ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის ეპიგენეტიკური მოდელირება

ნუნუ მიცკევიჩი,

თამარ ცერცვაძე, გიორგი გურული

ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ვირჯინიის თანამეგობრობის უნივერსიტეტი

5 აპრილი, 2019

მოხსენების შინაარსი

- თემის აქტუალობა
- კვლევის მიზანი და ამოცანები
- კვლევის ობიექტი, კვლევის მეთოდები
- ექსპერიმენტალური კვლევის შედეგები და განხილვა
- შედეგების შეჯამება, დაკვნები.

თემის აქტუალობა:

- პროსტატის სიმსივნე მამაკაცებში გავრცელებულ სიმსივნეებს შორის მეორე ადგილზე, ხოლო მამაკაცთა სიკვდილიანობის მაჩვენებლით მეხუთე ადგილზე დგას (მამაკაცთა სიკვდილიანობის 6.6%).

  პროსტატას საზღვრებს თუ გასცდება სიმსივნე, უკურნებელი ხდება. ანდროგენის დეპრივაცია მცირე შედეგს იძლევა, მაგრამ საბოლოოდ რეზისტენტულობა ყალიბდება.

  ამ ეტაპისთვის არ არსებობს მკურნალობის ეფექტური მეთოდი პაციენტებისთვის. ამიტომაც, უმნიშვნელოვანესია ალტერნატიული მკურნალობის გზების ძებნა.

სიმსივნის თერაპიის ალტერნატიული იმუნოლოგიური მიდგომები:

<u>იმუნოთერაპია:</u>
სიმსივნე სპეციფიური მონოკლონური ანტისხეულების გამოყენებით.

<u>ადოპტური თერაპია:</u>
T ლიმფოციტებზე დაფუძნებული თერაპია.

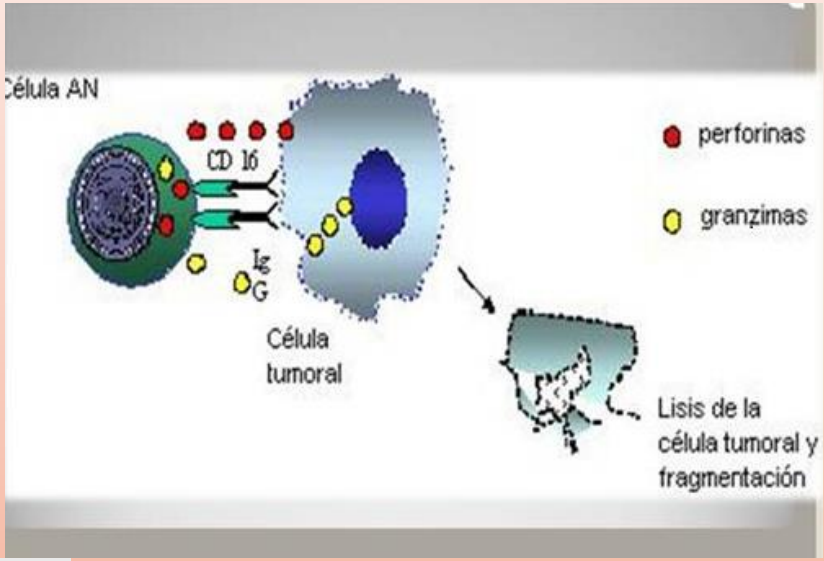
<u>ვაქცინაცია:</u>
დენდრიტულ უჯრედებზე დაფუძნებული ვაქცინები.

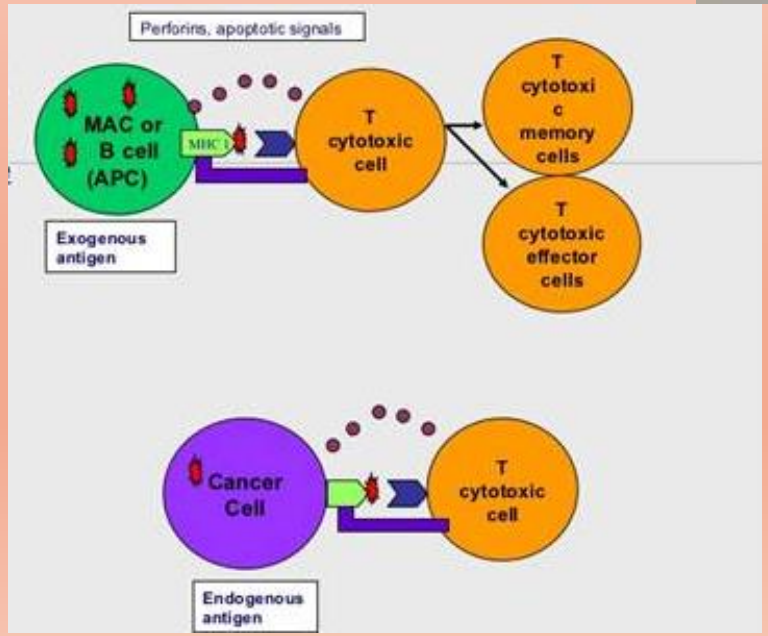
ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის იმუნომოდულაცია და ადაპტური იმუნური პასუხის ეპიგენეტიკური ინდუქცია

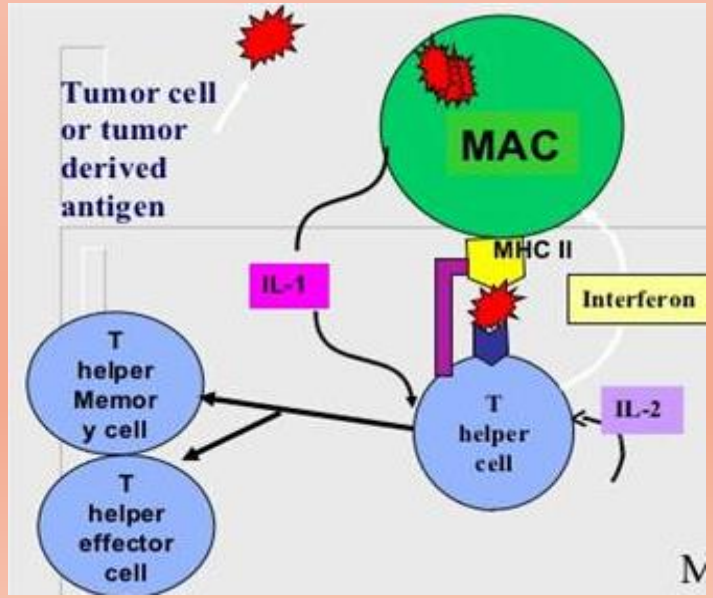
სიმსივნის იმუნოლოგია

ეფექტორული უჯრედები:

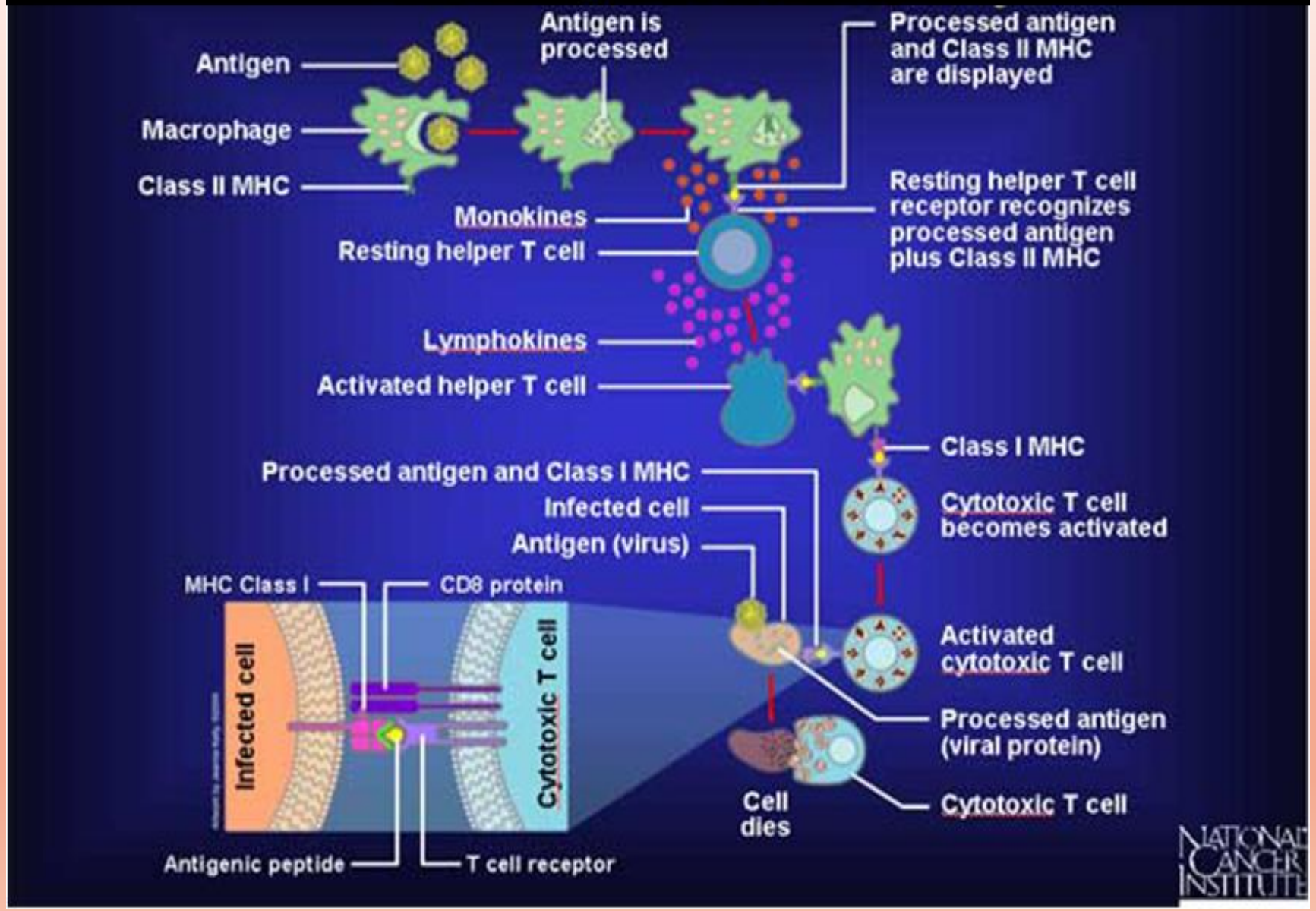
- NK უჯრედები
- NKT უჯრედები
- T უჯრედები



