοπάτια σηματοδότησης λειτουργούν σαν ρυθμιστές της ανοσοαπόκρισης έναντι του όγκου και ταυτόχρονα εμπλέκονται στη δημιουργία ενός μικροπεριβάλλοντος ανοσοκαταστολής, ευνοϊκού για την ανάπτυξή του. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος διαδραματίζουν κεντρικό και πολυσχιδή ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς. Κατά την θεραπεία με ιονίζουσα ακτινοβολία, ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος μπορεί να ενεργοποιήσει τοπικά στην περιοχή του συμπαγούς όγκου το συμπλήρωμα. Πρόσφατες μελέτες έρχονται να υποστηρίξουν αυτή την υπόθεση και να συσχετίσουν την ακτινοθεραπεία με την τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου (36, 155). Σχετιζόμενα με τον καρκίνο T-κύτταρα, δένδριτικά και άλλα CD45+ κύτταρα, όπως και καρκινικά, μπορούν να

παράγουν αναφυλατοξίνες και υποδοχείς αναφυλατοξινών, σαν απόκριση στην ακτινοβολία.Ακόμα και κύτταρα του στρώματος μπορεί να συμμετέχουν στην παραγωγή πρωτεϊνών του συμπληρώματος.

Η υπόθεση που διατυπώσαμε στα πλαίσια αυτής της διατριβής είναι ότι η τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η επακόλουθη παραγωγή των φλεγμονωδών μορίων C3a και C5a μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της απόκρισης του καρκίνου στην ακτινοθεραπεία και στην ενίσχυση της ογκοειδικής ανοσίας, καθώς ενεργοποιεί δενδριτικά και κυτταροτοξικά CD8+ κύτταρα (36), ενώ εμπλέκεται και σε όλους σχεδόν τους μηχανισμούς προαγωγής της ανάπτυξης του όγκου (βλ.κεφ Α.3.3.). Η επαγόμενη αυτή φλεγμονώδης απόκριση από τις κλασσικές θεραπείες μπορεί να είναι κλινικά σημαντική: αδρανείς μεταστάσεις είναι εγγενώς ανθεκτικές στις συνήθεις θεραπείες, οι οποίες στοχεύουν κυρίως ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, αλλά θα μπορούσαν να είναι ευαίσθητες στη μεσολάβηση του ανοσιακού συστήματος ελέγχου(156).

Τα ενθαρρυντικά ερευνητικά ευρήματα των τελευταίων ετών,όσον αφορά την αλληλεπίδραση C5a/C5aR και την εμπλοκή της στη ρύθμιση της ανάπτυξης του όγκου για διαφόρους τύπους καρκίνου (κεφ.Α.3.3.), οδήγησαν στην υπόθεση ότι αυτή η αλληλεπίδραση ίσως να εμπλέκεται και στην παθογένεση του γλοιοβλαστώματος και μάλιστα να είναι καθοριστική της αξιοσημείωτης αντίστασής του στην επίδραση ακτινοβολίας. Η αποσαφήνιση αυτών των μηχανισμών θα μπορούσε να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών για το γλοιοβλάστωμα που θα καθιστούν τα κύτταρα λιγότερο ανθεκτικά στην ακτινοθεραπεία .

Με βάση αυτή την υπόθεση διερευνήθηκε σε πρώτο στάδιο τόσο η έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και η παρουσία στην κυτταρική μεμβράνη υποδοχέων για το C5a σε κύτταρα ανθρωπίνου γλοιοβλαστώματος διαφόρων σειρών.Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος της εξωγενούς επίδρασης με C5a στην κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αστροκυττώματος U87MG .Ακολούθησαν in vitro μελέτες ακτινοευαισθησίας που περιλάμβαναν έλεγχο της ικανότητας επιβίωσης και έλεγχο της διεισδυτικής ικανότητας, μετά από επίδραση με C5a, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με θεραπευτικές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα ανθρωπίνου γλοιοβλαστώματος εκφράζουν τον υποδοχέα C5aR1. Η έκφραση πιστοποιήθηκε σε μια σειρά από καρκινικές σειρές γλοιοβλαστώματος τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ακόμα διαπιστώθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα U87MG είναι σε θέση να παράγουν ενδογενώς συστατικά του συμπληρώματος, και ειδικότερα το μόριο C5a που αποτελεί και τον φυσιολογικό προσδέτη του υποδοχέα C5aR1/CD88. Επίσης βρεθηκε ότι τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος εκφράζουν την πρωτεΐνη του συμπληρώματος C3. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες θα χρειαστούν για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του C3 στη παθοφυσιολογία αυτού του τύπου καρκίνου. Το C5a φαίνεται να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να οδηγεί τα

