

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ORIGINAL PAPER

Η *ex vivo* επαγωγή ανοχής του Toll-like receptor 7 στα λεμφοκύτταρα του δότη ως μέσο προφύλαξης της πειραματικής οξείας νόσου του μοσχεύματος κατά ξενιστή*

ΣΚΟΠΟΣ Η οξεία νόσος του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (acute Graft-versus-Host Disease, aGvHD) παραμένει η σημαντικότερη αιτία θνητότητας και νοσηρότητας μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (MAAK). Οι συμβατικές στρατηγικές πρόληψης ή θεραπείας είναι συχνά αναποτελεσματικές και οδηγούν σε γενικευμένη ανοσοκαταστολή και σε αυξημένη ευαισθησία σε ευκαιριακές λοιμώξεις, καθιστώντας αναγκαία την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης. Οι ανάλογοι των Toll υποδοχείς (Toll-like receptors, TLRs) ανήκουν στην οικογένεια των υψηλά συντηρημένων υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern-recognition receptors) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων του δότη στην ανάπτυξη aGvHD. Πρόσφατα, έχουν περιγραφεί ρυθμιστικοί μηχανισμοί TLR επαγόμενης ανοχής έπειτα από χορήγηση χαμηλών, επαναλαμβανόμενων δόσεων TLR αγωνιστών, στο πλαίσιο αυτοανοσίας. Διερευνήθηκε η δυνατότητα *ex vivo* επαγωγής ανοχής στους TLR2, 4, 7 με παρατεινόμενη έκθεση λεμφοκυττάρων σε χαμηλές δόσεις ειδικών αγωνιστών, ως μέσο πρόληψης της αλλοδραστικότητας και της εμφάνισης aGvHD σε ζωικό μοντέλο ασύμβατης μεταμόσχευσης. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Πραγματοποιήθηκε επαγωγή ανοχής στους TLR2, 4, 7 σε σπληνοκύτταρα (ΣΚ) με παρατεινόμενη έκθεσή τους σε χαμηλές δόσεις των αντίστοιχων ειδικών αγωνιστών (Pam3CK54, LPS, R848, αντίστοιχα) και μέτρηση των επιπέδων TNF-α σε υπερκείμενο καλλιέργειών μετά από πρόκληση διέγερσης με υψηλή δόση αγωνιστών. Οι αλλαγές που επέφερε η επαγωγή ανοχής σε ΣΚ και κεκαθαρμένα T-λεμφοκύτταρα, τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο, ελέγχθηκαν με ανοσοφαινοτυπικές αναλύσεις και με μελέτες έκφρασης γονιδίων. Η επίπτωση aGvHD σε μοντέλο ασύμβατης μεταμόσχευσης αξιολογήθηκε με βάση την κλινική βαθμολογία νόσου και την επιβίωση των ληπτών, καθώς και με παθολογοανατομική εξέταση των ιστών-στόχων. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Επιτεύχθηκε επαγωγή TLR2, 4 και 7-ανοχής σε ΣΚ ποντικών μετά από απευαισθητοποίησή τους με τους αντίστοιχους αγωνιστές. Ωστόσο, μόνο η R848-επαγόμενη TLR7 ανοχή σε ολικά ΣΚ ή κεκαθαρμένα CD3⁺ T-κύτταρα, η οποία διατηρήθηκε για τουλάχιστον 30 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση, απέτρεψε την εμφάνιση aGvHD. Η αντι-GvHD δράση συσχετίστηκε, τόσο *ex vivo* όσο και *in vivo*, με διακριτή κυτταρική και μοριακή υπογραφή των TLR7 ανοχικών κυττάρων σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές ομάδες: παρατηρήθηκε στροφή των T-λεμφοκυττάρων προς ανοσορρυθμιστικό (Treg) φαινότυπο, καταστολή φλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών και ανοσοαποκρίσεων της έμφυτης ανοσίας, καθώς και υπερέκφραση αρνητικών διαμεσολαβητών της φλεγμονής. Παρά την υποέκφραση μονοπατιών της έμφυτης ανοσίας, τα TLR7 ανοχικά T-κύτταρα διατήρησαν την ανοσολογική τους μνήμη και δραστηριότητα, παράγοντας ειδικά αντι-ιικά T-κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε ιικά αντιγόνα. Η αντι-aGvHD δράση μέσω επαγόμενης ανοχής ήταν ειδική για τον TLR7 καθώς τα TLR7^{-/-} T-κύτταρα δεν

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2016, 33(6):782-795
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2016, 33(6):782-795

N. Ζώγας,^{1,2}
Γ. Καρπόνη,¹
Φ. Ιορδανίδης,³
Β. Παρασκευάς,^{1,2}
Α. Παπαδοπούλου,¹
Ζ. Σκούρας,²
Α. Αναγνωστόπουλος,¹
Ε. Γιαννάκη¹

¹Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική Κλινική-Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

²Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

³Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

Ex vivo tolerance induction to Toll-like receptor 7 in donor lymphocytes as a prophylactic tool in experimental acute graft-versus-host disease

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Ανάλογοι των Toll υποδοχείς
Έμφυτη ανοσία
Πρόληψη aGvHD
TLR7 ανοχή
TLR σηματοδότηση

*Επαινος του Επάθλου «Σωτήρης Παπασταμάτης» στο πλαίσιο του 42ου Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου (Αθήνα, 11-14 Μαΐου 2016).

απέτρεψαν την aGvHD. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Προτείνεται μια μη παρεμβατική, κλινικά εφαρμόσιμη, προσέγγιση για την πρόληψη της aGvHD, με χρήση ενός παροδικού και αναστρέψιμου ανοσολογικού επαναπρογραμματισμού των λεμφοκυττάρων του δότη, μέσω επαγωγής TLR7 ανοχής.

Η οξεία νόσος του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (acute Graft-versus-Host Disease, aGvHD) αποτελεί τον κυριότερο, μη σχετιζόμενο με υποτροπή, παράγοντα θνητότητας και νοσηρότητας μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΑΚ).¹ Οι μέθοδοι πρόληψης και αντιμετώπισης που εφαρμόζονται σήμερα είναι συχνά αναποτελεσματικές, καθώς προϋποθέτουν γενικευμένη ανοσοκαταστολή του ασθενούς. Το 40% των ασθενών που υποβάλλονται σε αλλογενή ΜΑΑΚ εμφανίζει aGvHD, από τους οποίους το 60% παρουσιάζει ανοχή ή χαμηλή απόκριση σε κορτικοστεροειδή. Κατά συνέπεια, κρίνεται αναγκαία η εύρεση νέων εναλλακτικών μορφών θεραπείας ή πρόληψης της νόσου.

Η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων του μοσχεύματος, που πυροδοτεί τον μηχανισμό εμφάνισης της aGvHD, προϋποθέτει πρόσδεση αλλογενών πεπτιδίων στους TCR υποδοχείς και, παράλληλα, συνδιεγερτικά σήματα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που διαμεσολαβούνται μέσω των αναλόγων των Toll υποδοχέων (Toll-like receptors, TLRs).² Οι εν λόγω υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας συγκαταλέγονται στους υψηλά συντηρημένους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων που εκφράζονται ευρέως σε αιμοποιητικά και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα. Αλληλεπιδρούν δε τόσο με εξωγενή μοριακά πρότυπα συνδεδεμένα με παθογένεια, όσο και με φλεγμονώδη ενδογενή μόρια τα οποία παράγονται κατά τη «στείρα ιστική βλάβη».³

Η ενεργοποίηση των TLRs από προϊόντα της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, ως συνέπεια του προπαρασκευαστικού σχήματος της μεταμόσχευσης, αναγνωρίστηκε ως εναρκτήριος μηχανισμός φλεγμονής κατά την εμφάνιση της GvHD⁴ και έκτοτε εφαρμόζεται η εντερική «απολύμανση» του λήπτη πριν από την έγχυση του μοσχεύματος, με από του στόματος αντιβιοτικά. Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος των TLRs στην GvHD δεν έχει αποσαφηνιστεί καθώς αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα σ' ό,τι αφορά στο ρόλο τους στην εμφάνιση της νόσου.⁵⁻¹⁰

Εκτός από την εμπλοκή των TLRs σε προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, είναι πιθανή η συμβολή τους σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς ανάπτυξης ανοχής. Ενώ η χορήγηση μιας μονήρους και υψηλής δόσης TLR αγωνιστή προκαλεί έντονη απόκριση των κυττάρων και υψηλή έκκριση κυτταροκινών, η επαναλαμβανόμενη έκθεσή τους σε χαμηλές δόσεις TLR αγωνιστή μειώνει τη μετέπειτα φλεγμονώδη απόκριση

τους με ενεργοποίηση υψηλής δόσης του ίδιου αγωνιστή, φαινόμενο γνωστό ως TLR ανοχή.¹¹

Μελέτες απευαισθητοποίησης με *in vivo* χορήγηση χαμηλών επαναλαμβανόμενων δόσεων TLR4 και TLR7 αγωνιστών είχαν εντυπωσιακά αποτελέσματα στην πρόληψη αυτοάνοσων παθήσεων, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα.^{12,13} Σχετικά με την aGvHD, αντικρουόμενες αναφορές δείχνουν ότι η *in vivo* χορήγηση TLR4, TLR5 και TLR7/8 αγωνιστών σε πειραματικά μοντέλα αλλογενούς μεταμόσχευσης άλλοτε μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου^{9,14} και άλλοτε την επιταχύνει.⁸

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διαπιστωθεί εάν η *ex vivo* TLR-2, -4 και -7 επαγωγή ανοχής στα λεμφοκύτταρα του δότη αποτρέπει την αλλοδραστικότητα σε ζωικό μοντέλο ασύμβατης μεταμόσχευσης.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια C57BL/6J, BALB/c και B6 TLR7^{-/-} (γένος B6.129S1-Tlr7tm1Flv/j), ηλικίας 12-16 εβδομάδων. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν μετά από ειδική έγκριση της τοπικής κτηνιατρικής υπηρεσίας.