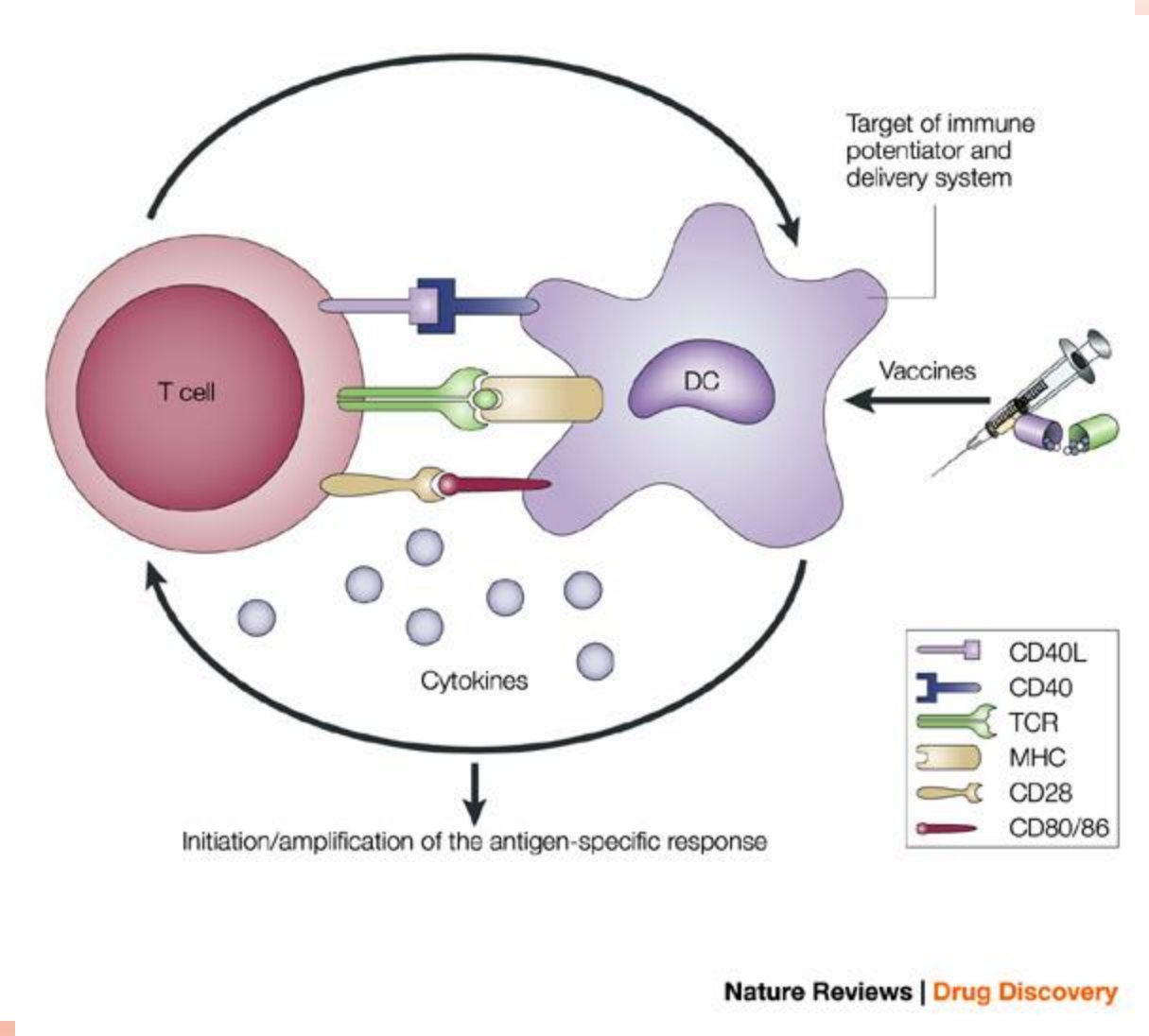




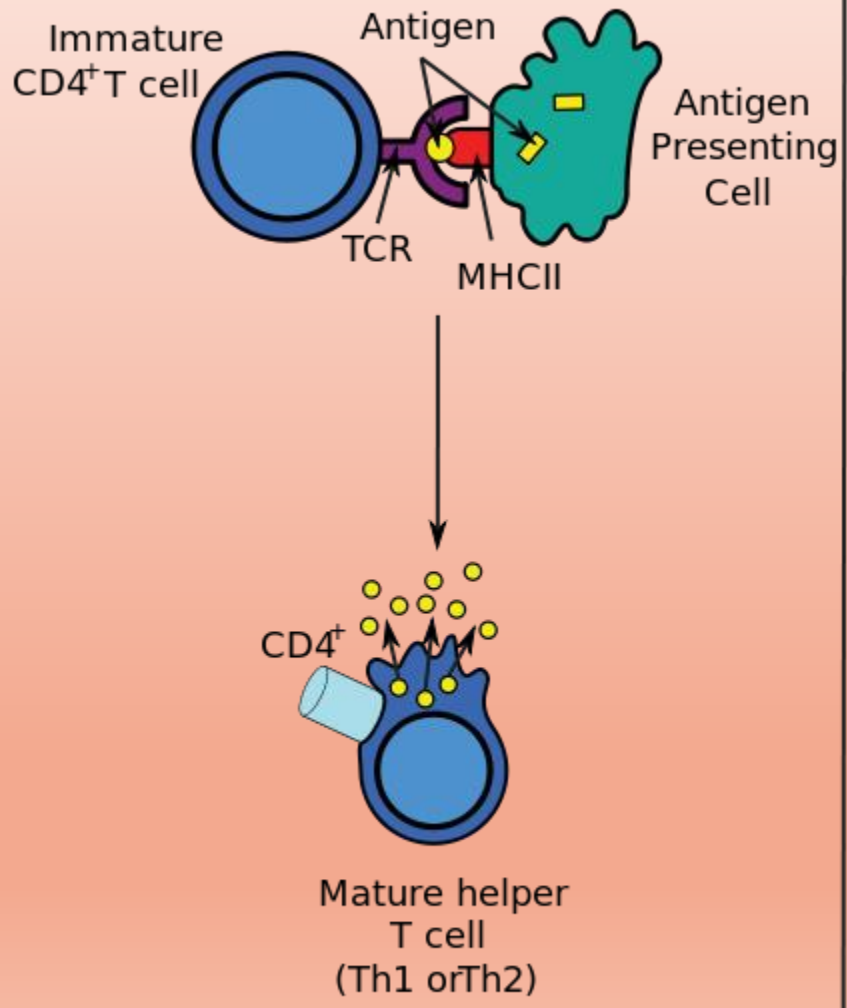
Immunity and Cancer

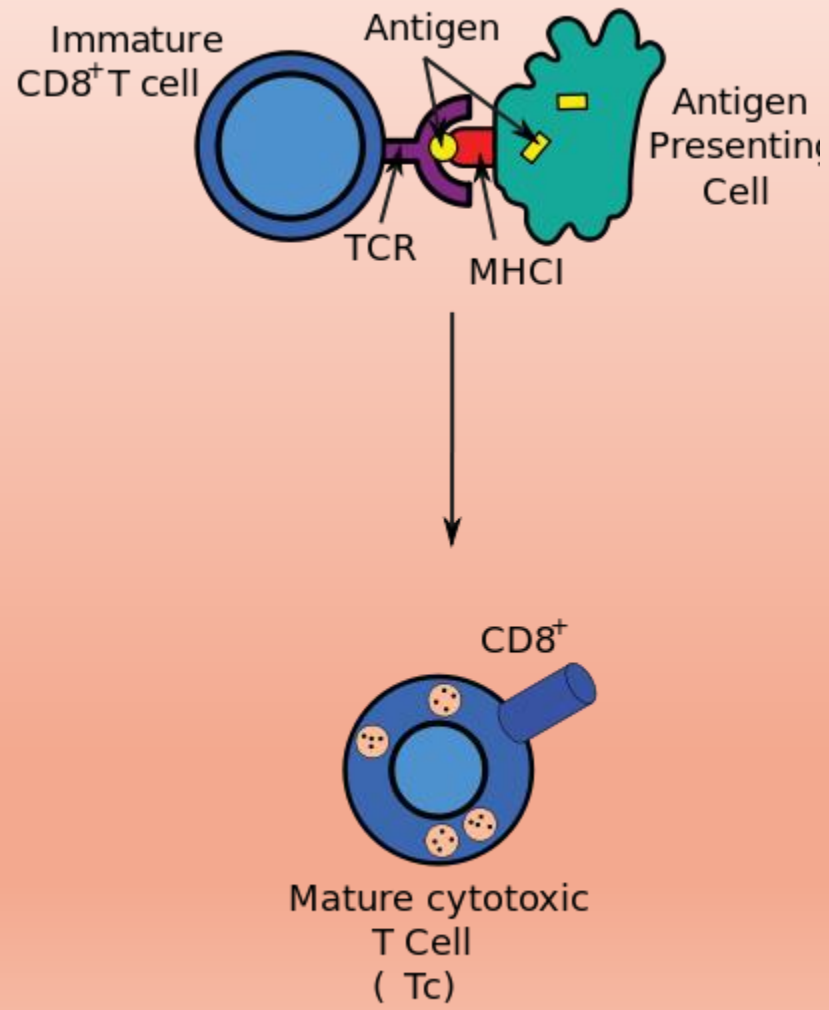


ანტიგენის პრეზენტაცია:

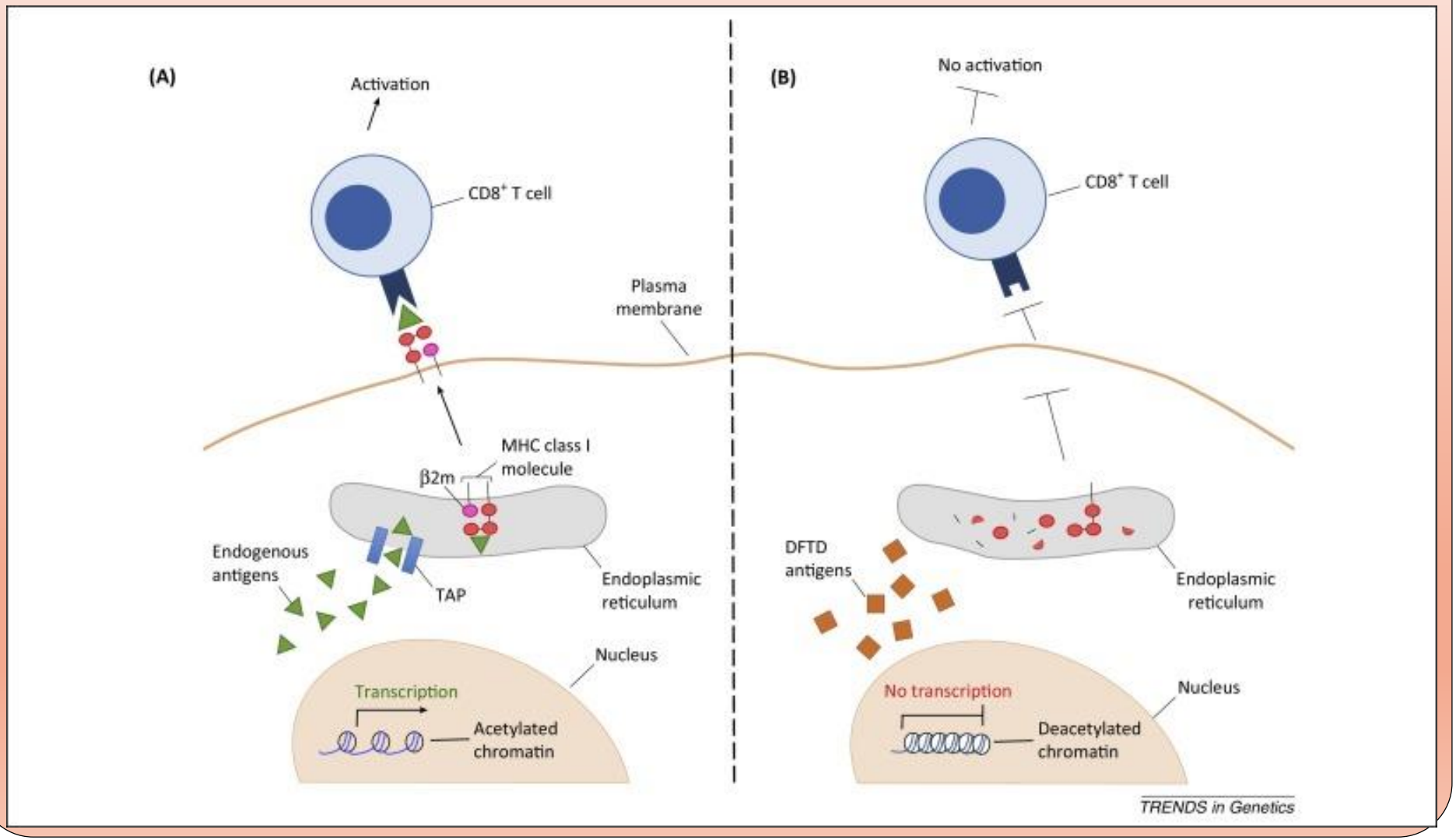


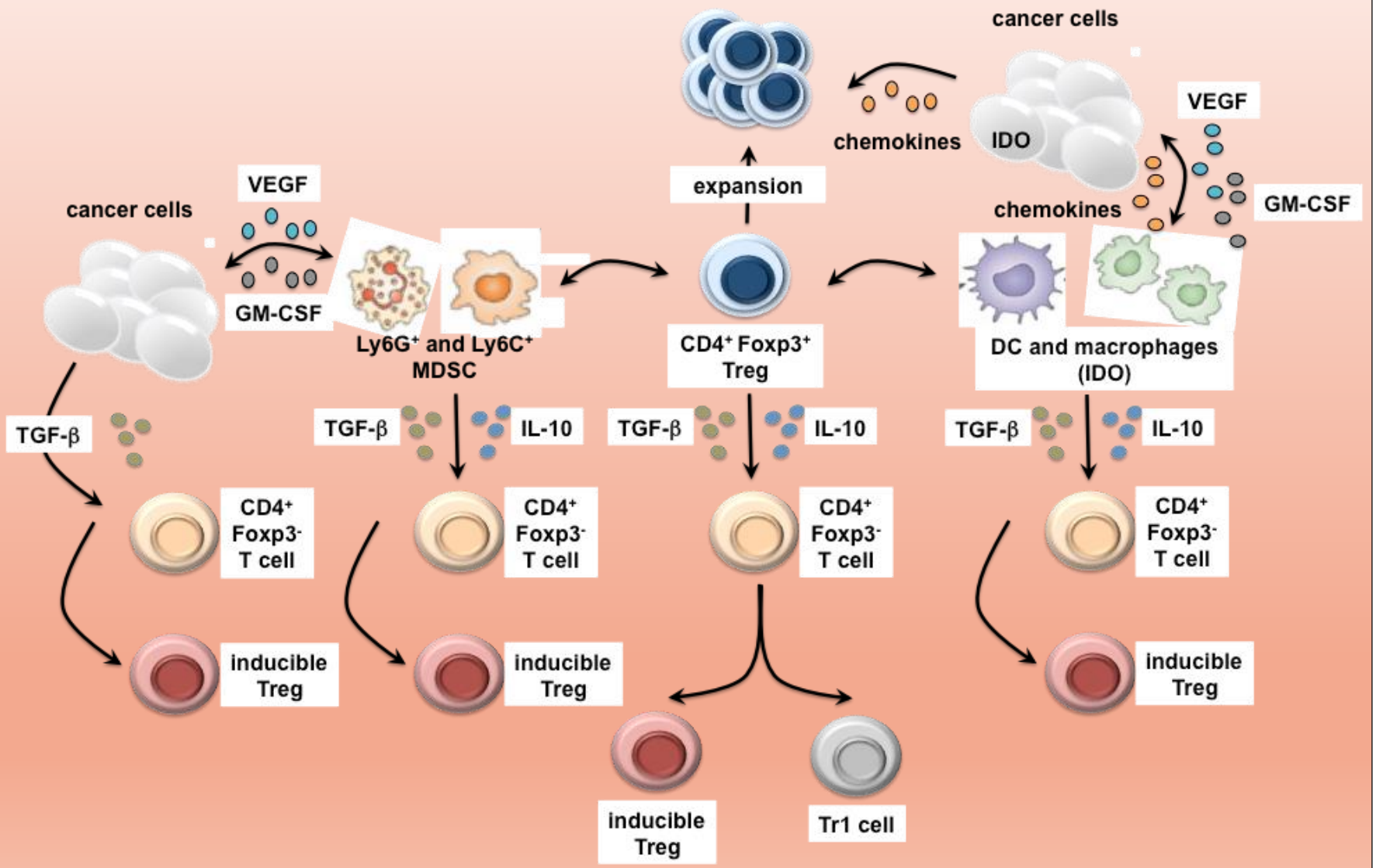
სიმსივნური ანტიგენის პრეზენტაცია



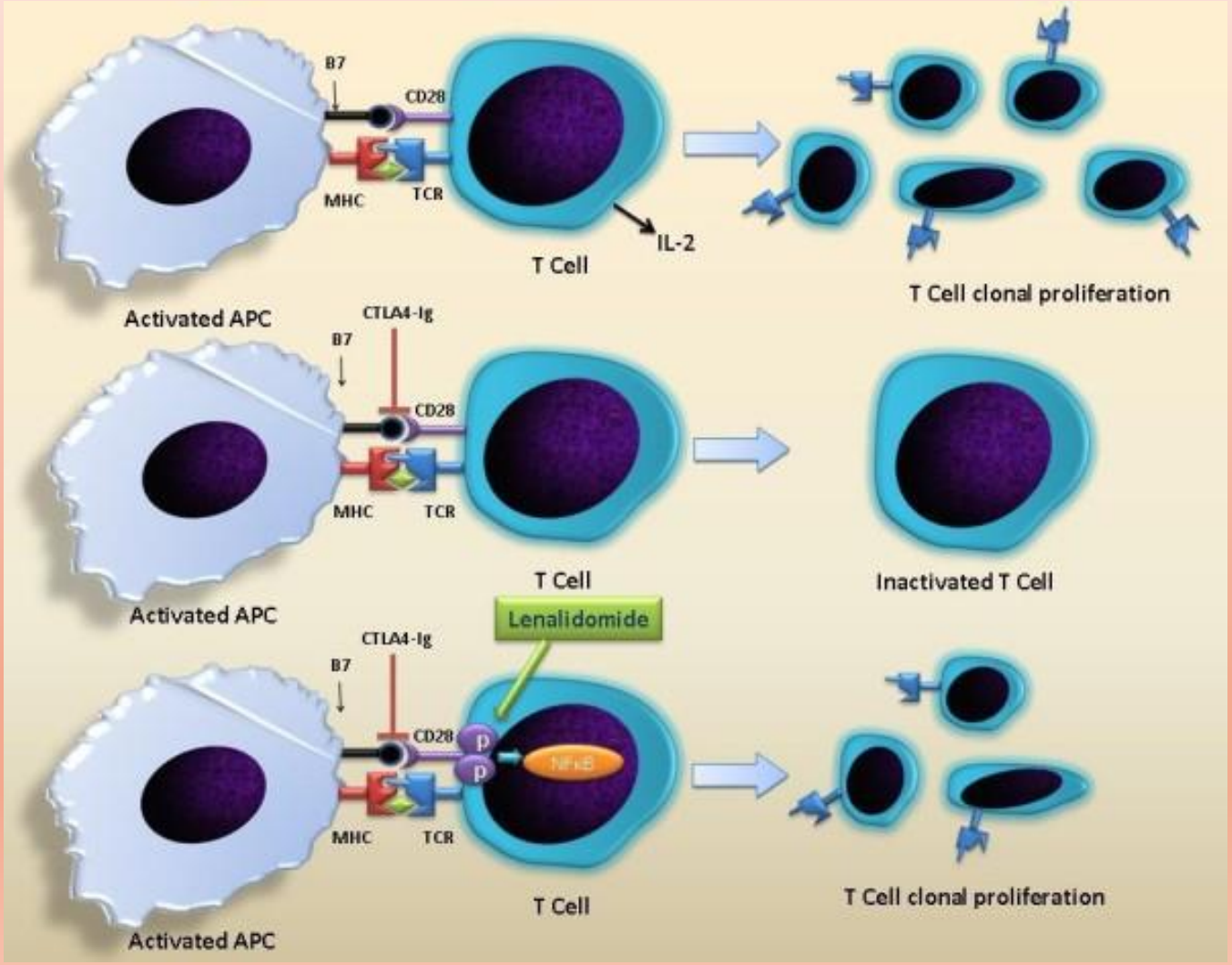


MHC I დაუნრეგულაცია

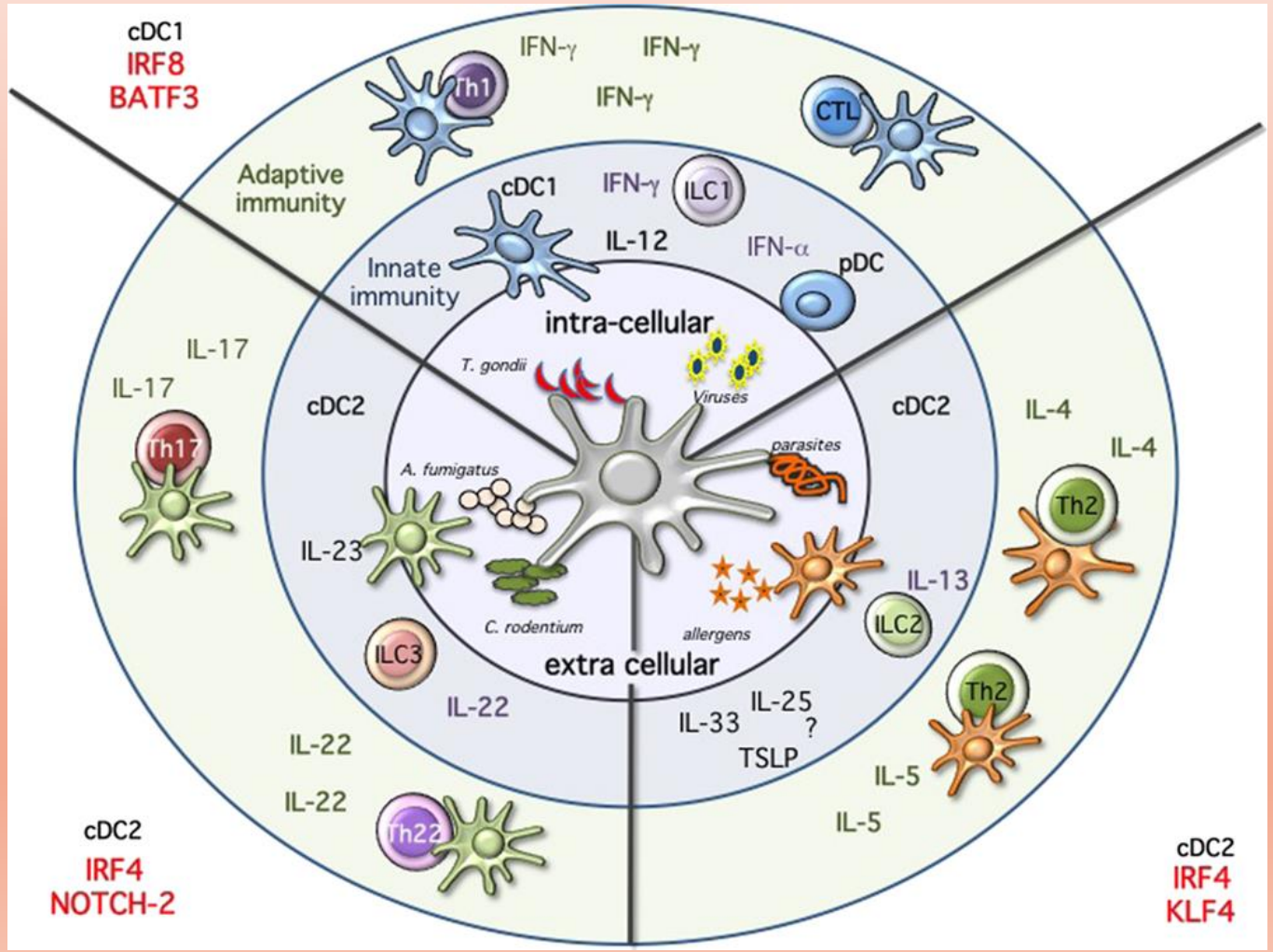



cancer cells
VEGF
GM-CSF
Ly6G+ and Ly6C+
MDSC
expansion
CD4+ Foxp3+
Treg
cancer cells
chemokines
IDO
VEGF
chemokines
GM-CSF
DC and macrophages
(IDO)
TGF-β
TGF-β
IL-10
TGF-β
IL-10
TGF-β
IL-10
CD4+
Foxp3-
T cell
CD4+
Foxp3-
T cell
CD4+
Foxp3-
T cell
CD4+
Foxp3-
T cell
inducible
Treg
inducible
Treg
inducible
Treg
inducible
Treg
Tr1 cell

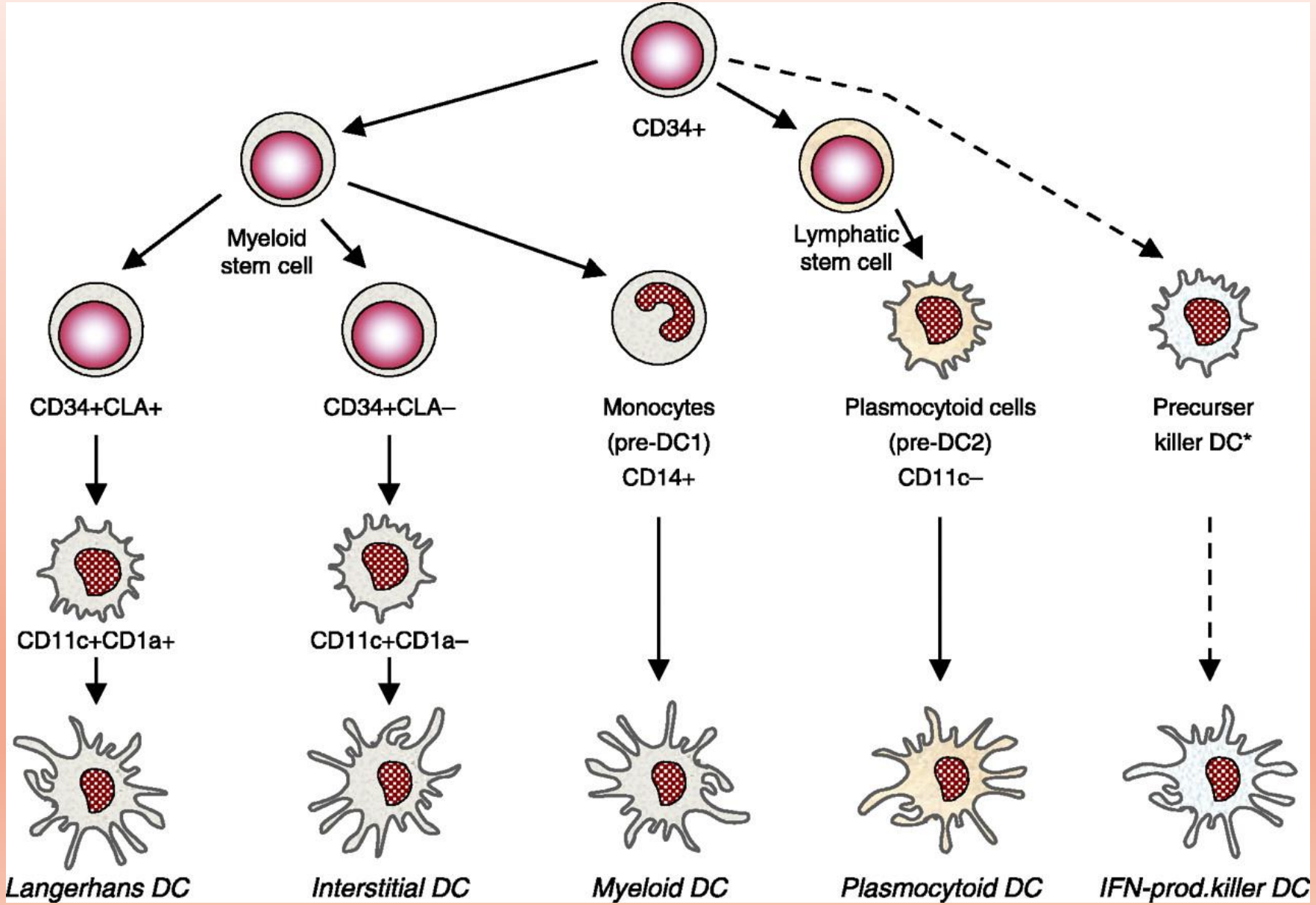
T უჯრედების აქტივაცია



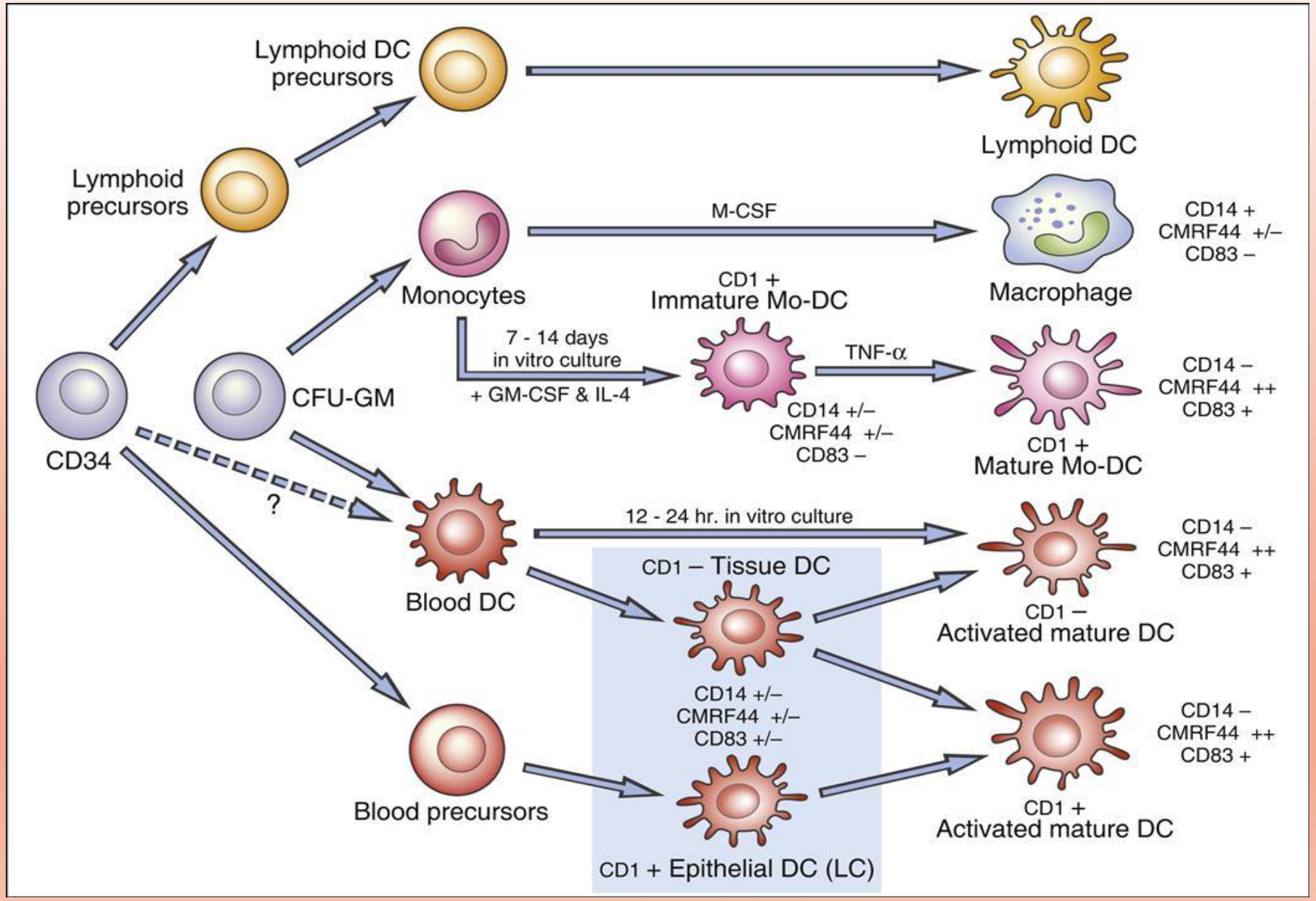
T უჯრედების სუბპოპულაციების პროფილური მართვა დენდრიტული უჯრედების მიერ



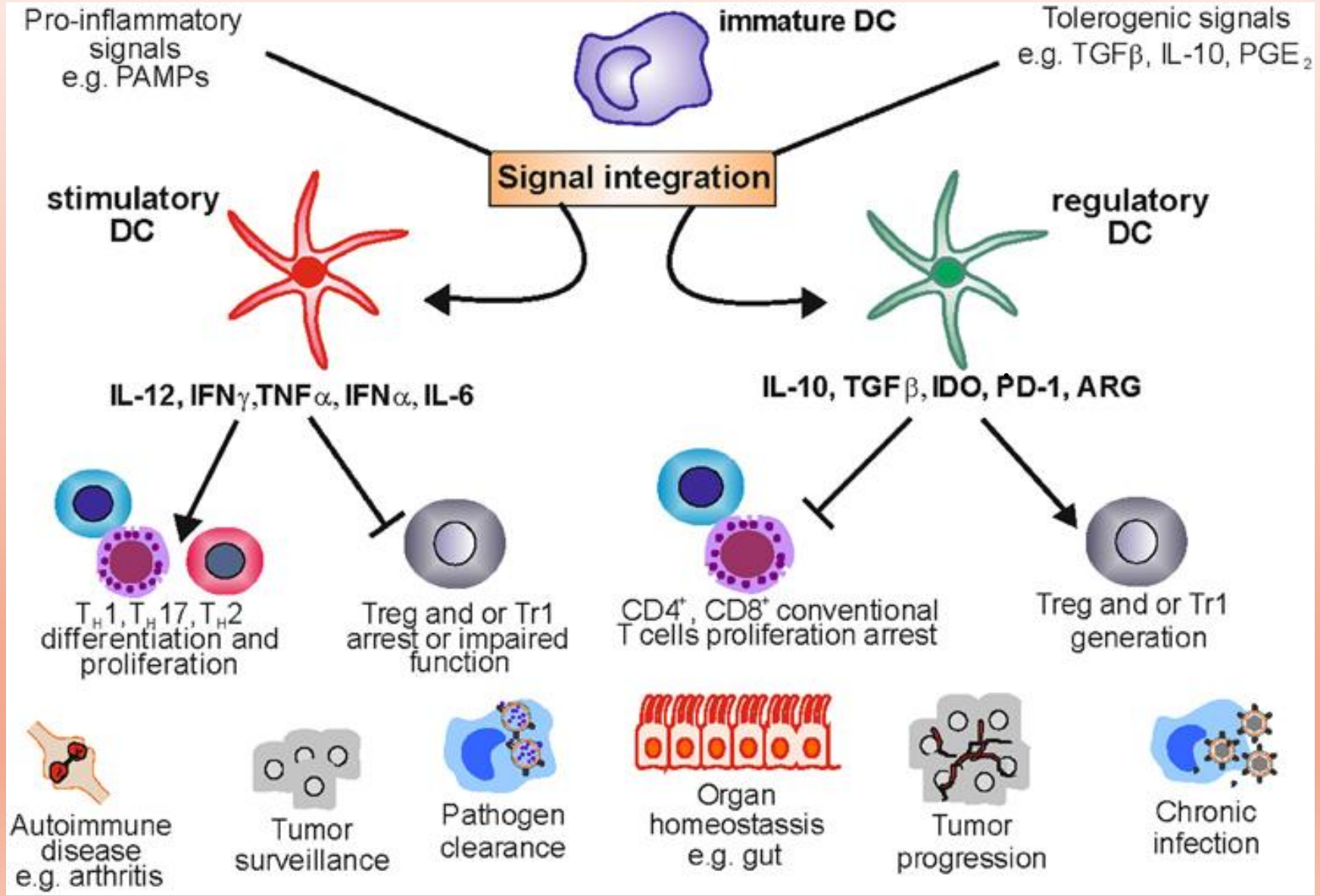
დენდრიტული უჯრედული ხაზების ჰემოპოეზური განვითარება