κύτταρα U87MG στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, η οποία εμφανίζεται ως η πιο ανθεκτική στην ακτινοβόληση. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα C5aR1 ασκεί ακτινοπροστατευτικό ρόλο στα κύτταρα γλιοβλαστώματος σε συνθήκες εφάμιλλες με πρωτόκολλα ακτινοθεραπείας, ευνοώντας την ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης ακτινοανθεκτικών καρκινικών κλώνων. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι επώαση των κυττάρων με το μόριο C5a μπορεί να βελτιώνει την διεισδυτικότητα των κυττάρων U87MG και την ικανότητά τους να διασπούν την εξωκυττάρια μήτρα, μέσω επαγωγής της έκκρισης της μεταλλοπρωτεάσης MMP-2. Η δράση του C5a σχετίζεται με την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα C5aR1, όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση ειδικού πεπτιδικού ανταγωνιστή με ειδικότητα πρόσδεσης στον υποδοχέα (PMX53).

Τα παραπάνω συμπεράσματα είναι ιδιαίτερώς ενθαρρυντικά για τη συνέχιση της έρευνας σε in vivo ζωικά μοντέλα εκτοπικής ή ορθοτοπικής (ενδοκρανιακής) ανάπτυξης ανθρώπινου γλιοβλαστώματος. Επίσης θα είχε ενδιαφέρον να γίνουν αντίστοιχες μελέτες του ρόλου του σηματοδοτικού άξονα C5a/C5aR1 σε συγγενή ζωικά μοντέλα ανάπτυξης γλιοβλαστώματος (π.χ. με τη χρήση γλοιωματικών κυττάρων GL261), που θα επιτρέψουν τη διασαφήνιση του ρόλου του συμπληρώματος σε ένα σύστημα με πλήρη ανάπτυξη μηχανισμών επίκτητης αντικαρκινικής απόκρισης. Με βάση τα ευρήματα που υποδηλώνουν ότι η επίδραση του μορίου C5a και η επακόλουθη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα C5aR1 προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την έκκριση μεταλλοπρωτεασών και τη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων γλιοβλαστώματος θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η θεραπευτική παρέμβαση στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται με τη σύνδεση του C5a στον C5aR θα μπορούσε να μειώσει την ανάπτυξη του όγκου στα μοντέλα αυτά. In vivo πειράματα σε συνδυασμό με ακτινοθεραπευτικές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας θα οδηγήσουν σε πληρέστερη κατανόηση της δράσης του C5a και θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό ενός στοχευμένου μοντέλου θεραπείας του γλιοβλαστώματος, το οποίο θα καθιστά πολύ πιο αποτελεσματικά τα σημερινά ακτινοθεραπευτικά πρωτόκολλα για την αντιμετώπιση της πολύ επιθετικής αυτής εγκεφαλικής νεοπλασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