Επαγωγή TLR ανοχής

Σπληνοκύτταρα (ΣΚ) απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε αναλογία 3×10⁶ κύτταρα/mL σε θρεπτικό μέσο (RPMI1640, 10% βόειος εμβρυϊκός ορός, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη-100 μg/mL στρεπτομυκίνη, 50 μM β-μερκαπτοαιθανόλη), παρουσία χαμηλών δόσεων TLR αγωνιστών (0,25-1 μg/mL Pam3CSK4, 5-100 ng/mL LPS από *E. coli* O111:B4 και 1-5 μg/mL R848) για τρεις διαφορετικές περιόδους (1×24ωρο, 2×24ωρο και 3×24ωρο). Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την τελευταία δόση, τα κύτταρα διεγέρθηκαν με υψηλή δόση του εκάστοτε αγωνιστή (5 μg/mL Pam3CSK4, 1 μg/mL LPS και 25 μg/mL R848) και 2 ώρες αργότερα μετρήθηκε η συγκέντρωση του εκκρινόμενου TNF-α με ELISA. Οι βέλτιστες συνθήκες απευαισθητοποίησης καθορίστηκαν με βάση το μέγεθος μείωσης του TNF-α και χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα περαιτέρω πειράματα.

Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην εικόνα

3α. Υψηλής καθαρότητας κύτταρα μυελού των οστών με <0,5% T-λεμφοκύτταρα (MO_{TCO}) αποκτήθηκαν έπειτα από αρνητική επιλογή των T-λεμφοκυττάρων με CD3ε-μαγνητικά σφαιρίδια (mid-MACs). Σε κάθε λήπτη χορηγήθηκαν 5×10^6 κύτταρα MO_{TCO} $\pm 30 \times 10^6$ TLR-2, 4, 7 απευαισθητοποιημένα ολικά ΣΚ αλλογενούς δότη. Σε ορισμένα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν θετικά επιλεγμένα (>90%) CD3⁺ T-κύτταρα αντί ολικά ΣΚ (2×10^6 C57BL/6J ή B6 TLR7^{-/-} CD3⁺ T-κύτταρα προεπεξεργασμένα με R848 ή αλατούχο διάλυμα PBS). Στους λήπτες πραγματοποιούνταν αιμοληψίες εβδομαδιαία, από την ημέρα 7 μετά τη μεταμόσχευση έως την ημέρα 60 ή νωρίτερα, σε περίπτωση αναγκαίας ευθανασίας. Η κλινική εικόνα του κάθε λήπτη ελεγχόταν καθημερινά και δύο φορές την εβδομάδα βαθμολογείτο με βάση τα κριτήρια αξιολόγησης της aGvHD σε μοντέλο ποντικού: απώλεια βάρους, στάση σώματος, δραστηριότητα, υφή τριχώματος, ακεραιότητα δέρματος.

Ιστοπαθολογία

Βιοπτικά υλικά δέρματος, λεπτού/παχέος εντέρου και στομάχου συλλέχθηκαν από τους λήπτες την ημέρα της θυσίας. Τα υλικά μονιμοποιήθηκαν σε 10% ουδέτερη φορμόλη, αφυδατώθηκαν σε αλκοολικά διαλύματα και εγκλειστήκαν σε παραφίνη. Τομές πάχους 3 μm χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και εξετάστηκαν τυφλά από ειδικό παθολογοανατόμο.

Ανοσοφαινότυπος

Οι ανοσοφαινοτυπικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα σε κυτταρομέτρο FACSCalibur (BD). Για την ενδοκυττάρια χρώση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 χρησιμοποιήθηκε ειδικό kit διαπερατότητας της κυτταροπλάσματικής/πυρηνικής μεμβράνης (eBioscience).

Προφίλ γονιδιακής έκφρασης της TLR σηματοδότησης

Ολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα με χρήση του Qiamp RNA blood mini kit (QIAGEN) και 0,5 ng χρησιμοποιήθηκαν για την ανάστροφη μεταγραφή του σε cDNA, με χρήση του RT² First Strand Kit (QIAGEN). Η ανάλυση της TLR σηματοδότησης πραγματοποιήθηκε με RT-PCR πραγματικού χρόνου, εφαρμόζοντας συστοιχίες mouse Toll-like Receptor RT² Profiler PCR Array (QIAGEN). Η έκφραση του κάθε γονιδίου υπολογίστηκε με τη μέθοδο ΔΔCt. Θεωρήθηκε ότι τα γονίδια υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται, εάν η μέση μεταβολή της έκφρασής τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ήταν ≥ 2 ή $\leq 0,5$, αντίστοιχα. Η βιοπληροφορική ανάλυση των οντολογικών όρων των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GO Consortium (<http://geneontology.org>).

Λειτουργικός χαρακτηρισμός των R848-απυαισθητοποιημένων κυττάρων

Κεκαθαμένα CD3⁺-κύτταρα απομονώθηκαν με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό από οροθετικό στον CMV και στον EBV δότη, μετά

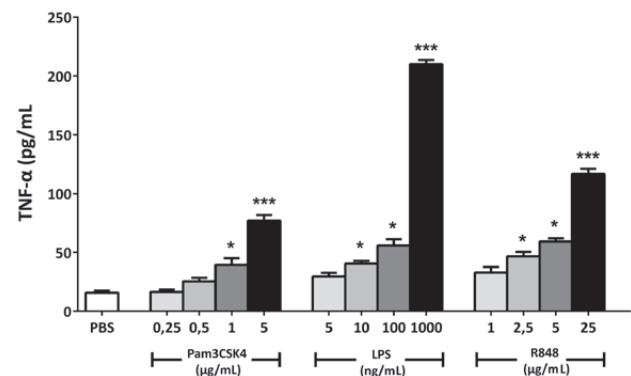
από ενυπόγραφη συγκατάθεσή του και στη συνέχεια απευαισθητοποιήθηκαν με R848. Τα T-λεμφοκύτταρα συγκαλλιέργηθηκαν για 10 ημέρες, σε αναλογία 14:1, με ακτινοβολημένα (30 Gy) αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα, εκτεθειμένα προηγουμένως για 30 min σε 100 ng CMV (IE1, pp65) και EBV (EBNA1, LMP2, BZLF1) ιικών αντιγόνων. Στο τέλος της καλλιέργειας, η ειδικότητα των T-λεμφοκυττάρων έναντι των ιικών αντιγόνων ελέγχθηκε με, εκ νέου, έκθεση στα ιικά αντιγόνα και μέτρηση με ELISPOT της ικανότητάς τους να εκκρίνουν IFN-γ.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων (SE). Οι πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων για μία ή περισσότερες μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας one- ή two-way ANOVA, αντίστοιχα, ακολουθούμενες από πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη με τη δοκιμασία Tukey. Διαφορές μεταξύ δύο πειραματικών ομάδων για μία μεταβλητή προσδιορίστηκαν με t-test. Για τις καμπύλες επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε το log-rank test. Τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικός στόχος ήταν ο προσδιορισμός του εύρους συγκέντρωσης των TLR-2, -4 και -7 αγωνιστών (Pam3CSK4, LPS και R848, αντίστοιχα) που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χαμηλές και υψηλές δόσεις κατά την επώαση των κυττάρων. Οι δόσεις των αγωνιστών που προκάλεσαν μικρή έκκριση TNF-α ($p = ns$, $p < 0,05$) χρησιμοποιήθηκαν ως χαμηλές δόσεις επαγωγής ανοχής, ενώ εκείνες με τις οποίες επιτεύχθηκε μέγιστη έκκριση TNF-α χρησιμοποιήθηκαν ως υψηλές δόσεις διέγερσης των ΣΚ (εικ. 1). Για τον εντοπισμό των βέλτιστων συνθηκών επαγωγής ανοχής των ΣΚ δοκιμάστηκαν τρεις χαμηλές δόσεις απευαισθητοποίησης για 24,



Εικόνα 1. Καθορισμός των καταλληλότερων TLR αγωνιστών δόσεων για τη διέγερση των κυττάρων (υψηλές δόσεις) και για την επαγωγή TLR-2, -4 και -7 ανοχής (χαμηλές δόσεις).