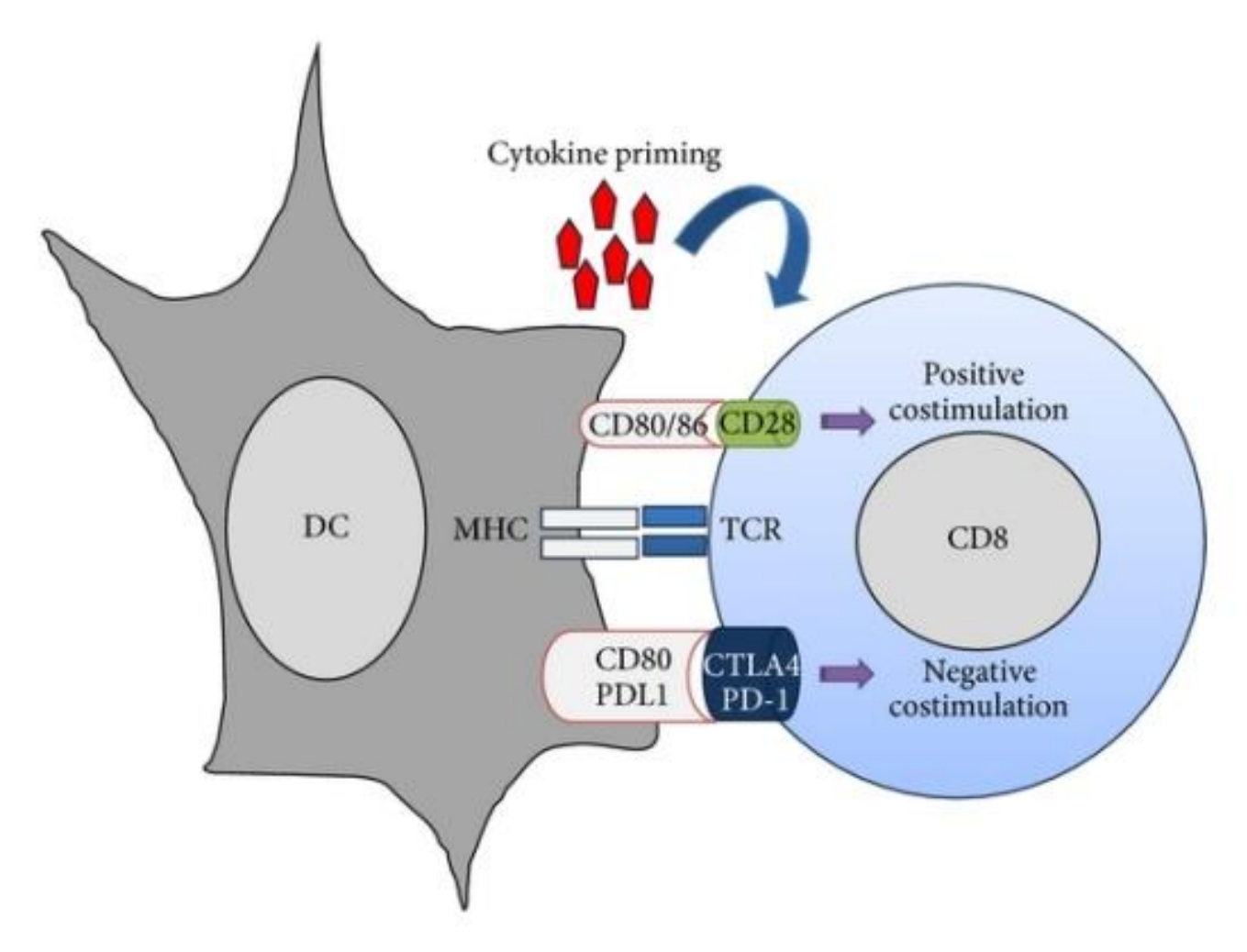
დენდრიტული უჯრედების განვითარება



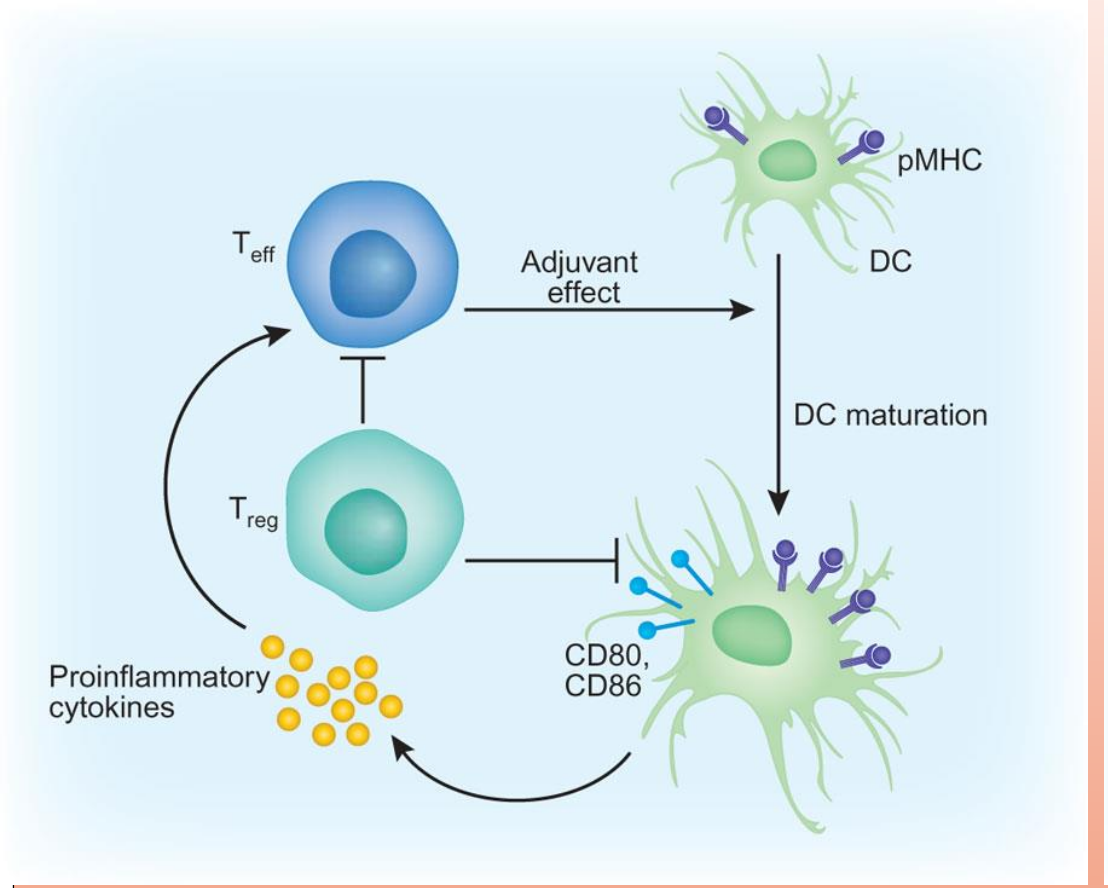
მარეგულირებელი დენდრიტული უჯრედები

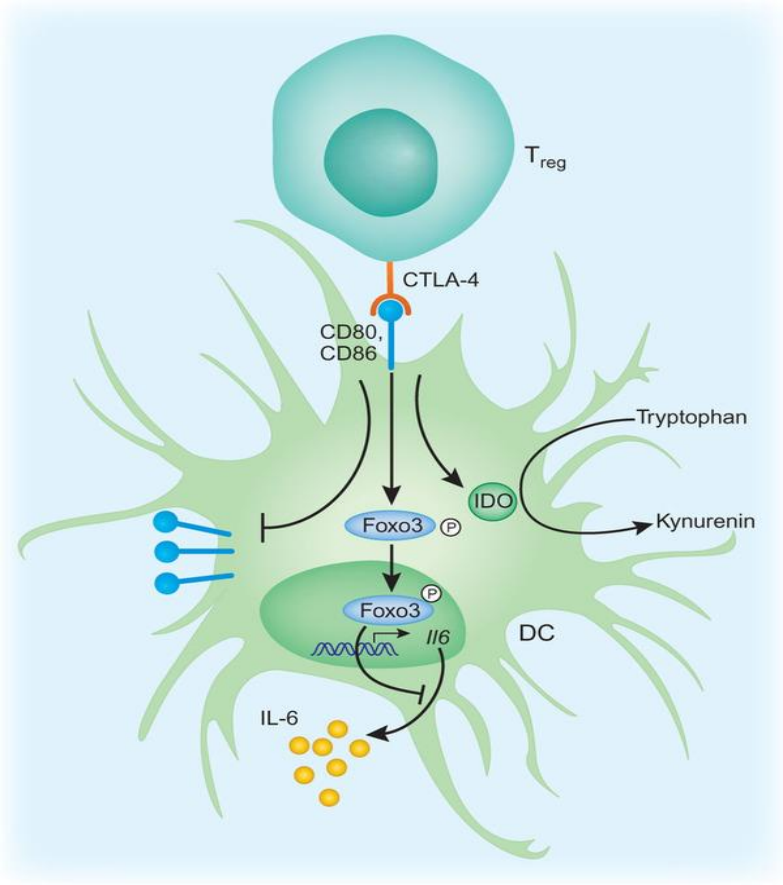


DC /CD8T სიგნალების ბლოკირება



DC და Treg ურთიერთობა



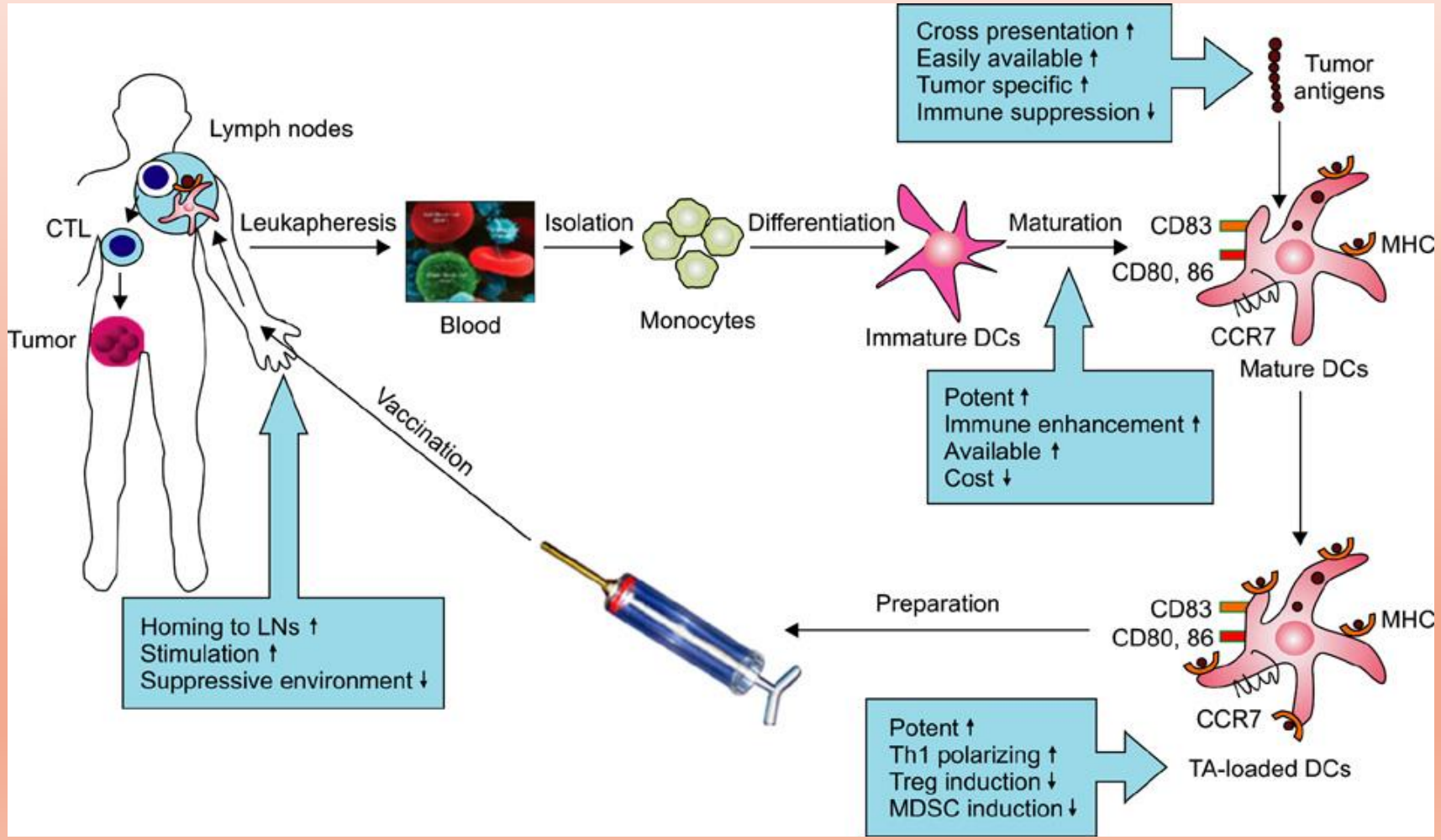


In the absence of T_{reg} cells, effector T cells (T_{eff}) exert an adjuvant effect on DCs, resulting in increased MHC and co-stimulatory molecule expression as well as secretion of proinflammatory cytokines. These mature DCs engage in a positive feedback loop by further augmenting effector T cell activation. pMHC, peptide–MHC.