E.Βιβλιογραφία

1. Purves D AG, Fitzpatrick D, et al. Neuroscience.2nd Edition. 2001. Sinauer Associates, Inc.
2. Glioblastoma and Malignant Astrocytoma <http://www.abta.org>: American Brain Tumor Association; 2014.
3. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):319-31.
4. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(4):1253-9.
5. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.
6. Peles E, Lidar Z, Simon AJ, Grossman R, Nass D, Ram Z. Angiogenic factors in the cerebrospinal fluid of patients with astrocytic brain tumors. *Neurosurgery*. 2004;55(3):562-7; discussion 7-8.
7. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyles C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15(6):501-13.
8. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*. 2009;28(45):3949-59.
9. Schaeue D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(9):527-40.
10. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780-3.
11. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 2002;359(9311):1011-8.
12. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(28):4733-40.
13. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1058-66.
14. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-97.
15. Mastellos DC, Deangelis RA, Lambris JD. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Seminars in immunology*. 2013;25(1):29-38.
16. Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol*. 2010;47(13):2154-60.
17. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijsma O, Nieuwland R, Schwaebble WJ, et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 2002;32(6):1726-36.
18. Sjoberg AP, Manderson GA, Morgelin M, Day AJ, Heinegard D, Blom AM. Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Mol Immunol*. 2009;46(5):830-9.
19. McGrath FD, Brouwer MC, Arlaud GJ, Daha MR, Hack CE, Roos A. Evidence that complement protein C1q interacts with C-reactive protein through its globular head region. *J Immunol*. 2006;176(5):2950-7.

20. Ying SC, Gewurz AT, Jiang H, Gewurz H. Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the A chain collagen-like region of C1q. *J Immunol.* 1993;150(1):169-76.
21. Mitchell DA, Kirby L, Paulin SM, Villiers CL, Sim RB. Prion protein activates and fixes complement directly via the classical pathway: implications for the mechanism of scrapie agent propagation in lymphoid tissue. *Mol Immunol.* 2007;44(11):2997-3004.
22. Jiang H, Cooper B, Robey FA, Gewurz H. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J Biol Chem.* 1992;267(35):25597-601.
23. Pangburn MK, Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(Pt 6):1006-10.
24. Zhou W, Marsh JE, Sacks SH. Intrarenal synthesis of complement. *Kidney Int.* 2001;59(4):1227-35.
25. Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol.* 2007;44(16):3875-88.
26. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol.* 2000;165(5):2637-42.
27. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.* 1981;154(3):856-67.
28. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol.* 2008;45(8):2370-9.
29. Hourcade DE. Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets.* 2008;9(2):158-64.
30. Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci (Lond).* 2003;104(5):455-66.
31. McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, Buras J, Takahashi K, Stahl GL. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology.* 2006;211(10):759-66.
32. Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, Thiel S, et al. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol.* 2006;177(7):4727-34.
33. Selander B, Martensson U, Weintraub A, Holmstrom E, Matsushita M, Thiel S, et al. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1425-34.
34. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* 2007;28(4):184-92.
35. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006;12(6):682-7.
36. Surace L, Lysenko V, Fontana AO, Cecconi V, Janssen H, Bicvic A, et al. Complement is a central mediator of radiotherapy-induced tumor-specific immunity and clinical response. *Immunity.* 2015;42(4):767-77.
37. Kirkitadze MD, Barlow PN. Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. *Immunol Rev.* 2001;180:146-61.
38. Pio R, Corrales L, Lambris JD. The role of complement in tumor growth. *Adv Exp Med Biol.* 2014;772:229-62.

39. Davis AE, 3rd, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol*. 2008;45(16):4057-63.
40. Sim RB, Day AJ, Moffatt BE, Fontaine M. Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods Enzymol*. 1993;223:13-35.
41. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlback B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol*. 2004;40(18):1333-46.
42. Jozsi M, Zipfel PF. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*. 2008;29(8):380-7.
43. Podack ER, Muller-Eberhard HJ. Isolation of human S-protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. *J Biol Chem*. 1979;254(19):9808-14.
44. Jenne DE, Tschopp J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(18):7123-7.
45. Falgarone G, Chiochia G. Chapter 8: Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv Cancer Res*. 2009;104:139-70.
46. Fischer E, Appay MD, Cook J, Kazatchkine MD. Characterization of the human glomerular C3 receptor as the C3b/C4b complement type one (CR1) receptor. *J Immunol*. 1986;136(4):1373-7.
47. Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:127-49.
48. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:431-55.
49. Marie JC, Astier AL, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B. Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol*. 2002;3(7):659-66.
50. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*. 2003;421(6921):388-92.
51. Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med*. 1987;165(3):848-64.
52. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:35-58.
53. Abbott RJ, Spendlove I, Roversi P, Fitzgibbon H, Knott V, Teriete P, et al. Structural and functional characterization of a novel T cell receptor co-regulatory protein complex, CD97-CD55. *J Biol Chem*. 2007;282(30):22023-32.
54. Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol*. 1999;19(3):173-98.
55. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 1990;71(1):1-9.
56. Kohl J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol*. 2001;38(2-3):175-87.
57. Haas PJ, van Strijp J. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol Res*. 2007;37(3):161-75.