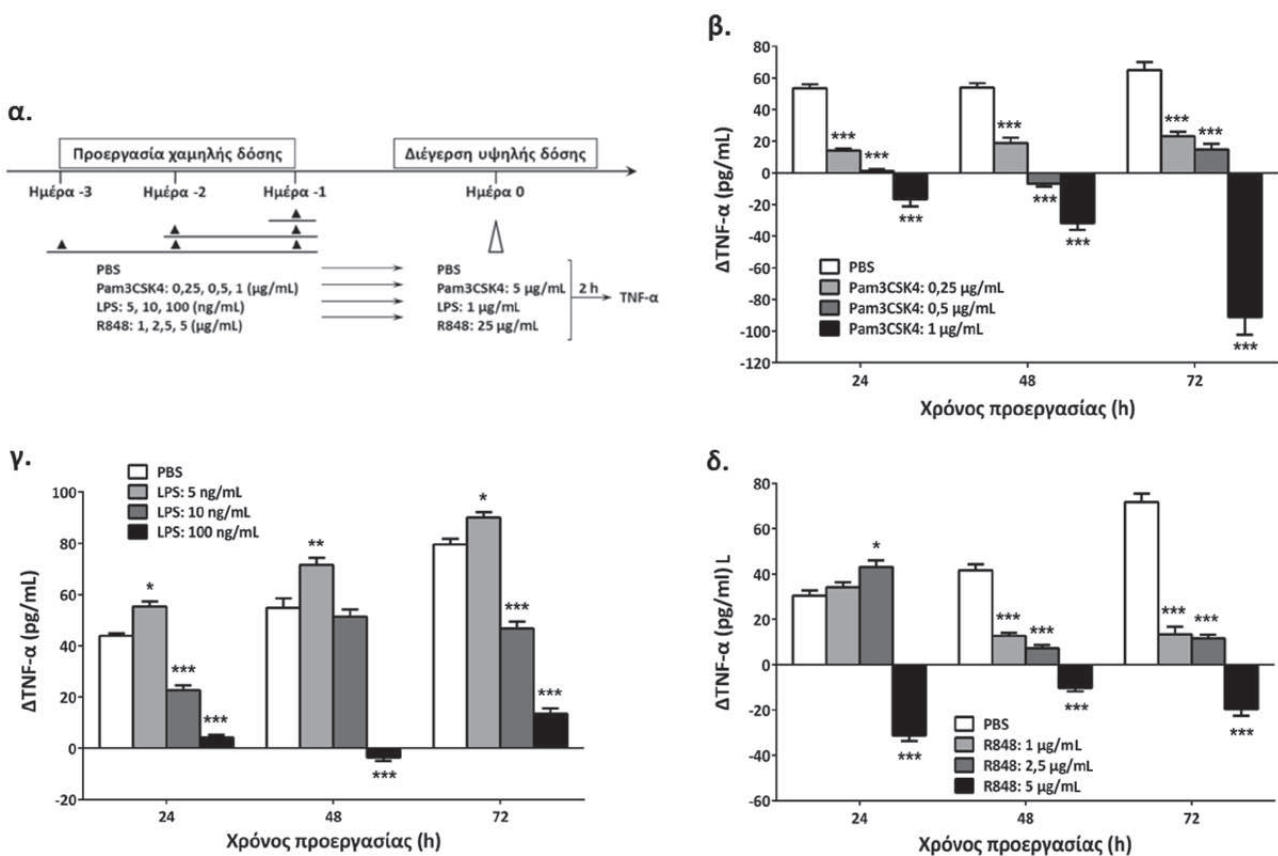
48 και 72 ώρες (εικ. 2α). Βέλτιστη επαγωγή ανοχής στους TLR2-, 4-, 7 επιτεύχθηκε μετά από έκθεση των ΣΚ στους αγωνιστές για 72 ώρες και στις μέγιστες συγκεντρώσεις απευαισθητοποίησης ($p < 0,001$) (εικ. 2β-δ).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση της –μέσω των TLR-2, -4 και -7 αγωνιστών– διαμεσολαβούμενης ανοχής των ΣΚ στην ανάπτυξη aGvHD, σε ασύμβατο μοντέλο μεταμόσχευσης (δότες: C57BL/6J, λήπτες: BALB/c) (εικ. 3α). Οι λήπτες των προεπεξεργασμένων ΣΚ με PBS, Pam3CSK4 και LPS ανέπτυξαν σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τη μεταμόσχευση σοβαρά συμπτώματα aGvHD, όπως προέκυψε από την υψηλή κλινική βαθμολογία ($p < 0,01$) και τη μικρή συχνότητα επιβίωσης ($p < 0,001$). Αντίθετα, τα ποντίκια που έλαβαν TLR7-απυαισθητοποιημένα σπληνοκύτταρα (ΣΚ_{R848}) παρουσίασαν χαμηλή κλινική βαθμολογία και επιβίωση παρόμοια με τους λήπτες που έλαβαν κύτταρα μυελού των οστών από τα οποία αφαιρέθηκαν τα T-λεμφοκύτταρα (ΜΟ_{ΤCD}) (εικ. 3β-γ).

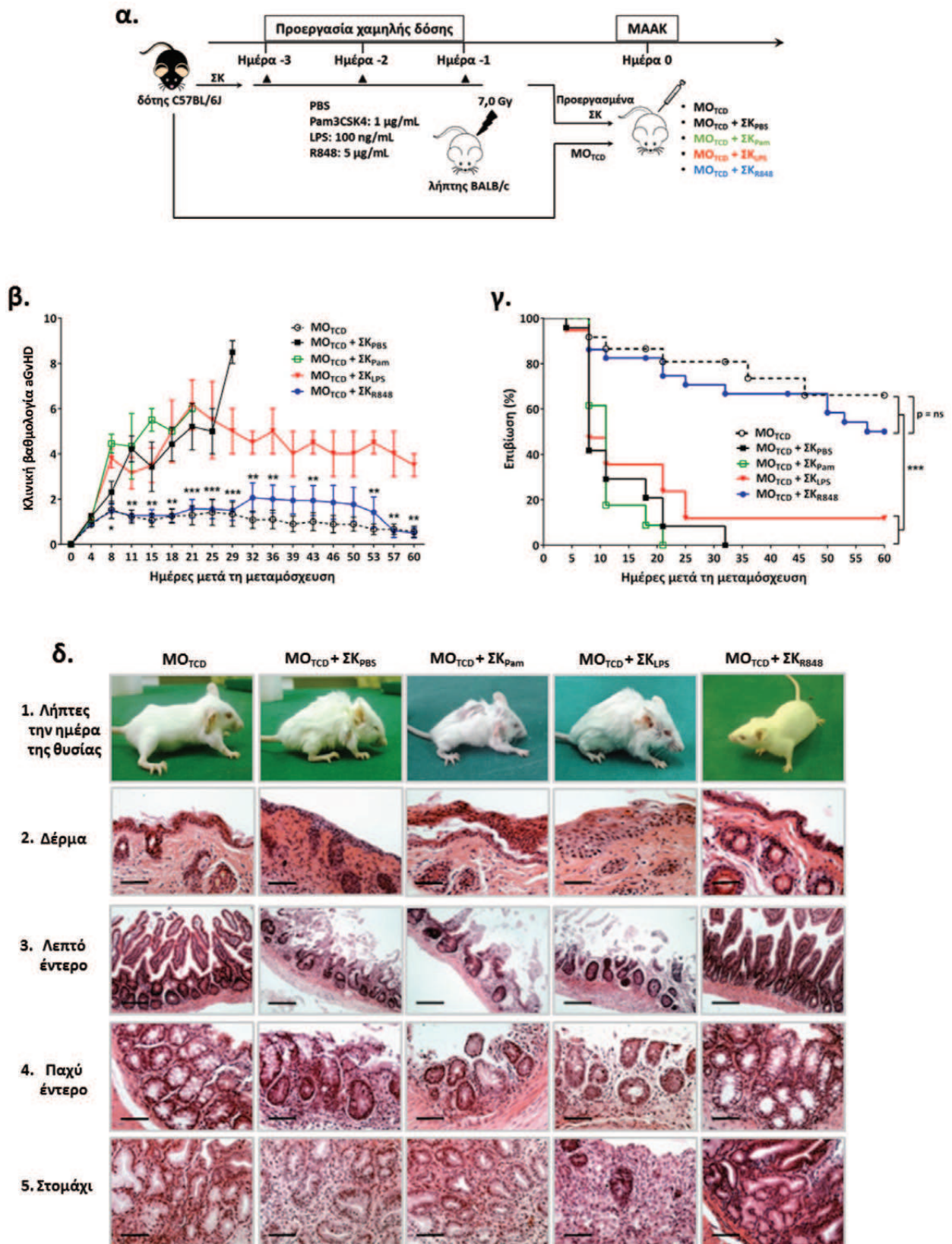
Η ιστολογική εκτίμηση βιοπτικών υλικών (δέρμα, στομάχι, παχύ και λεπτό έντερο), προερχόμενων από τους λήπτες την ημέρα της θυσίας, συσχετίστηκε άμεσα με την

κλινική τους εικόνα (εικ. 3δ.1). Συγκεκριμένα, τομές δέρματος από ΣΚ_{PBS}⁻, ΣΚ_{Pam}⁻ και ΣΚ_{LPS}-λήπτες παρουσίασαν έντονες ιστολογικές αλλοιώσεις συνοδευόμενες από υψηλή συχνότητα αποπτωτικών σωματίων και έντονες ενδοεπιθηλιακές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις (εικ. 3δ.2). Σε όλο το γαστρεντερικό παρατηρήθηκαν έντονες λεμφοκυτταρικές και φλεγμονώδεις διηθήσεις, καθώς και κατάργηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής των λαχνών, κρυπτών και γαστρικών αδένων (εικόνες 3δ.3, 4, 5). Αντίθετα, οι ιστοί οι οποίοι προέρχονταν από ποντίκια που έλαβαν ΣΚ_{R848} παρουσίαζαν σχεδόν φυσιολογική αρχιτεκτονική, παρόμοια με αυτή της ομάδας ΜΟ_{ΤCD}.