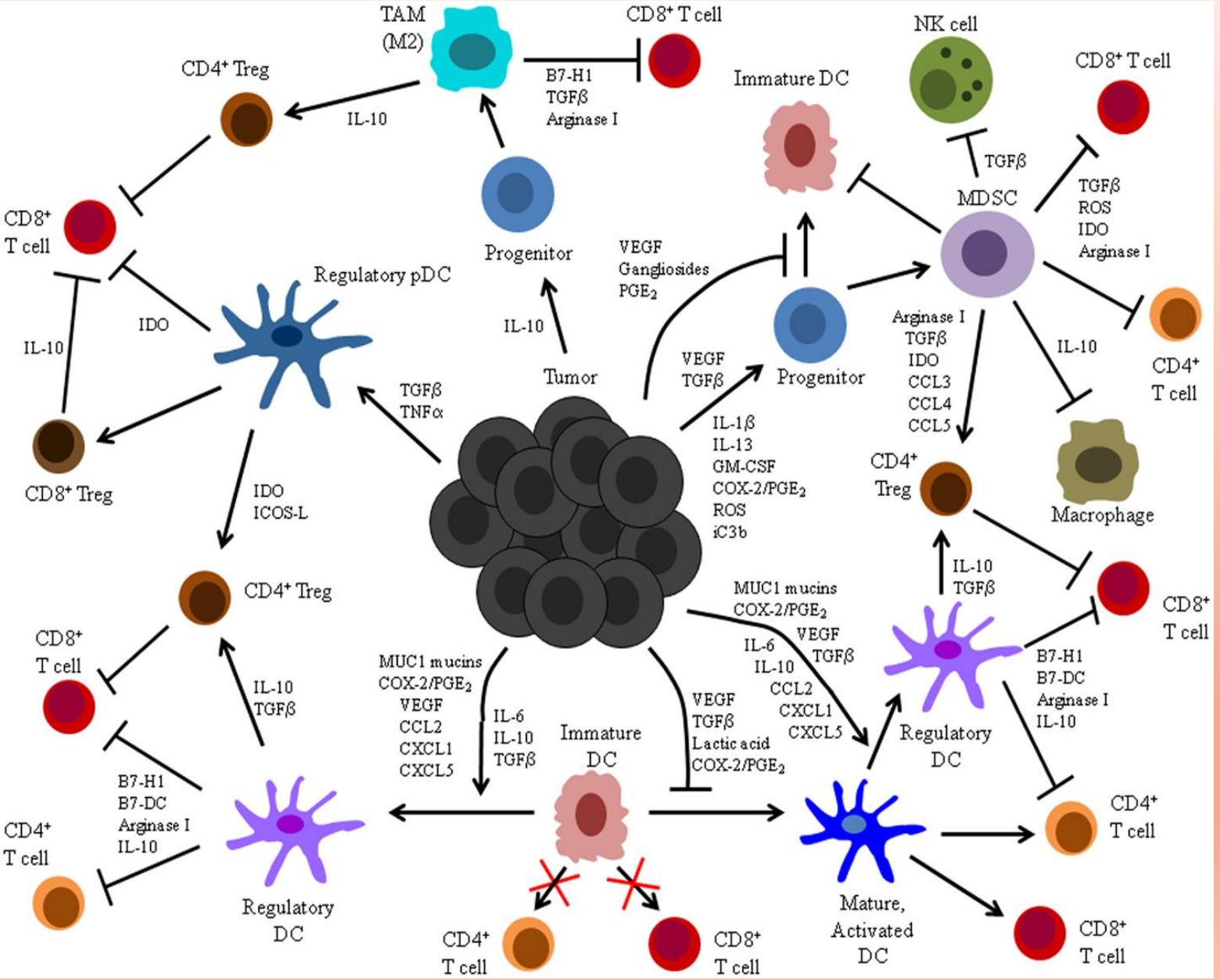
http://www.nature.com/ni/journal/v11/n1/fig_tab/ni.1818_F1.html

CTLA-4 may be a core mechanism through which T_{reg} cells control APC function.

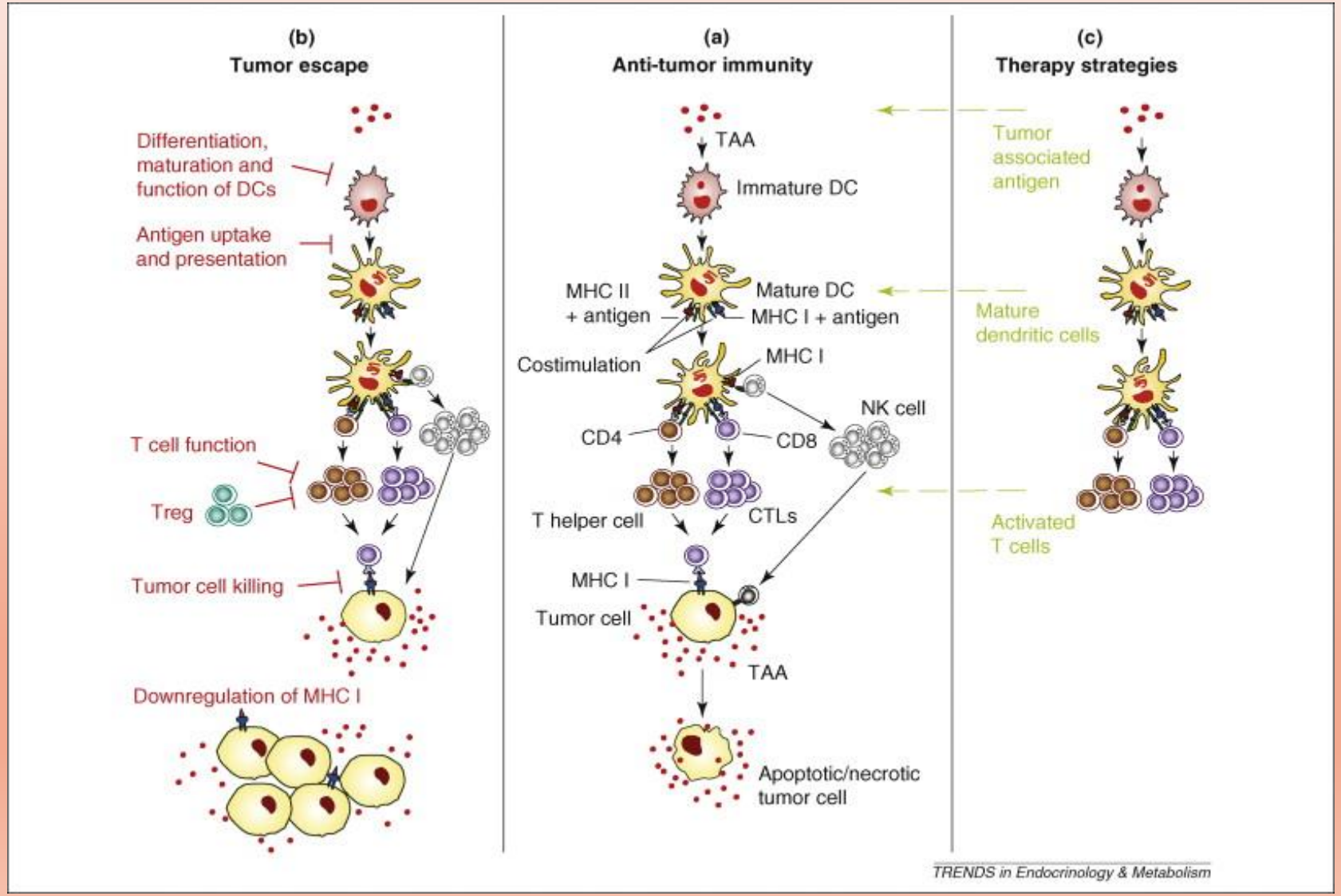
DC ვაქცინაცია



Immunotherapeutic Strategies for Interfering with Tumor-Associated DC Dysfunction



სიმსივნის მიერ იმუნური კონტროლისგან "თავის დაღწევა" და თერაპიული სტრატეგიები



კვლევის მიზანი

- ანტიგენის პრეზენტაციის გაძლიერება სიმსივნური ანტიგენის იმუნოგენურობის გაზრდით სიმსივნური უჯრედების კულტურაში და დენდრიტული უჯრედების მომწიფება/აქტივაციის გზით 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის ზემოქმედებით

კვლევის ამოცნები:

- **RM-1** პროსტატის კიბოსა და დენდრიტულ უჯრედებზე **5-AzaC**-ით და ლენალიდომიდით მოქმედების შედეგად მიღებული პროლიფერაციის კვლევა.

- 5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით აქტივირებული დენდრიტული უჯრედების რაოდენობრივი და ფუნქციური კვლევა გამდინარე ციტომეტრიით; ზედაპირული მარკერების **MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD 205, CD40** ექსპრესიის შეფასება.

- დენდრიტული უჯრედების მიერ ენდოთელინის რეცეპტორების (ETa და ETb) ექსპრესიის შეფასება ლენალიდომიდით აქტივირებისას.

- პროსტატის კიბოს უჯრედების მიერ P1A - სათესლის კიბოს ანტიგენის ექსპრესიის შეფასება **5-AzaC**-ის განსხვავებული დოზების ზემოქმედებისას.

- დენდრიტული უჯრედების მიერ IL-12-ის და IL-15-ის სეკრეციის შეფასება ლენალიდომიდით აქტივირებისას.

მასალა და მეთოდები

RM-1 - თაგვის პროსტატის კიბოს უჯრედული ხაზი,
ჰორმონ დამოუკიდებელი მოდელის შესაბამისი,
პროსტატის კიბოს ლეთალური ვარიანტია ადამიანებში.

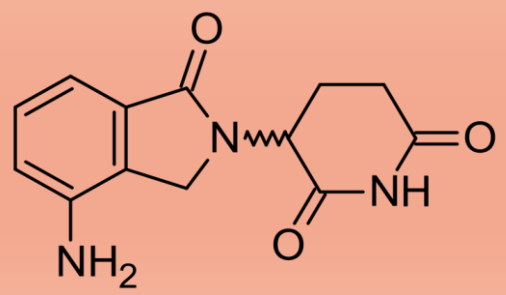
დენდრიტული უჯრედები მიღებული თაგვის C57BL/6 , Balb/c
ძვლის ტვინიდან.

5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის ეფექტის შესაფასებლად
პროსტატის კიბოსა და დენდრიტულ უჯრედებზე
გამოყენებული იქნა ლაბორატორიული კვლევის
შემდეგი მეთოდები:

- **უჯრედების პროლიფერაციული კვლევა,**
- **გამდინარე ციტომეტრია,**
- **იმუნოფერმენტული (ELISA) ანალიზი,**
- **პოლიმერაზის ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (RT-PCR)**

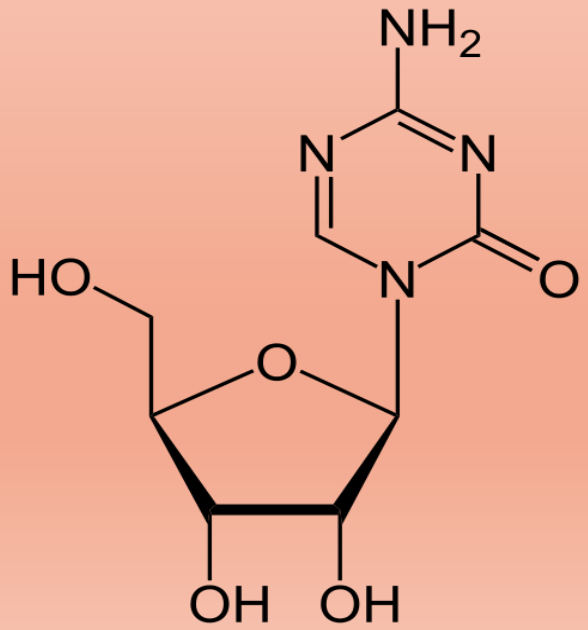
ლენალიდომიდი:

- ✓ იმუნომოდულატორული და ანტიანგიოგენური თვისებები
- ✓ ციტოკინების პროდუქცია და T უჯრედების აქტივაცია
- ✓ NK უჯრედების ფუნქციის ეფექტურობის გაზრდა

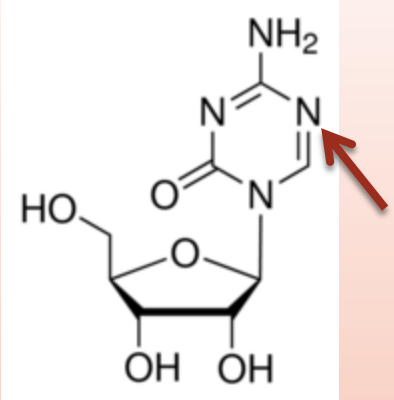


აზაციტიდინი:

- ✓ დნმ-ის დიმეთილატორი
- ✓ სიმსივნის სუპრესორული გენების ნორმალური ფუქნციონირების
- ✓ განეკუთვნება ანტიმეტაბოლიტებს.



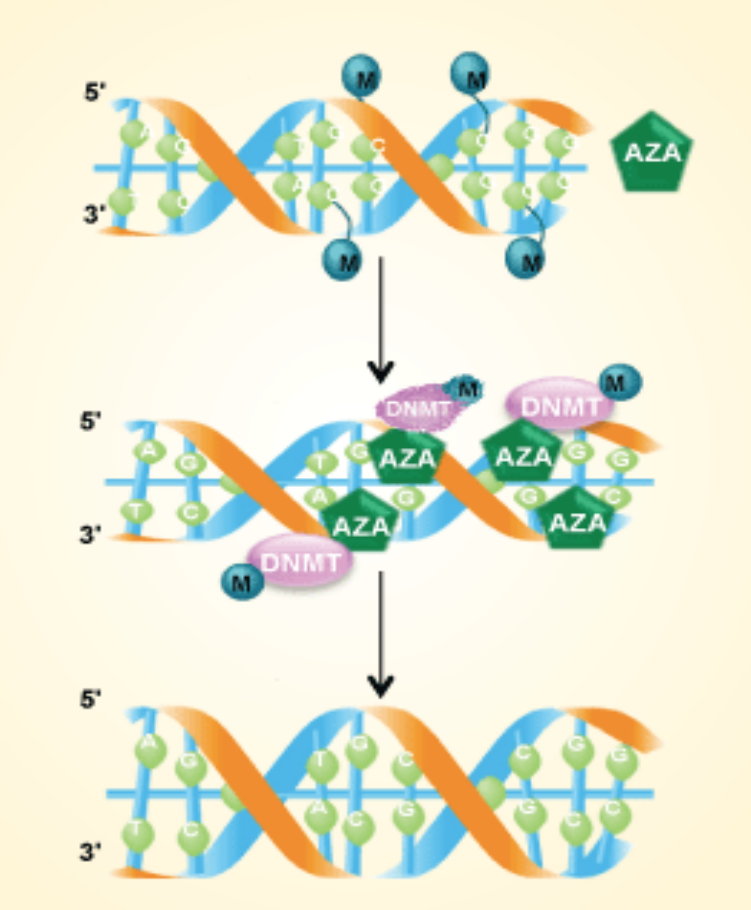
5-აზაციტიდინი



ქიმიური ფორმულა: $C_8H_{12}N_4O_5$
მოლეკულური წონა: 244.20

- ციტოზინის ანალოგი
- ზრდის სიმსივნის ექსპოზიციას იმუნური სისტემისათვის სხვადასხვა მექანიზმებით:
  - სიმსივნური ანტიგენების გენების ექსპრესიის აფრეგულაცია;
  - სიმსივნური უჯრედების პირდაპირ ციტოტოქსიური ეფექტები დნმ-ის დემეთილირების შედეგად.