58. Benard M, Gonzalez BJ, Schouft MT, Falluel-Morel A, Vaudry D, Chan P, et al. Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation. Neuroprotective effect of C5a against apoptotic cell death. *J Biol Chem*. 2004;279(42):43487-96.
59. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, et al. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med*. 2003;198(6):913-23.
60. Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(11):2114-7.
61. Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):500-43.
62. Boulay F, Mery L, Tardif M, Bouchon L, Vignais P. Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry*. 1991;30(12):2993-9.
63. Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, Takahashi TA. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol*. 2000;37(8):407-12.
64. Chen NJ, Mirtsos C, Suh D, Lu YC, Lin WJ, McKerlie C, et al. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature*. 2007;446(7132):203-7.
65. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(2):133-42.
66. Jain U, Woodruff TM, Stadnyk AW. The C5a receptor antagonist PMX205 ameliorates experimentally induced colitis associated with increased IL-4 and IL-10. *Br J Pharmacol*. 2013;168(2):488-501.
67. Woodruff TM, Crane JW, Proctor LM, Buller KM, Shek AB, de Vos K, et al. Therapeutic activity of C5a receptor antagonists in a rat model of neurodegeneration. *FASEB J*. 2006;20(9):1407-17.
68. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*. 2003;21:807-39.
69. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-8.
70. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-9.
71. Nolte-'t Hoen EN, Almeida CR, Cohen NR, Nedvetzki S, Yarwood H, Davis DM. Increased surveillance of cells in mitosis by human NK cells suggests a novel strategy for limiting tumor growth and viral replication. *Blood*. 2007;109(2):670-3.
72. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
73. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
74. DuPage M, Mazumdar C, Schmidt LM, Cheung AF, Jacks T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature*. 2012;482(7385):405-9.
75. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
76. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
77. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10231-3.

78. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):45-60.
79. Miyagi T, Takahashi K, Moriya S, Hata K, Yamamoto K, Wada T, et al. Altered expression of sialidases in human cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2012;749:257-67.
80. Costello LC, Franklin RB. 'Why do tumour cells glycolyse?': from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2005;280(1-2):1-8.
81. Glunde K, Serkova NJ. Therapeutic targets and biomarkers identified in cancer choline phospholipid metabolism. *Pharmacogenomics*. 2006;7(7):1109-23.
82. Griffin JL, Kauppinen RA. Tumour metabolomics in animal models of human cancer. *J Proteome Res*. 2007;6(2):498-505.
83. Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, et al. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol*. 2012;189(9):4674-83.
84. Michlmayr A, Bachleitner-Hofmann T, Baumann S, Marchetti-Deschmann M, Rech-Weichselbraun I, Burghuber C, et al. Modulation of plasma complement by the initial dose of epirubicin/docetaxel therapy in breast cancer and its predictive value. *Br J Cancer*. 2010;103(8):1201-8.
85. Nunez-Cruz S, Gimotty PA, Guerra MW, Connolly DC, Wu YQ, DeAngelis RA, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization. *Neoplasia*. 2012;14(11):994-1004.
86. Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1225-35.
87. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res*. 2010;8(11):1453-65.
88. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
89. Markiewski MM, DeAngelis RA, Strey CW, Foukas PG, Gerard C, Gerard N, et al. The regulation of liver cell survival by complement. *J Immunol*. 2009;182(9):5412-8.
90. Mukherjee P, Pasinetti GM. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of caspase 3. *J Neurochem*. 2001;77(1):43-9.
91. Mukherjee P, Thomas S, Pasinetti GM. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through regulation of glutamate receptor subunit 2 in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation*. 2008;5:5.
92. Gunn L, Ding C, Liu M, Ma Y, Qi C, Cai Y, et al. Opposing roles for complement component C5a in tumor progression and the tumor microenvironment. *J Immunol*. 2012;189(6):2985-94.
93. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res*. 2006;66(11):5527-36.
94. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):263-74.
95. Cho MS, Vasquez HG, Rupaimoole R, Pradeep S, Wu S, Zand B, et al. Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell Rep*. 2014;6(6):1085-95.
96. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.
97. Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol*. 2002;169(4):2102-10.

98. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol.* 2004;164(3):849-59.
99. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
100. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res.* 2010;59(11):897-905.
101. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997;91(4):439-42.
102. Bandyopadhyay M, Rohrer B. Matrix metalloproteinase activity creates pro-angiogenic environment in primary human retinal pigment epithelial cells exposed to complement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):1953-61.
103. Veerhuis R, Janssen I, Hack CE, Eikelenboom P. Early complement components in Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol.* 1996;91(1):53-60.
104. Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol.* 1999;160(1):289-99.
105. Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Mol Immunol.* 2011;48(14):1592-603.
106. Bouwens TA, Trouw LA, Veerhuis R, Dirven CM, Lamfers ML, Al-Khawaja H. Complement activation in Glioblastoma multiforme pathophysiology: evidence from serum levels and presence of complement activation products in tumor tissue. *J Neuroimmunol.* 2015;278:271-6.
107. Makela K, Helen P, Haapasalo H, Paavonen T. Complement activation in astrocytomas: deposition of C4d and patient outcome. *BMC Cancer.* 2012;12:565.
108. Gasque P, Chan P, Fontaine M, Ischenko A, Lamacz M, Gotze O, et al. Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J Immunol.* 1995;155(10):4882-9.
109. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Wang P, Sayah S, Fontaine M, et al. The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J Immunol.* 1998;160(7):3543-54.
110. Gavriluk V, Kalinin S, Hilbush BS, Middlecamp A, McGuire S, Pelligrino D, et al. Identification of complement 5a-like receptor (C5L2) from astrocytes: characterization of anti-inflammatory properties. *J Neurochem.* 2005;92(5):1140-9.
111. Schraufstatter IU, Discipio RG, Zhao M, Khaldoyanidi SK. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol.* 2009;182(6):3827-36.
112. Gonzalez JM, Franzke CW, Yang F, Romero R, Girardi G. Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice. *Am J Pathol.* 2011;179(2):838-49.
113. Nitta H, Wada Y, Kawano Y, Murakami Y, Irie A, Taniguchi K, et al. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a receptor (CD88). *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2004-13.
114. Vadrevu SK, Chintala NK, Sharma SK, Sharma P, Cleveland C, Riediger L, et al. Complement c5a receptor facilitates cancer metastasis by altering T-cell responses in the metastatic niche. *Cancer Res.* 2014;74(13):3454-65.