Με στόχο να διαπιστωθεί η διατήρηση της TLR-επαγόμενης ανοχής *in vivo*, αντιπροσωπευτικοί λήπτες όλων των ομάδων (10–30 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση) θυσιάστηκαν και τα απομονωμένα ΣΚ διεγέρθηκαν με υψηλή δόση του αντίστοιχου αγωνιστή για 2 ώρες. Τα ΣΚ προερχόμενα από ΜΟ_{ΤCD}⁻, ΜΟ_{ΤCD}+ΣΚ_{PBS}⁻, ΜΟ_{ΤCD}+ΣΚ_{Pam}⁻ και ΜΟ_{ΤCD}+ΣΚ_{LPS}-λήπτες παρουσίασαν έντονη ενεργοποίηση ($p < 0,001$) (εικ. 4α). Αντίθετα, όταν ΣΚ από ΜΟ_{ΤCD}+ΣΚ_{R848} λήπτες επωάστηκαν με υψηλή δόση R848 αγωνιστή, παρουσίασαν ισχυρή υποδραστικότητα ($p = ns$) (εικ. 4α), η οποία,



Εικόνα 2. (α) Πειραματικός σχεδιασμός για την επαγωγή της TLR-2, -4 και -7 ανοχής. Η μέγιστη επαγωγή ανοχής μέσω του (β) TLR2, (γ) TLR4 και (δ) TLR7 επιτεύχθηκε μετά από 72 ώρες (3×24 ώρες) και με την υψηλότερη συγκέντρωση αγωνιστή.



Εικόνα 3. Η *ex vivo* R848-επαγόμενη ανοχή αποτρέπει την εμφάνιση αGvHD σε πειραματικό μοντέλο ασύμβατης μεταμόσχευσης. Μεγέθυνση: ×200 (2, 4, 5), ×400 (3). Μπάρες: 50 μm (×200), 100 μm (×400). ΜΑΑΚ: Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ΣΚ: Σπληνοκύτταρα, MO_{TCD}: Κύτταρα μυελού χωρίς Τ-κύτταρα.

αν και παροδική, διατηρήθηκε τουλάχιστον 30 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση (εικ. 4β).

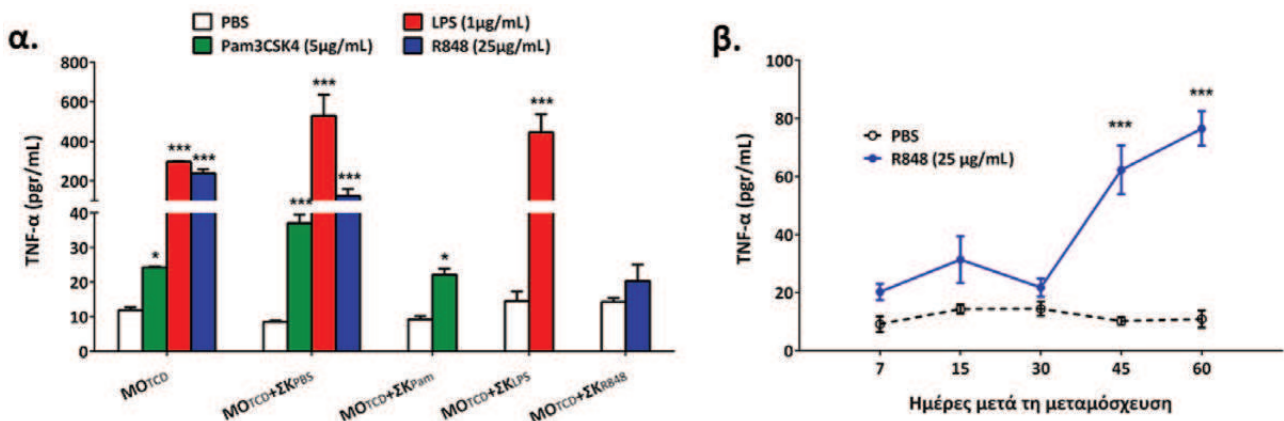
Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των ΣΚ *in vitro*, πριν (ημέρα -3) και μετά (ημέρα 0) την απευαισθητοποίησή τους, έδειξε ότι η TLR-επαγόμενη ανοχή προκαλεί αύξηση του ποσοστού των T-λεμφοκυττάρων ($p < 0,001$) επί του συνόλου των CD45⁺ κυττάρων στην καλλιέργεια. Ωστόσο, την ημέρα 0 τα ΣΚ_{R848} παρουσίαζαν υπεροχή των CD4⁺ T-κυττάρων (εικ. 5α), υψηλότερο ποσοστό T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (εικ. 5β) και υψηλότερη έκφραση του FoxP3 μεταγραφικού παράγοντα (εικ. 5γ) έναντι των υπολοίπων ομάδων. Παρόμοια, οι λήπτες MO_{TCd}+ΣΚ_{R848} παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό T-ρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά την πρώιμη μετα-μεταμοσχευτική περίοδο, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (εικ. 5δ). Τέλος, η επαγωγή TLR-ανοχής μέσω όλων των υπό εξέταση αγωνιστών μετέβαλε τον φαινότυπο των CD3⁺ T-κυττάρων από δραστικό (CD44^{high}/CD62L^{low}) και κεντρικής μνήμης (CD44^{high}/CD62L^{high}) σε παρθένο («μη εκπαιδευμένο») φαινότυπο (CD44^{low}/CD62L^{high}), σε σύγκριση με τα αχειραγώγητα κύτταρα (εικ. 5ε). Ωστόσο, μόνο τα ΣΚ_{R848} παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά δραστικών T-κυττάρων με ταυτόχρονη υπερέκφραση του CD25 υποδοχέα στα CD4⁺ T-κύτταρα, έναντι των ΣΚ_{Pam} και ΣΚ_{LPS} (εικ. 5στ).

In vitro ανάλυση της TLR σηματοδότησης με PCR-arrays (εικ. 6) κατέδειξε ένα διακριτό μοτίβο έκφρασης στα ΣΚ επωασμένα με PBS (αρνητική ομάδα ελέγχου) ή με TLR-2, -4, -7 αγωνιστές. Από τα 83 αξιολογήσιμα γονίδια που αναλύθηκαν, 38 γονίδια παρουσίασαν διαφορετική έκφραση στα TLR απευαισθητοποιημένα ΣΚ έναντι εκείνων που επώαστηκαν με PBS, ενώ 17 από αυτά εκφράστηκαν μοναδικά στα ΣΚ_{R848}. Είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκε συσχετισμός της TLR7-ανοχής με έντονη υποέκφραση γο-

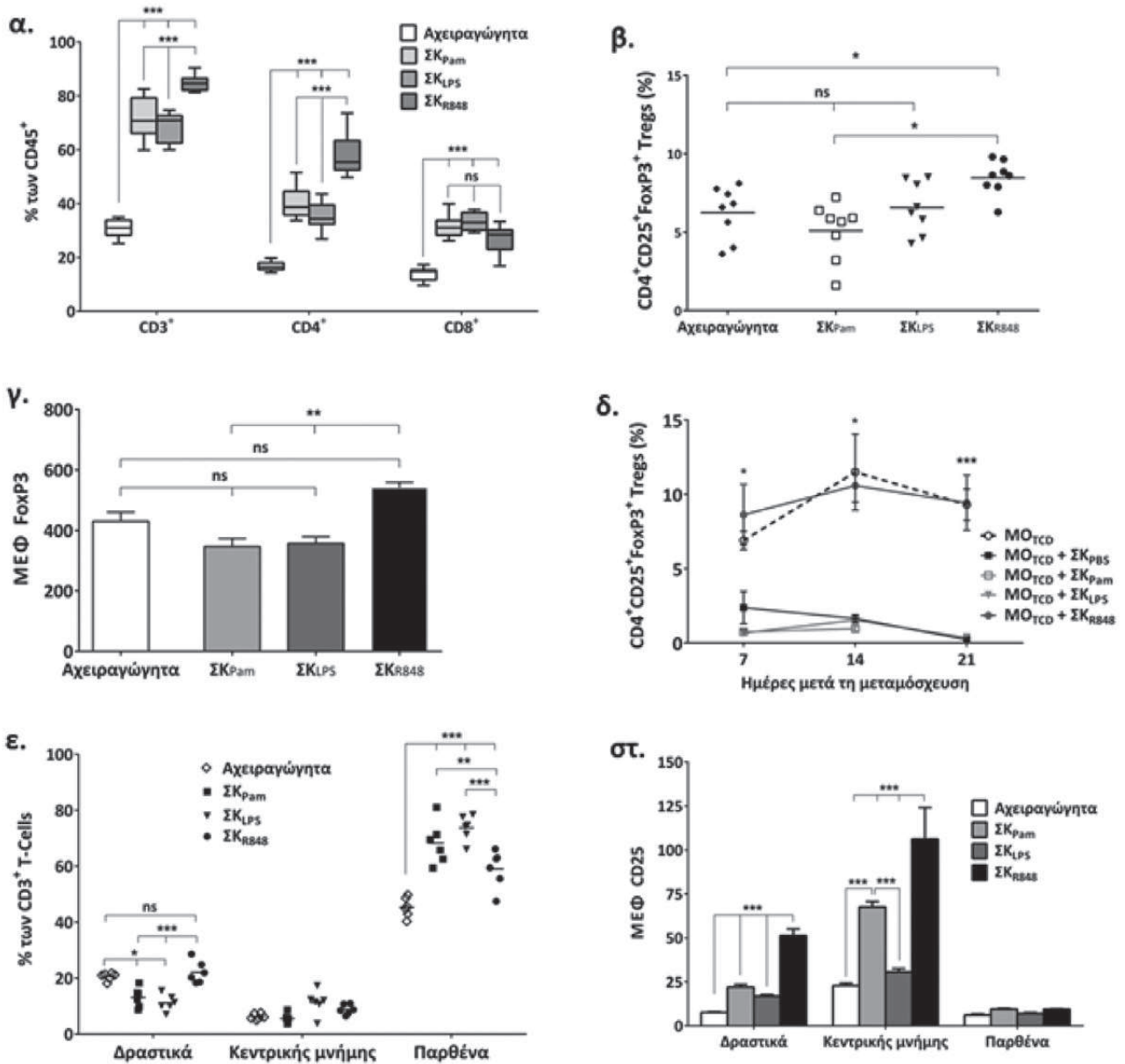
νιδίων τα οποία ελέγχουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (*Il1a*, *Tnf*), γονιδίων της οικογένειας Rel/NF-κB (*Rel*, *Nfkb1* και *Nfkb2*), γονιδίων που κωδικοποιούν διαμεσολαβητές των T-/B-κυττάρων (*Cd80* και *Btk*) και της άνοσης απόκρισης (*Tlr9* και *Ly86*), καθώς και με υπερέκφραση γονιδίων τα οποία ελέγχουν την ανοσορρυθμιστική κυτταροκίνη IFN-γ και αρνητικούς διαμεσολαβητές της NF-κB σηματοδότησης (*Tnfaip3*, *Chuk*, *Nfkbia*) (εικ. 7α).