5-აზაციტიდინის მოქმედების მექანიზმები

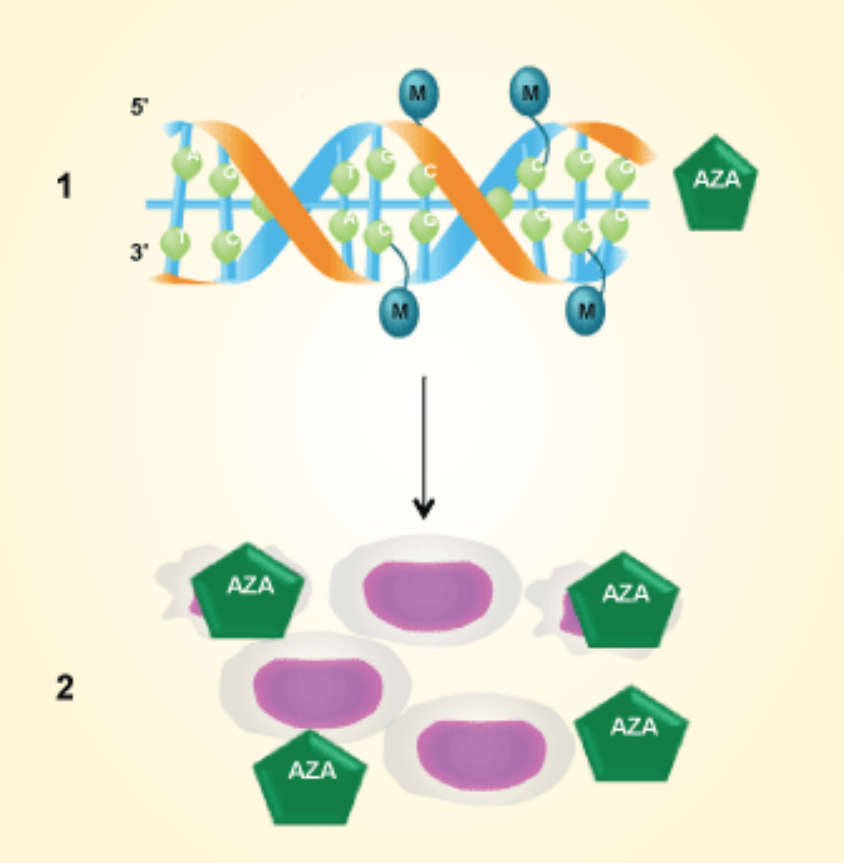


1. <u>დნმ-ის ჰიპომეთილირება და ნორმალური უჯრედული ციკლის რეგულატორი გენების რეექსპრესია:</u>

- სიმსივნის სუპრესორი გენების რეპრესირებული ტრანსკრიპცია.
- დნმ-ში ჩაშენდება ციტოზინის ნაცვლად, კოვალენტურად ებმის მეთილტრანსფერაზას და იწვევს მის დეგრადაციას, რის შედეგადაც მცირდება მეთილირების ხარისხი.
- სიმსივნის სუპრესიული ფუნქციების აღდგენა

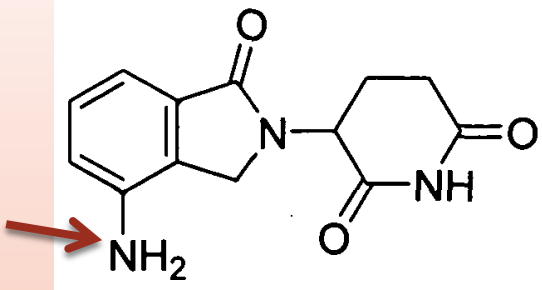
5-აზაციტიდინის მოქმედების მექანიზმები

<u>2. პირდაპირი ციტოტოქსიურობა:</u>



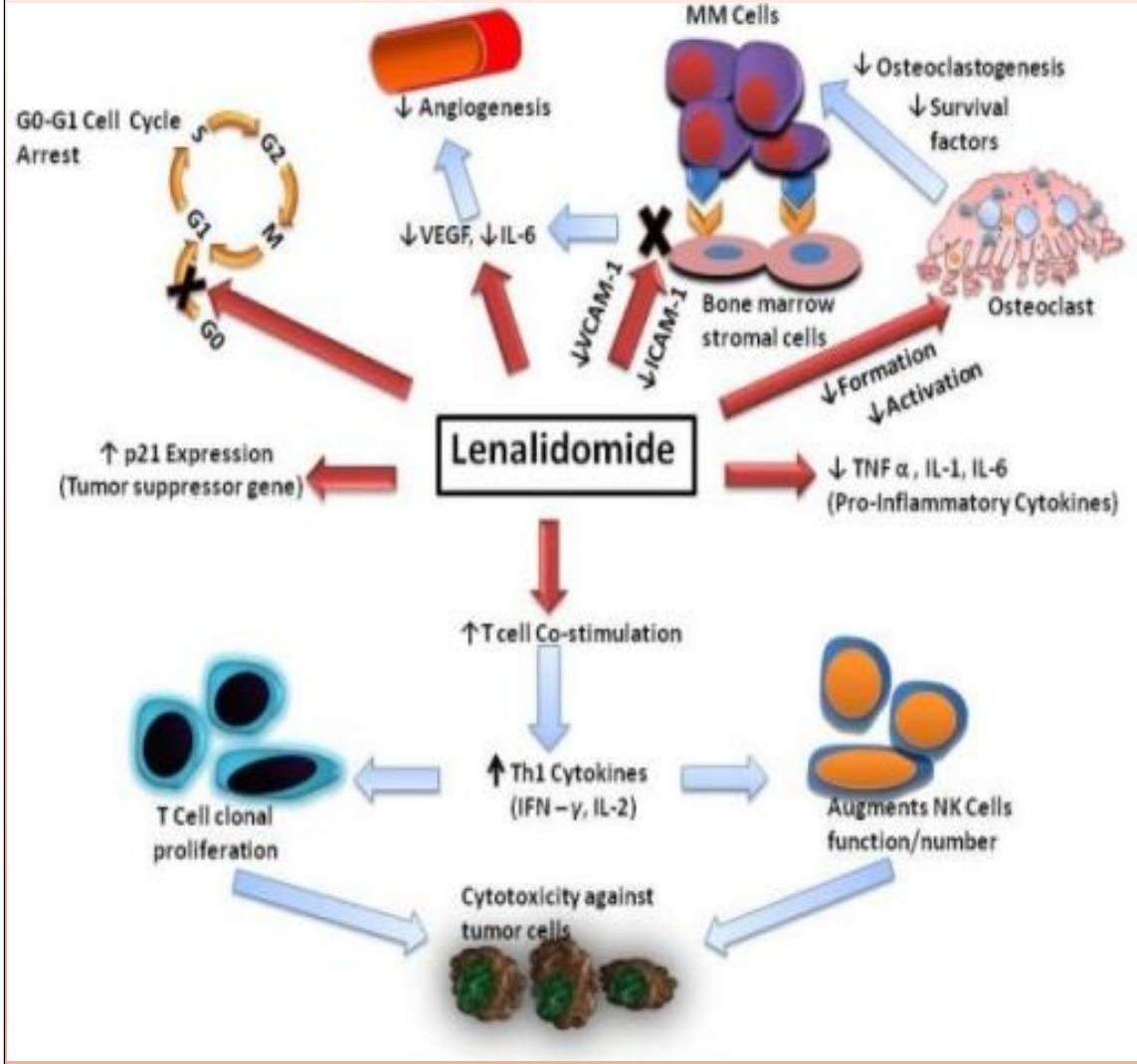
- სიმსივნის სუპრესორი გენების რეპრესირებული ტრანსკრიპცია.
- ციტოტოქსიურობა
- რნმ-თან ურთიერთქმედებისას იწვევს პოლირიბოსომების დაშლას, დეფექტურ მეთილირებას და ცილის სინთეზის ინჰიბირებას

ლენალიდომიდი



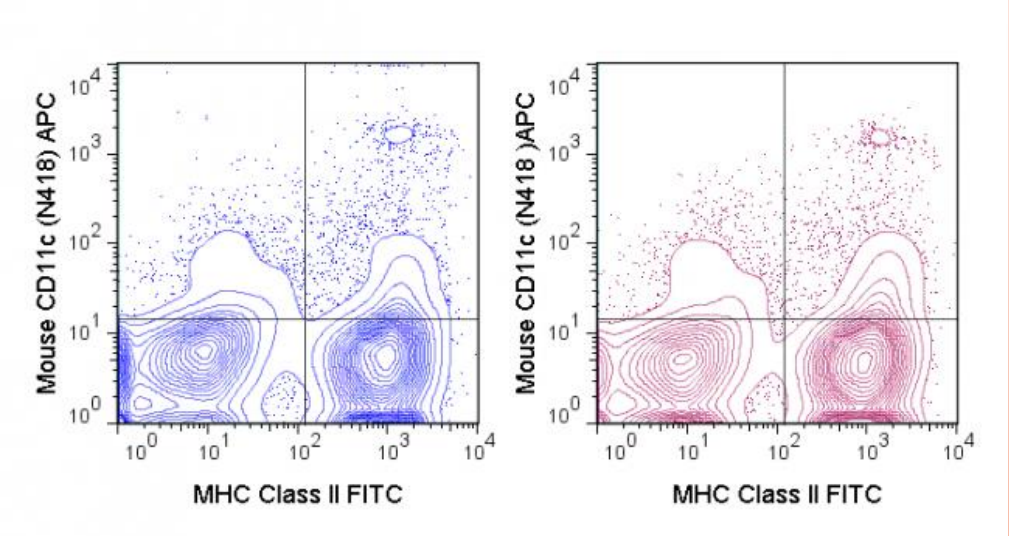
- თალიდომიდისაგან მიღებული სინთეზური ნაერთი;
- ქიმიოთერაპიულ პრეპარატებთან თანაობისას აძლიერებს ბუნებრივ და ადაპტურ იმუნურ პასუხებს ავთვისებიან ზრდაზე პასუხის გაუმჯობესების გზით.

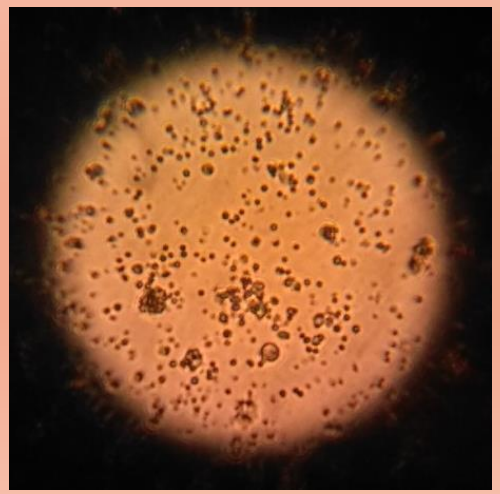
ლენალიდომიდის მოქმედების გზები:

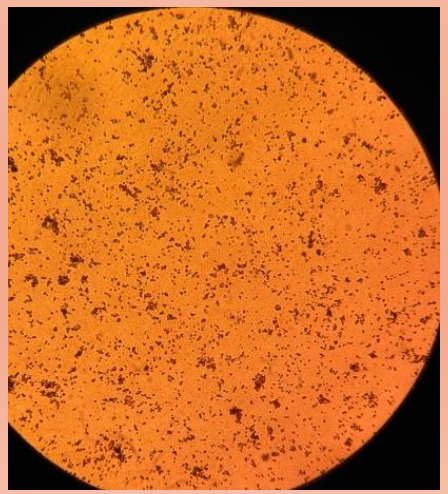


- ციტოკინების წარმოქმნის პროფილური ცვლილება
- T უჯრედების აქტივაცია
- NK უჯრედების ფუნქციის გაძლიერება
- ანტი ანგიოგენეზური აქტივობა
- პირდაპირი ანტისიმსივნური მოქმედება

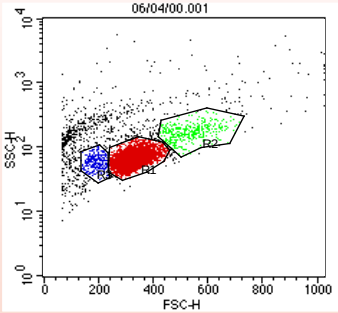
In vitro კვლევის მეთოდები







საკვლევი სამიზნეები და შესწავლილი პარამეტრები:



1. დენდრიტულ უჯრედების **DC** და **RM-1** პროსტატის კიბოს პროლიფერაციის მაჩვენებლები.
2. დენდრიტული უჯრედების ზედაპირული მარკერების **MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD 205, CD40** ექსპრესიის შეფასება.
3. დენდრიტული უჯრედების მიერ **IL-12**-ის და **IL-15**-ის სეკრეციაის შეფასება.
4. დენდრიტული უჯრედების მიერ ენდოთელინის რეცეპტორების (ETa და ETb) ექსპრესიის შეფასება.
5. პროსტატის კიბოს უჯრედების მიერ P1A - სათესლის კიბოს ანტიგენის ექსპრესიის შეფასება.

CD მარკერი	რომელ უჯრედებზეა?	რა პროცესში მონაწილეობს?
CD11c PE	1. DC, (მიელოიდური)+++++ 2. მონოციტი, ++ 3. მაკროფაგი, ++ 4. ნეიტროფილი, + 5. ზოგიერთი B უჯრედი+	CD11c/CD18 კომპლექსი რეცეპტორია კომპლემენტის კომპონენტის iC3b ასევე ფიბრინოგენისა და მონაწილეობს უჯრედის ადჰეზიაში. CD11c ასევე ებმის კომპლემენტის ფაქტორს Bb. CD11c იმუნური პასუხების რეგულაციაში მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს.
CD205 PE	1. DC; +++ 2. თიმუსის ეპიელიუმზე; ++ 3. მომწიფებულ B უჯრედები;+ 4. გრანულოციტები;+ 5. T უჯრედები;+	ეს მემბრანული ცილა ენდოციტური რეცეპტორია და ანტიგენის ეფექტურ პროცესინგსა და პრეზენტაციას უზრუნველყოფს in vivo. რაც T უჯრედების გააქტიურებაზე ან ტოლერანტობის ჩამოყალიბებაზე აისახება.
CD80 PE	1. გააქტიურებული B უჯრედები +++ 2. მონოციტები+++ 3. APC +++	წარმოქმნის T უჯრედების გააქტიურებისა და გადარჩენისთვის აუცილებელ კოსტიმულატორულ სიგნალებს.
CD86 FITC/pe	1. გააქტიურებული B უჯრედები +++ 2. მონოციტები+++ 3. APC+++	წარმოქმნის T უჯრედების გააქტიურებისა და გადარჩენისთვის აუცილებელ კოსტიმულატორულ სიგნალებს.
CD40 PE	APC+++	CD154 (CD40L) - თანდაკავშიტებისასააქტიურებსანტიგენწარმდგენუჯრედსდაახდენსსხვადასხვადაუნსთრიმეფექტებისინდუქციას.
MHC I PE	ყველა ეუკარიოტულ უჯრედზე+++	ანტიგენის პრეზენტაცია CD8+ T-სთვის
MHC II FITC	APC+++	ანტიგენის პრეზენტაცია CD4+ T-სთვის
CD4	T ჰელპერი, მონოციტი, მაკროფაგი, დენდრიტული	CD4 is a co-receptor that assists the T cell receptor (TCR) in communicating with an antigen-presenting cell. Using its intracellular domain, CD4 amplifies the signal generated by the TCR by recruiting an enzyme, the tyrosine kinase Lck, which is essential for activating many molecular components of the signaling cascade of an activated T cell.
CD25	T უჯრედები, აქტივირებული B უჯრედები ზოგიერთი თიმოციტი, მიელოიდური პრეკურსორები, ოლიგოდენდროციტები	CD25 is the alpha chain of the IL-2 receptor.[1] It is a type I transmembrane protein present on activated T cells, activated B cells, some thymocytes, myeloid precursors, and oligodendrocytes that associates with CD122 to form a heterodimer that can act as a high-affinity receptor for IL-2. Though CD25 has been used as a marker to identify CD4+FoxP3+ regulatory T cells in mice, it has been found that a large proportion of resting memory T cells constitutively express CD25 in humans.[2]
CD3		T-cell co-receptor helps to activate the cytotoxic T-Cell. It consists of a protein complex and is composed of four distinct chains.
CD127	Immature B cells through early pre-B stage, thymocytes (except CD4/CD8 double positive thymocytes), peripheral T cells, bone marrow stromal cells	Interleukin-7 receptor subunit alpha (IL7R-α) also known as CD127 (Cluster of Differentiation 127) is a protein that in humans is encoded by the IL7R gene. T cell and immature B cell proliferation and development.