115. Piao C, Cai L, Qiu S, Jia L, Song W, Du J. Complement 5a Enhances Hepatic Metastases of Colon Cancer via Monocyte Chemoattractant Protein-1-mediated Inflammatory Cell Infiltration. *J Biol Chem*. 2015;290(17):10667-76.
116. <http://www.bbiox.com>. Available from: <http://www.bbiox.com>.
117. QIAGEN. The QIA expressionist:A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Fifth ed2001.
118. Hochuli E. Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet Eng (N Y)*. 1990;12:87-98.
119. <http://www.bitesizebio.com>. Available from: <http://www.bitesizebio.com>.
120. <http://www.sinobiological.com/Complement-C5a-Protein-g-49.html>. Human Complement C5a SinoBiological Inc. Available from: <http://www.sinobiological.com/Complement-C5a-Protein-g-49.html>.
121. Collection) AATC. SOP:Thawing, Propagation and Cryopreservation of NCI-PBCF-CRL1690 (T98-G) Glioblastoma Multiforme. Version 1.6 ed: Physical Sciences-Oncology Center Network (PS-OC)-Bioresource Core Facility.
122. Collection) AATC. SOP:Thawing, Propagation and Cryopreservation of NCI-PBCF-HTB14 (U-87 MG) Glioblastoma-Astrocytoma. Version 1.6 ed: Physical Sciences-Oncology Center Network (PS-OC)-Bioresource Core Facility.
123. John Ryan PD. Understanding and Managing Cell Culture Contamination. Available from: <http://www.corning.com/lifesciences>.
124. Invitrogen G-. CELL CULTURE BASICS. Available from: <http://www.invitrogen.com/cellculturebasics>.
125. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>. Available from: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>.
126. <http://www.uvm.edu/~wschaeff/BasicCulture1.html>. Available from: <http://www.uvm.edu/~wschaeff/BasicCulture1.html>.
127. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2007;368:39-57.
128. Vivi Kielberg KCA. Cryopreservation of Mammalian Cells – Protocols. Thermo Fisher Scientific Inc; 2010.
129. http://faculty.qu.edu.qa/ilhamq/physics-dept/gamma_cell.html.
130. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006;1(5):2315-9.
131. MTT -Cell Viability Applications 6(Biofiles SIGMA-ALDRICH). Available from: sigma.com/biofiles.
132. QCMTM 96-Well Cell Invasion Assay. MILLIPORE International, Inc.; 2007.
133. Hu X, Beeton C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010(45).
134. Itoh Y, Binner S, Nagase H. Steps involved in activation of the complex of pro-matrix metalloproteinase 2 (progelatinase A) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 by 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem J*. 1995;308 (Pt 2):645-51.
135. Itoh Y, Ito A, Iwata K, Tanzawa K, Mori Y, Nagase H. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *J Biol Chem*. 1998;273(38):24360-7.
136. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10425-32.
137. Troeberg L, Nagase H. Zymography of metalloproteinases. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]*. 2004;Chapter 21:Unit 21 15.

138. Chong YH, Seoh JY, Park HK. Increased activity of matrix metalloproteinase-2 in human glial and neuronal cell lines treated with HIV-1 gp41 peptides. *Journal of molecular neuroscience* : MN. 1998;10(2):129-41.
139. Frankowski H, Gu YH, Heo JH, Milner R, Del Zoppo GJ. Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol.* 2012;814:221-33.
140. (ELISA) A-ELIA. Arten von ELISA-Methoden. Available from: <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F%7D>.
141. Pavia UdSd. <http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/complement.html>. Available from: <http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/complement.html>.
142. Fritzing DC, Hew BE, Thorne M, Pangburn MK, Janssen BJ, Gros P, et al. Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Developmental and comparative immunology.* 2009;33(1):105-16.
143. Kock MA, Hew BE, Bammert H, Fritzing DC, Vogel CW. Structure and function of recombinant cobra venom factor. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30836-43.
144. <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/rad/radbiol/02bio/bio-04-01.htm>.
145. Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, et al. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res.* 2006;66(17):8511-9.
146. Maeda Y, Kawano Y, Wada Y, Yatsuda J, Motoshima T, Murakami Y, et al. C5aR is frequently expressed in metastatic renal cell carcinoma and plays a crucial role in cell invasion via the ERK and PI3 kinase pathways. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1844-50.
147. DiScipio RG, Schraufstatter IU, Sikora L, Zuraw BL, Sriramarao P. C5a mediates secretion and activation of matrix metalloproteinase 9 from human eosinophils and neutrophils. *International immunopharmacology.* 2006;6(7):1109-18.
148. Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *The Journal of cell biology.* 1996;134(1):255-66.
149. Raychaudhuri B, Vogelbaum MA. IL-8 is a mediator of NF-kappaB induced invasion by gliomas. *J Neurooncol.* 2011;101(2):227-35.
150. Association ABT. Brain Tumor Statistics
 . Available from: <http://www.abta.org/>.
151. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):239-53.
152. Noda SE, El-Jawahri A, Patel D, Lautenschlaeger T, Siedow M, Chakravarti A. Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. *Seminars in radiation oncology.* 2009;19(3):171-8.
153. Chaichana KL, McGirt MJ, Latta J, Olivi A, Quinones-Hinojosa A. Recurrence and malignant degeneration after resection of adult hemispheric low-grade gliomas. *J Neurosurg.* 2010;112(1):10-7.
154. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(6):425-37.

155. Li M, Bolduc AR, Hoda MN, Gamble DN, Dolisca SB, Bolduc AK, et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma. *J Immunother Cancer*. 2014;2:21.
156. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903-7.