Αντίστοιχα, *in vivo*, το προφίλ έκφρασης της TLR σηματοδότησης 10 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση στο περιφερικό αίμα ληπτών που έλαβαν ΣΚ_{R848} (εικ. 6) κατέδειξε αρνητική ρύθμιση των μηχανισμών φλεγμονής και της φυσικής άνοσης απόκρισης, όπως αποδείχθηκε από την έντονη υποέκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε φλεγμονή (*Tnf*, *Il2*, *Il12a*, *Ifnb1*, *Nfkb2*), οι οποίοι κωδικοποιούν συνδιεγερτικά μόρια (*Cd80*) και διαμεσολαβητές της φυσικής ανοσίας (*Cd14*, *Tlr4*, *Tlr7*). Αντίθετα, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του αρνητικού διαμεσολαβητή *Nfkbia*, καθώς και 11 φορές μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου *Ppara* (εικ. 7β).

Με στόχο τον καθορισμό του κύριου λευκοκυτταρικού υποπληθυσμού που διαμεσολαβεί την TLR7 ανοχή, λευκά αιμοσφαίρια ποντικού επώαστηκαν με χαμηλές δόσεις R848 ή PBS, διεγέρθηκαν με υψηλή δόση R848 και μετρήθηκε η έκφραση του πρώιμου δείκτη ενεργοποίησης CD69. Η επεξεργασία με χαμηλή δόση R848 φάνηκε να ενεργοποιεί τα B- (CD19⁺) και τα δενδριτικά (CD11c⁺) κύτταρα, ενώ δεν επηρέασε την κατάσταση ηρεμίας των T-λεμφοκυττάρων (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), NK (NK1.1⁺) κυττάρων και μονοκυττάρων (CD14⁺) (εικ. 8α). Ωστόσο, τόσο οι ενεργοποιημένοι όσο και οι μη ενεργοποιημένοι κυτταρικοί υποπληθυσμοί, μετά την επώαση με τον R848, παρουσίασαν ισχυρή υποδραστικότητα έπειτα από έκθεσή τους σε υψηλή δόση R848. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι παρ' όλο που η TLR7 ανοχή



Εικόνα 4. (α) Απόκριση των σπληνοκυττάρων (ΣΚ) μετά από διέγερση υψηλής δόσης με τον αντίστοιχο TLR αγωνιστή, προερχόμενα από όλες τις πειραματικές ομάδες μετά τη μεταμόσχευση. (β) *In vivo* ανοχή της TLR7 ανοχής. MO_{TCd}: Κύτταρα μυελού χωρίς T-κύτταρα.



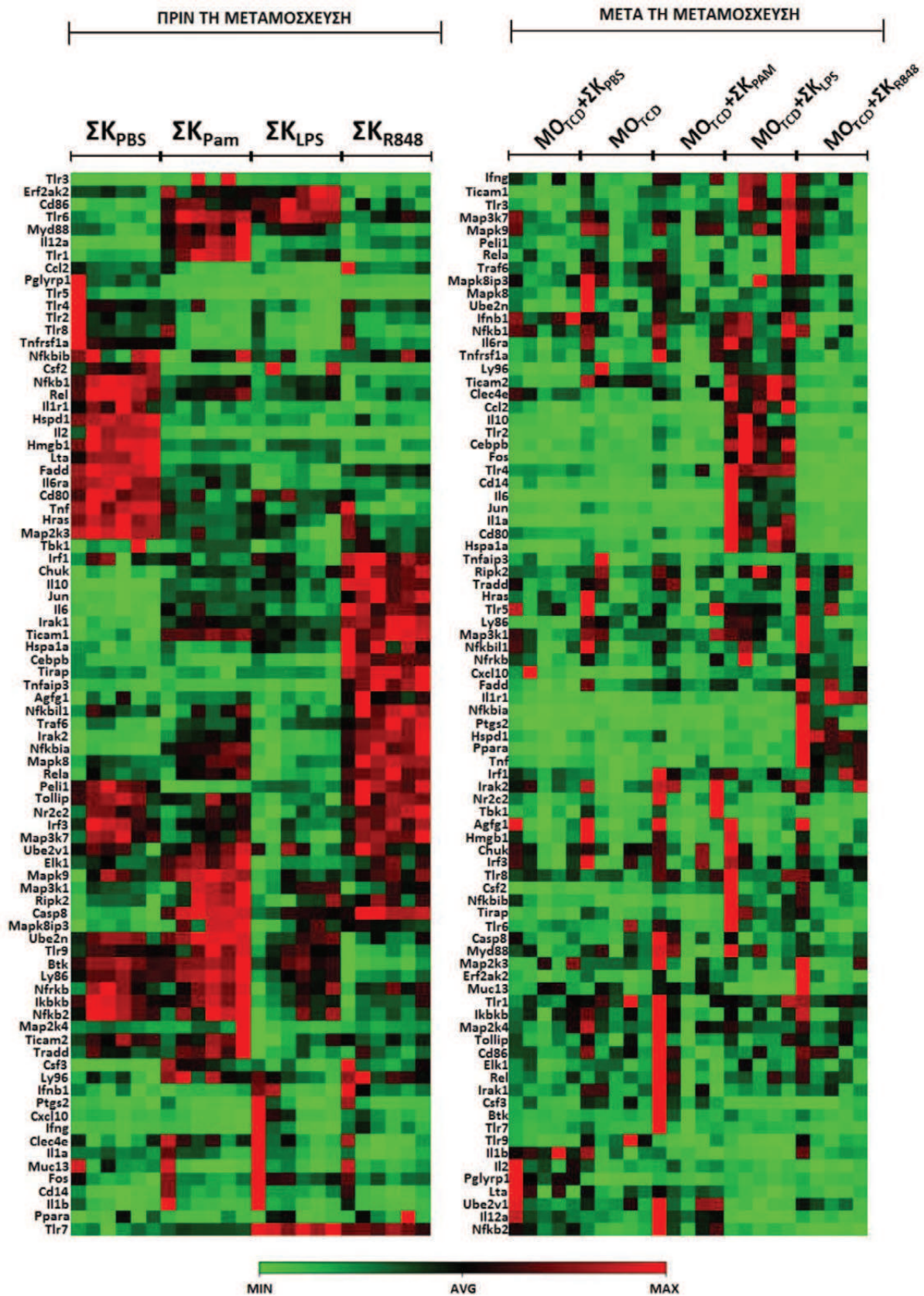
Εικόνα 5. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση πριν και μετά τη μεταμόσχευση. ΣΚ: Σπληνοκύτταρα, MO_{TCO}: Κύτταρα μυελού χωρίς T-κύτταρα, MEΦ: Μέση ένταση φθορισμού, ns: Χωρίς στατιστική σημαντικότητα.

επάγεται από μια ποικιλία κυτταρικών υποπληθυσμών, είναι σημαντικό ότι τα T-λεμφοκύτταρα, οι βασικότεροι επαγωγείς της αGvHD, δεν αποκτούν ενεργοποιημένο φαινότυπο μετά από διέγερσή τους με χαμηλή δόση R848 και παραμένουν αδιέγερτα, ακόμη και μετά από έκθεσή τους σε υψηλές δόσεις του αγωνιστή.