დენდრიტული და RM1 უჯრედების პროლიფერაცია ლენალიდომიდით

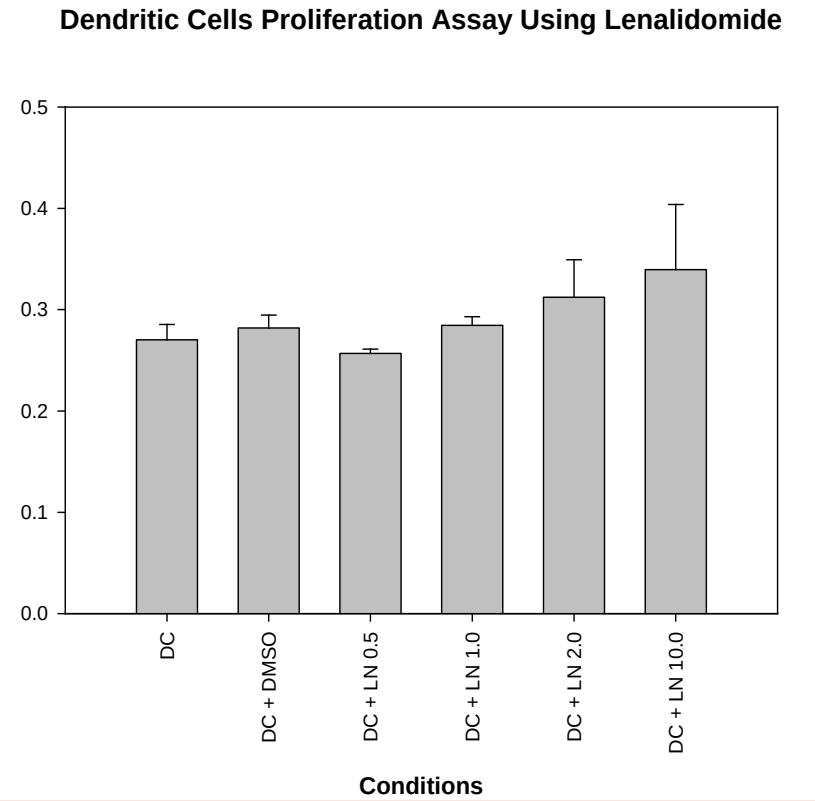


Figure 1. Dendritic cells proliferation assay. DC without stimulation and DC treated with DMSO (solvent for lenalidomide) provided controls. Lenalidomide was used at the concentration of 0.5µM, 1.0µM, 2.0µM and 10µM. No statistical difference was seen when comparing different conditions.
DC – dendritic cells, LN - lenalidomide

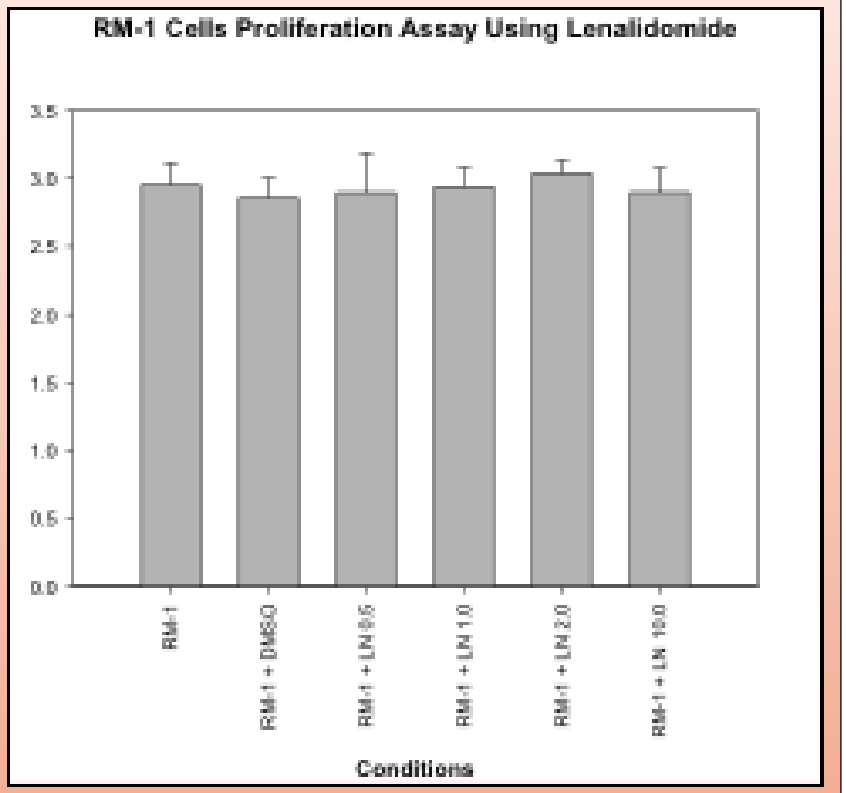


Figure 2. RM-1 prostate cancer cells proliferation assay. Untreated RM-1 cells and RM-1 cells treated with DMSO (solvent for lenalidomide) provided controls. Lenalidomide was used at the concentration of 0.5µM, 1.0µM, 2.0µM and 10µM. No statistical difference was seen in cell proliferation when comparing different conditions. LN - lenalidomide

დენდრიტული და RM-1 უჯრედების პროლიფერაცია 5 - აზაციტიდინით

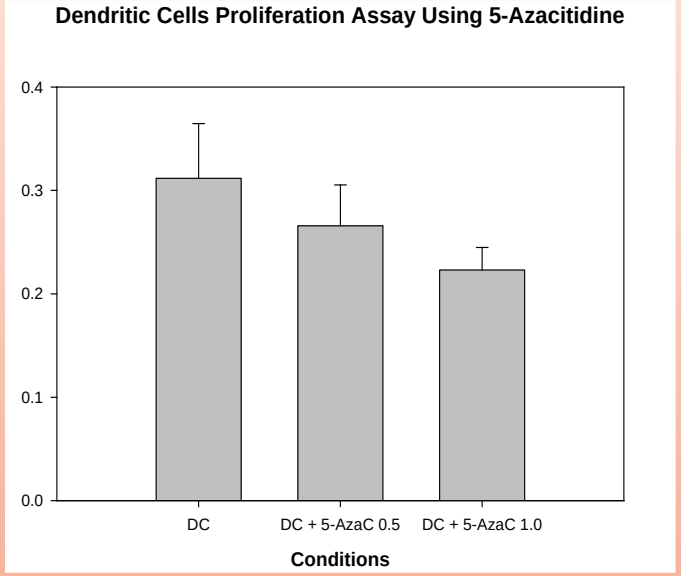


Figure 3. Dendritic cells proliferation assay.
DC without stimulation provided control.
5-Azacitidine (5-AzaC) was used at the concentrations of 0.5μM and 1.0μM. Statistically significant difference in cell proliferation from the control (decrease) was seen at the 5-AzaC concentration of 1.0 μM.
5-AzaC – 5-Azacitidine, DC – dendritic cells

- Depicts statistically significant difference in comparison to untreated DC

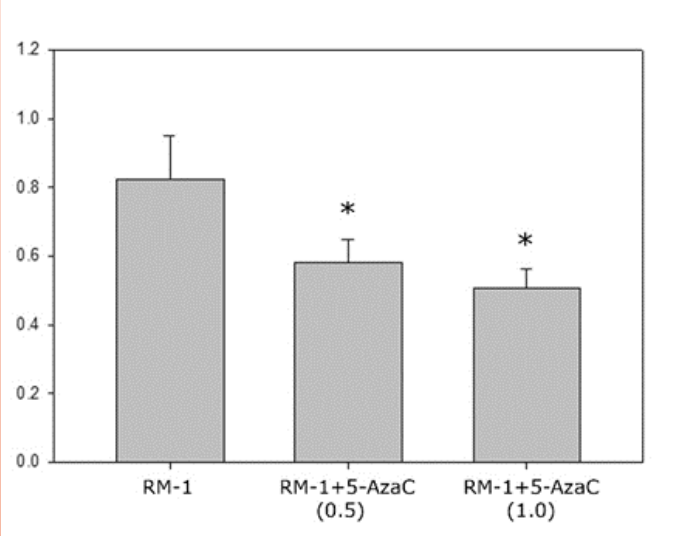
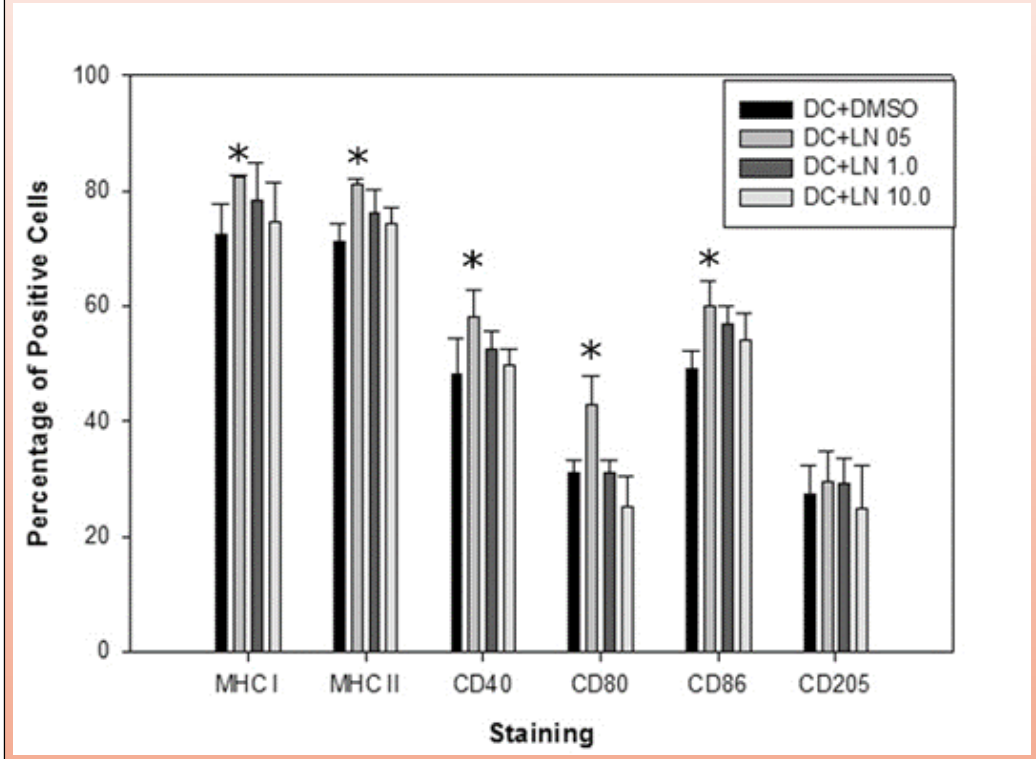


Figure 4. RM-1 cells proliferation assay. RM-1 cells without treatment provided control.
5-Azacitidine (5-AzaC) was used at the concentrations of 0.5μM and 1.0μM. Statistically significant difference in cell proliferation from the control (decrease) was seen at both 5-AzaC concentrations.
5-AzaC – 5-Azacitidine, RM-1 – murine prostate cancer cells

- Depicts statistically significant difference in
- comparison to RM-1 cells

დენდრიტული უჯრედების ზედაპირული მარკერების MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD 205, CD40 ექსპრესია ლენალიდომიდით აქტივაციისას



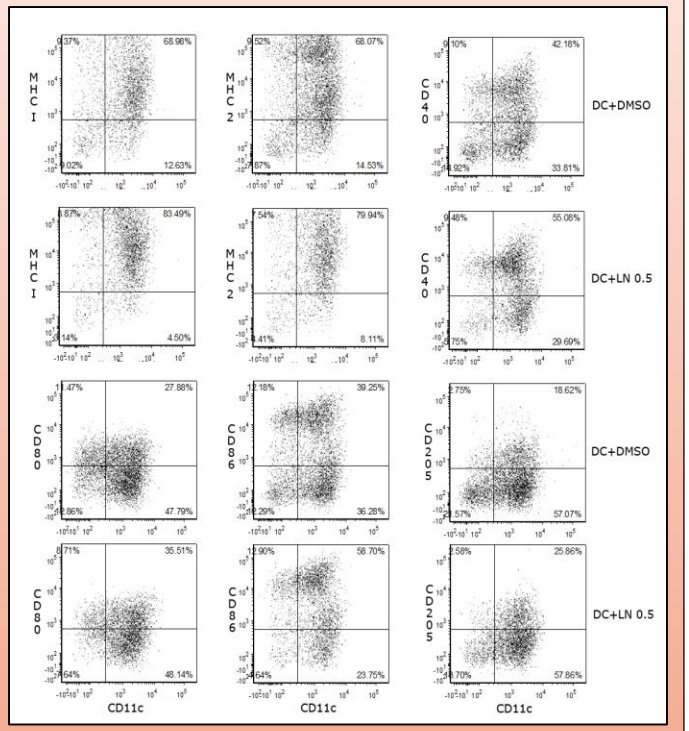


Figure 5. Flow cytometry results for DC treated with lenalidomide.
DC treated with DMSO (0.1%, solvent for lenalidomide) provided control. Lenalidomide was used at the concentration of 0.5μM, 1.0μM, and 10μM. DMSO and lenalidomide were applied for the last 48 hours of culture. DC were stained with following antibodies: MHC class I, MHC class II, CD40, CD80, CD86, CD205.
LN – lenalidomide, DC – dendritic cells
* Depicts statistically significant difference in comparison to DMSO-treated DC

Figure 6.
Comparison dot-plots between DC treated with DMSO (0.1%) and lenalidomide (0.5 μM) for the last 48 hours of culture. There was approximately 10% rise in the expression of DC markers after the exposure to lenalidomide at the 0.5 μM concentration.
LN – lenalidomide, DC – dendritic cells

დენდრიტული უჯრედების მიერ ენდოთელინის რეცეპტორების (ET_A და ET_B) ექსპრესიის შეფასება 5-AzaC -ით დოზადამოკიდებული აქტივაციისას