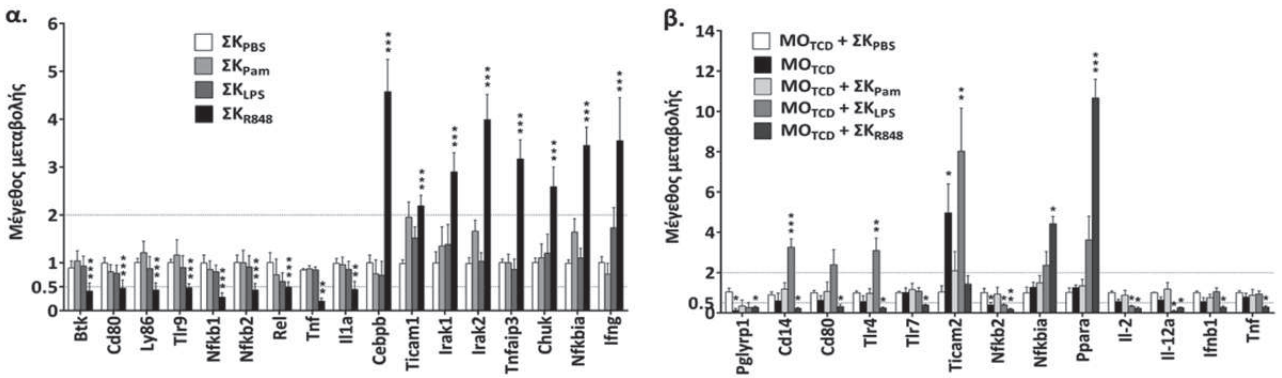
Με σκοπό να επιβεβαιωθεί η επαγωγή TLR7 ανοχής μέσω των T-κυττάρων, κεκαθαρμένα TLR7-ανοχικά CD3⁺ κύτταρα (CD3⁺_{R848}) από C57BL/6J ποντίκια μεταμοσχεύτηκαν σε BALB/c λήπτες και μελετήθηκε η ικανότητα αποτροπής της νόσου. Όπως και με τα ολικά ΣΚ, οι MO_{TCO}+CD3⁺_{R848} λήπτες δεν ανέπτυξαν αGvHD

και παρουσίασαν εντυπωσιακά καλύτερη κλινική εικόνα και ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με τους MO_{TCO}+CD3⁺_{PBS} λήπτες, οι οποίοι απεβίωσαν εντός 32 ημερών μετά τη μεταμόσχευση ($p < 0,001$) (εικ. 8β και γ).

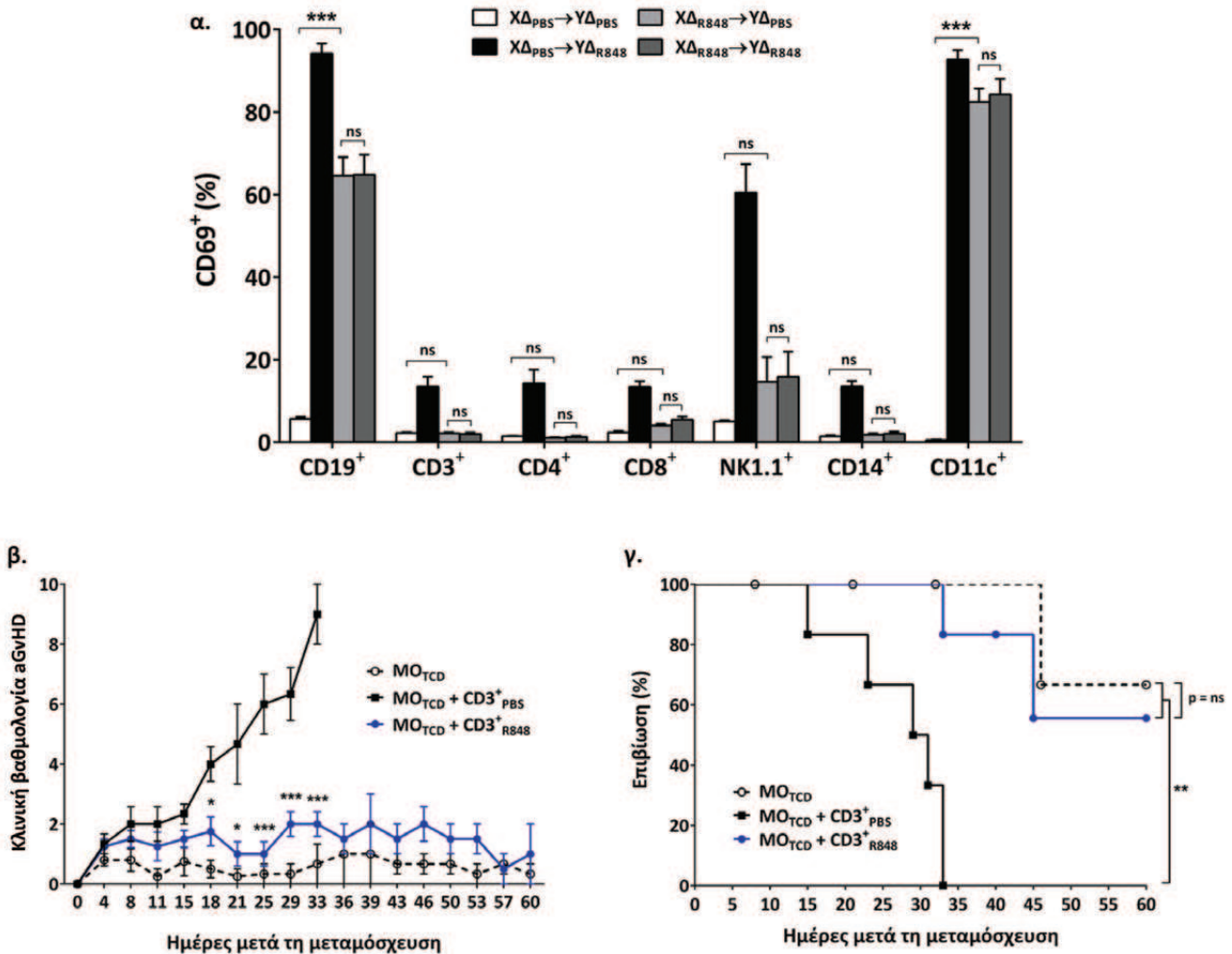
Ανάλυση της TLR σηματοδότησης στα κεκαθαρμένα CD3⁺_{R848} T-λεμφοκύτταρα έδειξε ότι από τα 69 γονίδια με διαφοροποιημένη έκφραση έναντι της ομάδας ελέγχου, τα 62 υποεκφράστηκαν, ενώ μόνο 7 υπερεκφράστηκαν. Στα έντονα υποεκφρασμένα γονίδια ($p \leq 0,001$) συγκαταλέγονται γονίδια εμπλεκόμενα στη NF-κB σηματοδότηση (*Ikkb*, *IL1a*, *Lta*, *Map3k1*, *Nfkb1*, *Rel*, *Rela*, *Tnf*, *Tnfaip3*, *Tnfrsf1a*), στην JNK/



Εικόνα 6. Προφίλ έκφρασης 84 γονιδίων που εμπλέκονται στην TLR σηματοδότηση. ΣΚ: Σπληνοκύτταρα, MO_{TCD}: Κύτταρα μυελού χωρίς T-κύτταρα, MIN: Ελάχιστη έκφραση, AVG: Μέση έκφραση, MAX: Μέγιστη έκφραση.



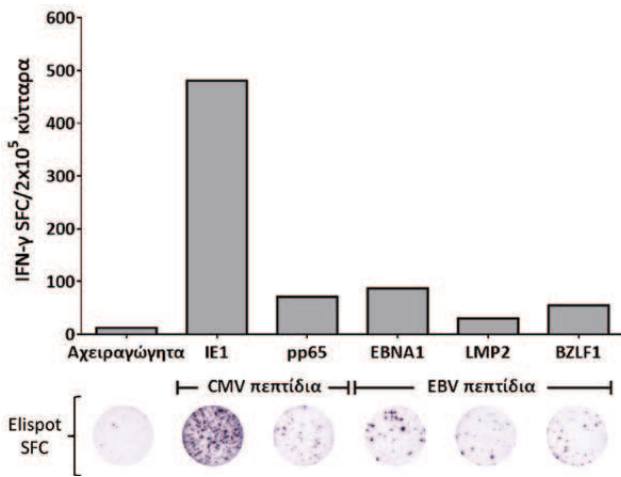
Εικόνα 7. Η TLR7-επαγόμενη ανοχή καταστέλλει κρίσιμους διαμεσολαβητές φλεγμονής, τόσο (α) στα σπληνοκύτταρα (ΣΚ) πριν από τη μεταμόσχευση, όσο και (β) στο περιφερικό αίμα των ληπτών κατά την πρώιμη φάση ανάπτυξης της aGvHD. MO_{TCD}: Κύτταρα μυελού χωρίς T-κύτταρα.



Εικόνα 8. (α) Η TLR7 ανοχή διαμεσολαβείται μέσω των T-λεμφοκυττάρων και (β και γ) τα απευαισθητοποιημένα CD3⁺T-λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη αλλοδραστικότητα *in vivo*. ΧΔ: Χαμηλή δόση απευαισθητοποίησης, ΥΔ: Διέγερση υψηλής δόσης, ΣΚ: Σπληνοκύτταρα, MO_{TCD}: Κύτταρα μυελού χωρίς T-κύτταρα, ns: Χωρίς στατιστική σημαντικότητα.

p38 σηματοδότηση (*Fos, Jun, Map2k3, Map3k1, Mapk8ip3*), στη NF-κB/IL6 σηματοδότηση (*Cebpb, IL6ra, Ptg2s*), στην IRF σηματοδότηση (*CXCL10, Irf1*), και στη ρύθμιση της

επίκτητης (*CD86, Ripk2, Traf6*) και της έμφυτης ανοσίας (*Peli1, Pglyrp1, Ripk2, Tollip*). Στα υπερεκφρασμένα γονίδια ($p \leq 0,05$) περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν για



Εικόνα 9. Τα απευαισθητοποιημένα CD3⁺ T-λεμφοκύτταρα διατηρούν πλήρως την αντι-ικική τους δράση. SFC=Spot forming cells.