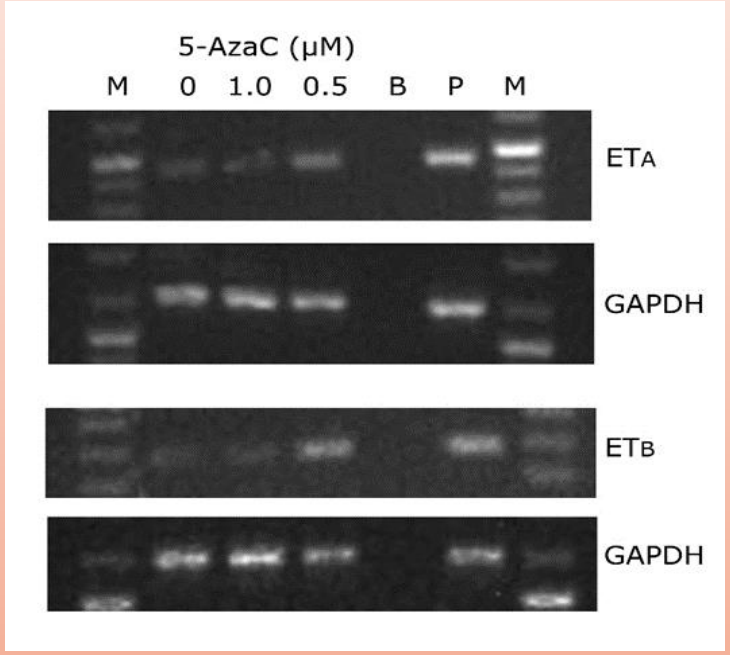


Figure 7. RT-PCR performed on dendritic cells after their stimulation with 5-AzaC for the last 48 hours of culture to determine the dose-dependent induction of the endothelin receptors A and B. Untreated DC provided the control. 5-AzaC was used at the concentrations of 0.5 μM and 1.0 μM.
Treated and control cells were harvested, total RNA was extracted and used as a template to determine the expression of endothelin receptors (ET_A and ET_B) and control gene GAPDH.
B – blank, P – positive control, M – DNA molecular weight markers.
5-AzaC – 5-azacitidine, ET_A – endothelin receptor A, ET_B – endothelin receptor B

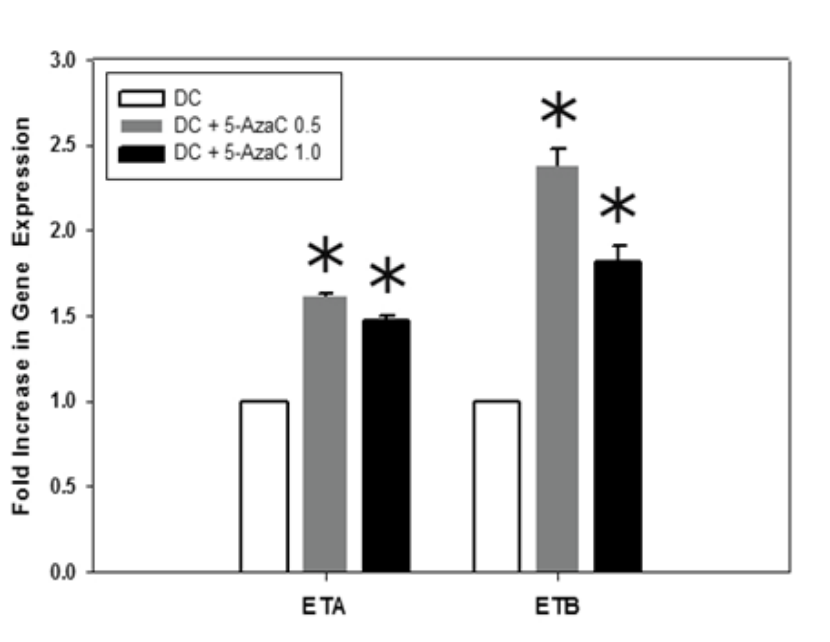


Figure 8. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) for the expression of endothelin receptors A and B (ET_A and ET_B) in DC after their treatment with different concentrations of 5-AzaC (0.5 μM and 1.0 μM).
5-AzaC – 5-azacitidine, DC – dendritic cells, ET_A – endothelin receptor A, ET_B – endothelin receptor B.
* Depicts statistically significant difference in comparison to untreated DC

პროსტატის კიბოს RM-1 უჯრედების მიერ P1A - სათესლის კიბოს ანტიგენის ექსპრესია 5-AzaC-ით ზემოქმედებისას

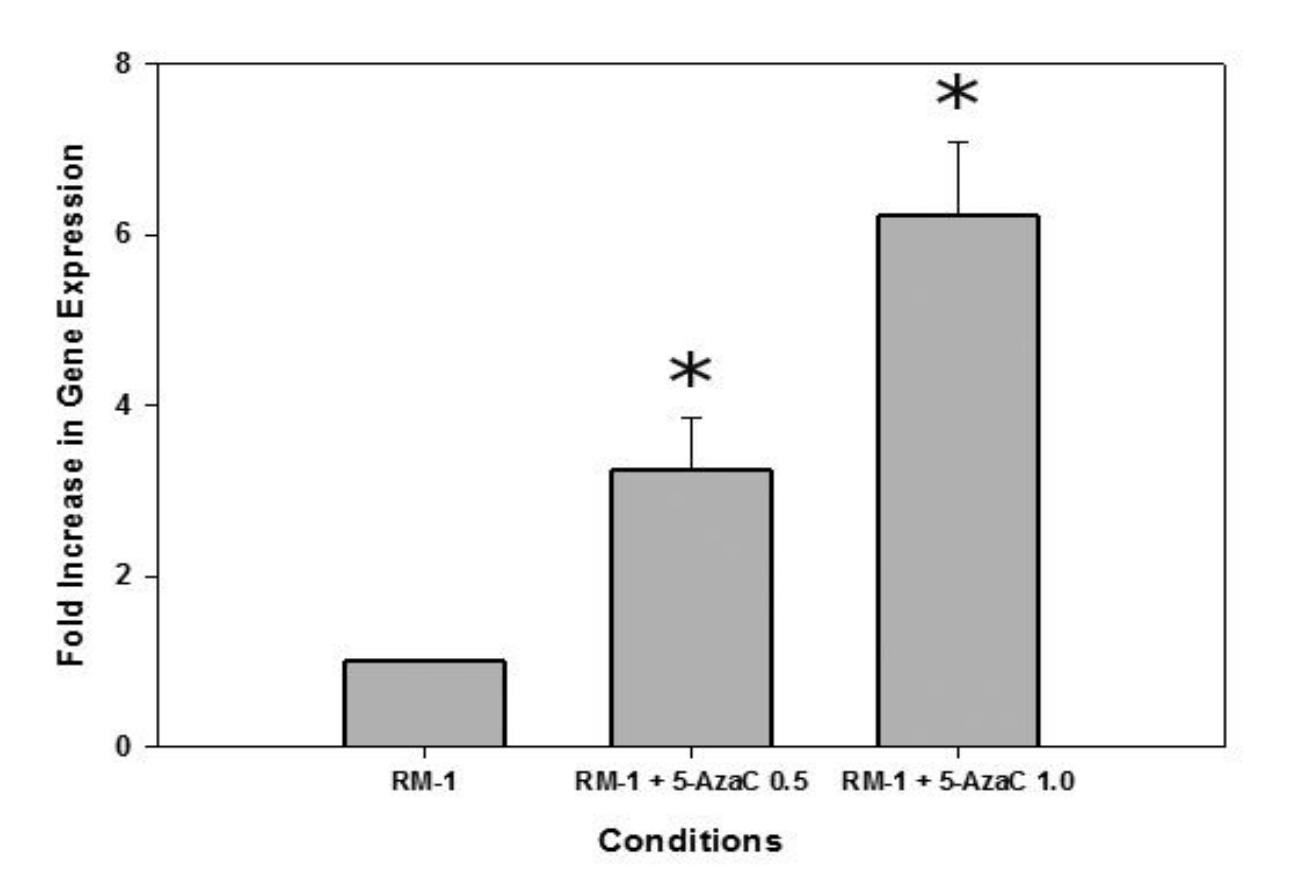


Figure 9.
Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) for the expression of P1A (cancer testis antigen) gene in DC after their treatment with different concentrations of 5-AzaC (0.5 μM and 1.0 μM). There was a statistically significant dose-dependent increase of the P1A gene expression.
5-AzaC – 5-Azacitidine, RM-1 – murine prostate cancer cells
* Depicts statistically significant difference in comparison to untreated RM-1 cells

დენდრიტული უჯრედების მიერ IL-12-ის და IL-15-ის სეკრეციის შეფასება ლენალიდომიდით აქტივირებისას

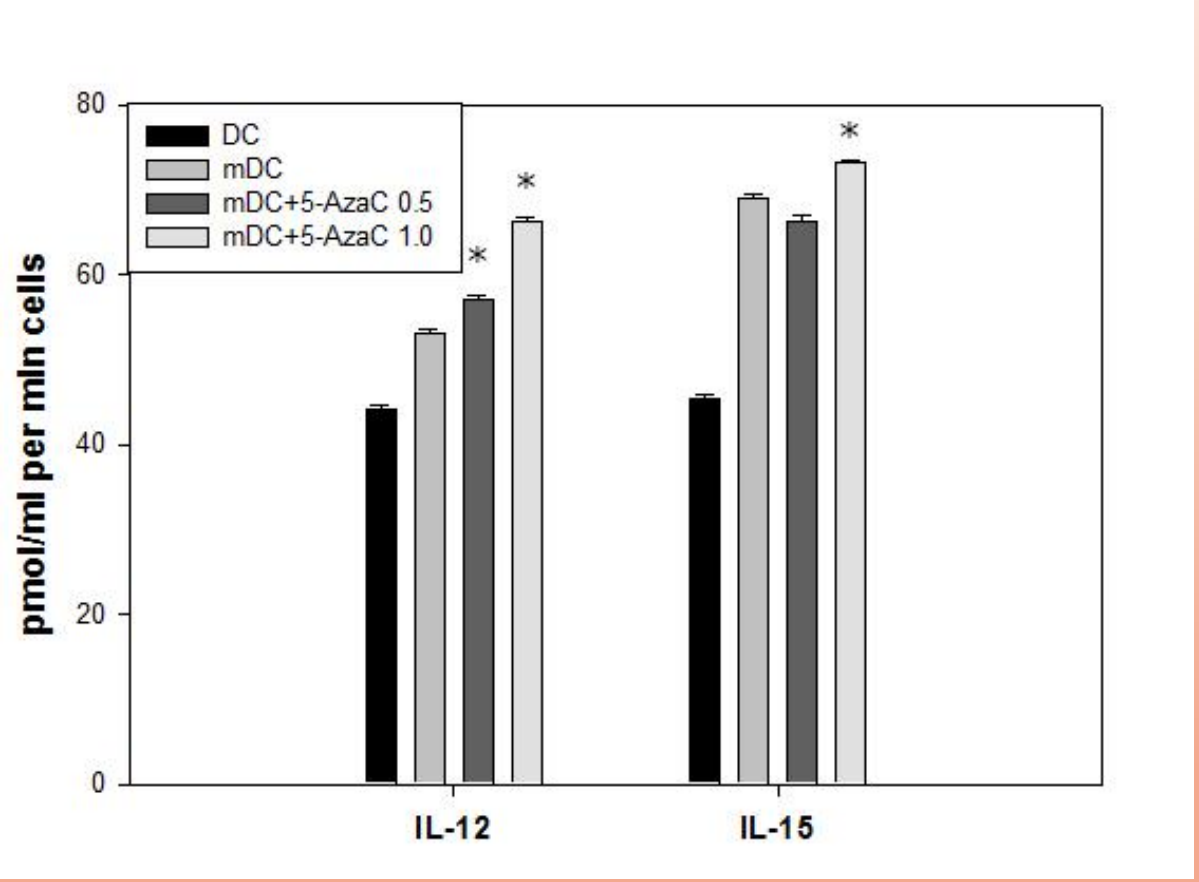


Figure 10.

The production of IL-12 and IL-15 by DC after exposure to 5-AzaC at different concentrations (0.5 μM and 1.0 μM) for 48 hours.

5-AzaC – 5-azacitidine, DC – dendritic cells, mDC – mature dendritic cells

* Depicts statistically significant difference in comparison to mDC

ამრიგად,

წინამდებრე ნაშრომში ჩვენ შევაფასეთ ეპიგენეტიკური მოდიფიკატორის 5-აზაციტიდინისა (5-AzaC) და იმუნომოდულატორის - ლენალიდომიდის როლი და მათი შესაძლო გავლენა იმუნურ პასუხზე პროსტატის კიბოს თაგვის ექსპერიმენტულ მოდელში.

ჩვენ შევისწავლეთ მათი გავლენა თაგვის პროსტატის სიმსივნის უჯრედებზე და დენდრიტულ უჯრედებზე (DC), რომელსაც ანტიგენის წარდგენის ყველაზე დიდი პოტენციალი აქვს.

შედეგების შეჯამება:

- **5-AzaC**-ით მკურნალობის შედეგად **RM-1** პროსტატის კიბოსა და დენდრიტულ უჯრედებზე მიღებულია პროლიფერაციის დაქვეითება, მაშინ როცა ლენალიდომიდს არ ჰქონდა ეფექტი.

- ლენალიდომიდით აქტივირებული დენდრიტული უჯრედების შეფასებისას გამდინარე ციტომეტრიით ნანახი იქნა ზედაპირული მარკერების **MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD 205 და CD40** ექსპრესიის მომატება.

- **IL-12**-ის და **IL-15**-ის სეკრეცია დენდრიტული უჯრედების მიერ მნიშვნელოვნად იყო გაზრდილი **5-AzaC**-ის დამატებისას.

- ასევე შეცვლილი იყო ენდოთელინის რეცეპტორების ექსპრესია დენდრიტულ უჯრედებზე, რაც შესაძლოა აისახოს მათ ფუნქციაზე.

- **5-AzaC-**ის დამატების შედეგად ასევე გაზრდილია ექსპრესია სათესლის კიბოს ანტიგენის, **P1A,** პროსტატის კიბოს უჯრედების მიერ.

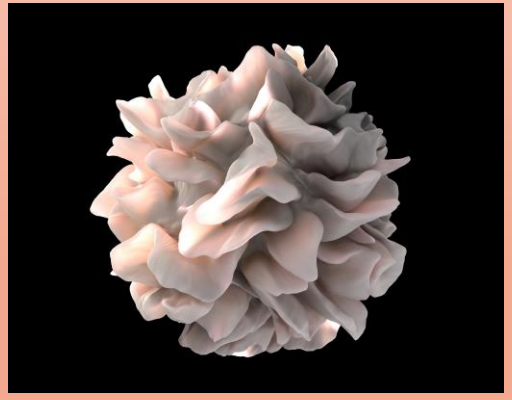
დასკვნები

- ეპიგენეტიკური მოდიფიკაციების და იმუნომოდულაციის კომბინაცია 5-AzaC-ითა და ლენალიდომიდით **ზრდის სიმსივნის იმუნოგენურობას და აძლიერებს დენდრიტული უჯრედების ფუნქციას**, რაც აისახება სიმსივნური ანტიგენის პრეზენტაციის და ანტისიმსივნური იმუნიტეტის გაძლიერებაში.

- 5-AzaC-ისა და ლენალიდომიდის კომბინაცია შესაძლოა შეთავაზებული იყოს პროსტატის კიბოს მკურნალობაში და რეკომენდებული იყოს **არსებული ქიმიოთერაპიული რეჟიმების და ადოპტური საშუალებების ეფექტურობის გასაზრდელად**.

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი,
იმუნოლოგიისა და მიკრობიოლოგიის კათედრა.
თბილისი, საქართველო.

Virginia Commonwealth University,
School of Medcine, Department of Urology.
Richmond, USA

შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდი
SHOTA RUSTAVELI NATIONAL SCIENCE FOUNDATION

მადლობას მოგახსენებთ
თქვენი დროის დათმობისთვის
და ყურადღებისთვის.