μόρια διαμεσολάβησης (*Eif2ak2*), ρυθμιστές της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας (*Btk*, *Ly86*, *Ticam2*, *Tlr7*) και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες/χημειοκίνες (*Ccl2*, *Il12a*). Παρ' όλο που ορισμένα από τα εν λόγω γονίδια μπορούν να ενισχύσουν τη φλεγμονή στο κύτταρο (υπερέκφραση του *Eif2ak2*) ή να αποδυναμώσουν την ανοσοαπόκριση (υποέκφραση των *Pel11* και *Pglyrp1*), το συνολικό προφίλ έκφρασης των TLR7-ανοχικών CD3⁺-κυττάρων υποδηλώνει υπερίσχυση ενός γενικά αντιφλεγμονώδους φαινότυπου.

Μετά από βιοπληροφορική ανάλυση οντολογίας γονιδίων (gene ontology, GO) προέκυψαν 442 θετικοί οντολογικοί όροι γονιδίων, από τους οποίους οι 410 προέρχονταν από τα υποεκφρασμένα γονίδια (επίπεδο σημαντικότητας p έως 10^{-39}) και οι 32 από τα υπερεκφρασμένα γονίδια (επίπεδο σημαντικότητας p έως 10^{-7}). Ανάμεσα στις επικρατέστερες

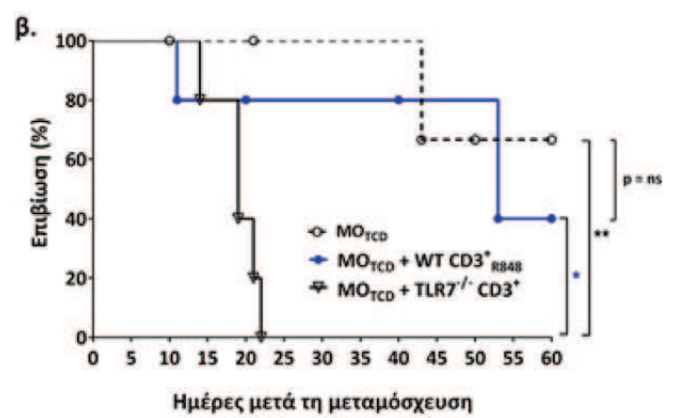
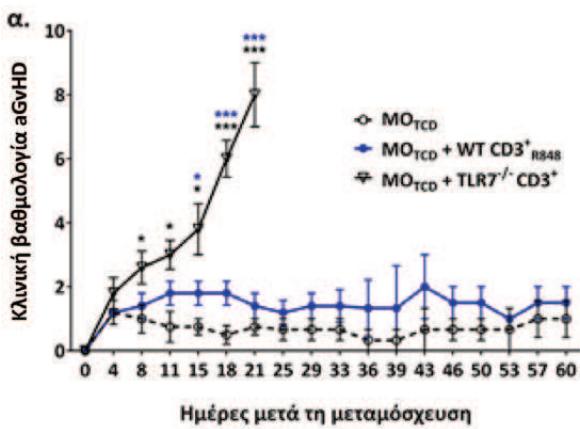
βιολογικές λειτουργίες οι οποίες αφορούσαν στους οντολογικούς όρους που αναδείχθηκαν από την ανάλυση ήταν η παραγωγή κυτταροκινών/φλεγμονή, η έμφυτη ανοσία, η άνοση απόκριση, ο μεταβολισμός, η απόκριση σε ερεθίσματα και η κυτταρική ενεργοποίηση.

Επί πλέον, ανθρώπινα κεκαθαρμένα CD3⁺_{RB48} T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από έναν CMV και έναν EBV οροθετικό δότη και εκπύχθηκαν έπειτα από διέγερσή τους με CMV και EBV πεπτιδία, παρουσία ακτινοβολημένων αυτόλογων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, διατήρησαν την ικανότητά τους να εκκρίνουν IFN-γ μετά από επανέκθεσή τους στα συγκεκριμένα πεπτιδία. Καταδείχθηκε ως εκ τούτου ότι η TLR7 ανοχή δεν εξασθενεί τις αντι-ικικές αποκρίσεις των T-κυττάρων, καθώς διατηρούν την ανοσολογική τους μνήμη και παραμένουν λειτουργικά μετά από επαφή με ιικά αντιγόνα (εικ. 9).

Τέλος, για να διερευνηθεί εάν η μειωμένη αλλοδραστικότητα των TLR7-ανοχικών κυττάρων σχετίζεται ειδικά με τον TLR7 υποδοχέα και δεν αντανακλά απλά υπολειτουργία του, κεκαθαρμένα CD3⁺_{RB48} T-κύτταρα από C57BL/6J ποντίκια και κεκαθαρμένα CD3⁺ T-κύτταρα από B6 TLR7^{-/-} ποντίκια μεταμοσχεύτηκαν σε ασύμβατους λήπτες (BALB/c). Παρατηρήθηκε μια εντυπωσιακά καλύτερη μετα-μεταμοσχευτική πορεία των ληπτών που έλαβαν τα ανοχικά κύτταρα σε αντίθεση με τους λήπτες των TLR7^{-/-} T-κυττάρων, οι οποίοι παρουσίασαν σοβαρότατα συμπτώματα της νόσου και απεβίωσαν σε μικρό χρονικό διάστημα (εικ. 10α και β).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι TLRs αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με εξωγενή προϊόντα παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και ενδογενή



Εικόνα 10. Η μειωμένη *in vivo* αλλοδραστικότητα οφείλεται στο φαινόμενο της TLR7-επαγόμενης ανοχής και δεν μπορεί να εξομοιωθεί από την εξάλειψη του TLR7 υποδοχέα, όπως προκύπτει από (α) την κλινική βαθμολογία και (β) το ποσοστό επιβίωσης των ληπτών που έλαβαν TLR7^{-/-} T-κύτταρα. ΣΚ: Σπληνοκύτταρα, MO_{TCD}: Κύτταρα μυελού χωρίς T-κύτταρα, ns: Χωρίς στατιστική σημαντικότητα, WT: Wild type, ns: Χωρίς στατιστική σημαντικότητα.

αντιγόνα προερχόμενα από ιστική βλάβη. Τα μόρια αυτά ενεργοποιούν την TLR σηματοδότηση, η οποία ρυθμίζει ανοσιακές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια φλεγμονής, όπως σε λοιμώξεις, σε αυτοάνοσα νοσήματα ή στην GvHD. Ενώ οι TLRs ενεργοποιούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η TLR ανοχή θεωρήθηκε ως ένας προστατευτικός ρυθμιστικός μηχανισμός ικανός να ελέγξει την ισχυρή TLR-επαγόμενη φλεγμονή. Βιβλιογραφικές αναφορές κατέδειξαν την επαγωγή TLR ανοχής στους TLR2,¹³ TLR4,¹¹ TLR5,¹⁵ TLR7^{12,16} και TLR9¹⁷ σε διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς και, *in vivo*, την πρόληψη αυτοάνοσων νοσημάτων μέσω επαγωγής TLR2 και TLR7 ανοχής.¹² Επίσης, εγχύσεις του αγωνιστή του TLR5, φλαγγελίνης, σε ποντίκια απέτρεψαν την aGvHD, μέσω των αλληλεπιδράσεων της TLR5-φλαγγελίνης, σε αιμοποιητικά και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα του δότη.¹⁴

Στην παρούσα μελέτη καταδεικνύεται η εντυπωσιακή επίδραση μιας κλινικά εφαρμόσιμης προσέγγισης για την πρόληψη της aGvHD, σε πειραματικό μοντέλο αλλογενούς μεταμόσχευσης, μέσω της TLR7-επαγόμενης ανοχής σε ολικά ΣΚ ή σε κεκαθαρμένα T-λεμφοκύτταρα.

Παρόλο που TLR ανοχή επιτεύχθηκε σε όλους τους TLRs οι οποίοι δοκιμάστηκαν, αποτροπή της νόσου κατορθώθηκε μόνο μέσω της TLR7 ανοχής. Το σχετικό αποτέλεσμα συνδέθηκε άμεσα με μια διακριτή κυτταρική και μοριακή υπογραφή της TLR7 ανοχής, τόσο στα ΣΚ του μοσχεύματος πριν από την έγχυση όσο και στο περιφερικό αίμα των ληπτών μετά την έγχυση. Επί πλέον, η *ex vivo* επαγόμενη TLR7 ανοχή αποδείχθηκε ένα παροδικό φαινόμενο *in vivo*, καθώς ΣΚ των MO_{TC}D+ΣK_{R848} ληπτών αποκρίθηκαν στη διέγερση υψηλής δόσης R848, 45 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση. Προκύπτει λοιπόν ότι, ενώ η TLR7 ανοχή είναι παρούσα κατά την κρίσιμη περίοδο ανάπτυξης της aGvHD, αποτρέποντας έτσι την εμφάνισή της, εξαλείφεται αργότερα.

Σε κυτταρικό επίπεδο, τα ΣK_{R848} εμφάνισαν έναν ισχυρότερο ανοσορρυθμιστικό φαινότυπο με υψηλότερα ποσοστά κυκλοφορούντων CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-κυττάρων (Tregs) μόνο στους λήπτες που έλαβαν ΣK_{R848}. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα Tregs κύτταρα, ένας λεμφοκυτταρικός πληθυσμός προικισμένος με ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα καταστολής της ανοσιακής ενεργοποίησης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη αλλοαποκρίσεων κατά τη διάρκεια της aGvHD,¹⁸ ενώ η απομάκρυνσή τους από το μόσχευμα πριν από την έγχυση επιταχύνει δραματικά την εμφάνιση της GvHD.¹⁹ Προηγούμενες αναφορές συνδέουν τη μείωση της GvHD με επαναλαμβανόμενες *in vivo* εγχύσεις TLR5 αγωνιστή¹⁴ ή την καταστολή της αλλεργικής φλεγμονής μετά από χορήγηση TLR-2, -5 και -7 αγωνιστών,²⁰⁻²² με συστηματική ή τοπική αύξηση των Tregs. Επί πλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα Tregs εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα

TLR7 πρωτεΐνης και ότι η ενεργοποίηση του TLR7 αυξάνει την ικανότητα καταστολής τους.²³ Στην παρούσα μελέτη, η απευαισθητοποίηση των ΣΚ του δότη με R848 είχε ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του δείγματος σε T-κύτταρα και κυρίως σε βοηθητικά CD4⁺ T-κύτταρα, καθώς και την επαγωγή Tregs κυττάρων, σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες. Η επώαση με τον R848 επί πλέον ενίσχυσε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, η έκφραση του οποίου φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία καταστολής των CD4⁺CD25⁻ T-κυττάρων.²⁴ Η επαγωγή λειτουργικών Treg κυττάρων μέσω της επεξεργασίας των κυττάρων με R848 φάνηκε να αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα για την αποτελεσματική πρόληψη της GvHD στην εν λόγω μελέτη.

Σε μοριακό επίπεδο, παρόλο που εντοπίστηκαν κοινά ρυθμιζόμενα γονίδια ανάμεσα στις τρεις ομάδες των TLR-ανοχικών ΣΚ, κατέστη εύκολα αντιληπτή η διακριτή μοριακή υπογραφή των ΣK_{R848} ή των κεκαθαρμένων CD3⁺_{R848} T-κυττάρων σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες. Συγκεκριμένα, τα *ex vivo* TLR7-απυαισθητοποιημένα κύτταρα παρουσίασαν υποέκφραση πληθώρας γονιδίων που επηρεάζουν θετικά φλεγμονώδη σήματα και αποκρίσεις της έμφυτης ανοσίας ή υπερέκφραση γονιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν αρνητικά με τον μηχανισμό της φλεγμονής. Επί πλέον, ένα γενικευμένο αντιφλεγμονώδες γονιδιακό προφίλ έκφρασης εντοπίστηκε στο αίμα των ληπτών που έλαβαν ΣK_{R848} σε σχέση με αυτούς οι οποίοι έλαβαν ΣK_{Pam} ή ΣK_{LPS} υπό μορφή υποέκφρασης κρίσιμων διαμεσολαβητών φλεγμονής και κυτταρικής ενεργοποίησης (*Nfkb*, *Tnf*, *Il2*, *Cd14*) και υπερέκφρασης αρνητικών ρυθμιστών της φλεγμονής (*Nfkbia* και *Ppara*).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η υπερέκφραση, κατά 11 φορές, του γονιδίου *Ppara* έπειτα από επώαση των κυττάρων με R848, καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι η υπερέκφραση ή η ενεργοποίηση των PPAR-α και PPAR-γ ως συνέπεια της σύνδεσής τους με αντίστοιχους προσδέτες καταστέλλει σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη φλεγμονή ή την άνοση απόκριση,^{25,26} ενώ η έγχυση αγωνιστή του PPAR-γ σε ποντίκια απέτρεψε την εμφάνιση θανατηφόρου aGvHD.²⁷ Η ανοσορρυθμιστική αυτή ικανότητα των υποδοχέων PPAR φαίνεται να διαμεσολαβείται, τουλάχιστον μερικά, από την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-kB μεταγραφικού παράγοντα²⁶ και από την επαγωγή λειτουργικών Tregs,²⁸ λειτουργίες που παρατηρήθηκαν επίσης και δυνητικά συνετέλεσαν στην αποτροπή εμφάνισης της νόσου στα *in vivo* πειράματά μας.

Η ομαδοποίηση των εμπλουτισμένων οντολογικών όρων σε λειτουργικές κατηγορίες στα TLR7-απυαισθητοποιημένα κύτταρα έδειξε ότι, όσον αφορά στα υποεκφρασμένα γονίδια, οι πλέον αντιπροσωπευτικές κατηγορίες ύψιστης

στατιστικής σημαντικότητας ($p=10^{-39}$) περιελάμβαναν παραγωγή κυτταροκινών/φλεγμονή, άνοση απόκριση, απόκριση σε ερεθίσματα, μεταβολισμό και κυτταρική ενεργοποίηση. Αντίθετα, παρόμοια κατηγοριοποίηση οντολογικών όρων από τα υπερεκφρασμένα γονίδια κατέδειξε αισθητά λιγότερες λειτουργικές κατηγορίες και με μικρότερη στατιστική σημαντικότητα ($p=10^{-7}$).

Η επαγόμενη TLR7 ανοχή σε T-κύτταρα ποντικού πυροδότησε πολύπλοκες αλλαγές σε σηματοδοτικά μονοπάτια γνωστά για τον ρόλο τους σε μηχανισμούς φλεγμονής και προαγωγής της aGvHD. Οι σχετικές αλλαγές μετατόπισαν την ισορροπία προς όφελος της αρνητικής ρύθμισης της φλεγμονής, χωρίς ωστόσο να αποσιωπήσουν κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες. Έτσι, η ανοσολογική μνήμη των απευαισθητοποιημένων με R848 T-κυττάρων φάνηκε να διατηρείται, επιτρέποντας την παραγωγή ειδικών-αντι-ικών T-κυττάρων μετά την επαφή τους με το αντίστοιχο ιικό αντιγόνο, διατηρώντας *in vivo* τη δράση του μοσχεύματος κατά της λοίμωξης (graft versus infection, GvI).

Μελέτες ανοχής σε διάφορους TLRs υποστηρίζουν την άποψη ότι η μειωμένη απόκριση των «απυαισθητοποιημένων» κυττάρων δεν προκύπτει από μειωμένη έκφραση των κυτταρικών υποδοχέων και συνεπώς από τη μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης με τον συνδέτη τους, γεγονός που

επιβεβαιώνεται από το ότι η ρύθμιση της επιφανειακής έκφρασης του TLR4 δεν σχετίστηκε με επαγωγή ανοχής, ενώ η υπερέκφρασή του απέτυχε να αποτρέψει ανοχή σε ενδοτοξίνη.²⁹ Παρόμοια στη μελέτη μας, η R848-επαγόμενη ανοχή δεν σχετίστηκε με υποέκφραση του TLR7, καθώς στην πραγματικότητα ο υποδοχέας υπερεκφράστηκε μετά την επεξεργασία των ΣΚ ή των κεκαθαρμένων T-κυττάρων με τον R848. Επί πλέον, ο επαγόμενος φαινότυπος ήταν ειδικός για τον TLR7, καθώς τα TLR7^{-/-} T-κύτταρα εμφάνιζαν ένα τελείως διακριτό γονιδιακό προφίλ έκφρασης και δεν ήταν ικανά να αποτρέψουν την aGvHD *in vivo*.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχθηκε ότι τα TLR7 απευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα ποντικού ξεχωρίζουν φαινοτυπικά και λειτουργικά σε σύγκριση με τα χειραγώγητα κύτταρα και ότι η ανοχή των T-κυττάρων μέσω του TLR7 υποδοχέα δεν ισοδυναμεί με την ολική έλλειψη ή την υπολειτουργία του. Η *ex vivo* επαγωγή TLR7 ανοχής προκαλεί έναν παροδικό και αντιστρεπτό ανοσολογικό επαναπρογραμματισμό των λεμφοκυττάρων του δότη, ικανό να παρέχει ισχυρή προστασία κατά την πρώιμη φάση της aGvHD. Για τους λόγους αυτούς, προτείνεται η TLR7 ανοχή ως μια πολλά υποσχόμενη, μη παρεμβατική και κλινικά εφαρμόσιμη προσέγγιση για την πρόληψη της aGvHD.

ABSTRACT

***Ex vivo* tolerance induction to Toll-like receptor 7 in donor lymphocytes as a prophylactic tool in experimental acute graft-versus-host disease**

N. ZOGAS,^{1,2} G. KARPONI,¹ F. IORDANIDIS,³ V. PARASKEVAS,^{1,2} A. PAPADOPOULOU,¹ Z. SCOURAS,² A. ANAGNOSTOPOULOS,¹ E. YANNAKI¹

¹Gene and Cell Therapy Center, Department of Hematology-Unit of Bone Marrow Transplantation, "G. Papanicolaou" General Hospital, Thessaloniki, ²Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, ³Department of Pathology, "G. Papanicolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2016, 33(6):782–795

OBJECTIVES Acute graft-versus-host disease (aGvHD) continues to be a major cause of treatment-related morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Conventional strategies to prevent or treat GvHD are often ineffective and result in generalized immunosuppression and increased susceptibility to infection, rendering the development of alternative anti-GvHD approaches imperative. Toll-like receptors (TLRs) are a family of highly conserved pattern-recognition receptors (PRRs) which are key players in donor T-cell activation during GvHD. Recently, regulatory mechanisms of TLR tolerance induced by repeated low doses of specific agonists have been recognized in the context of autoimmunity. This study explored whether *ex vivo* induced TLR-2, -4, and -7 tolerance to donor cells could prevent allo-reactivity in a mismatched transplantation murine model. **METHOD** Tolerance was induced to TLR-2, TLR-4 and TLR-7 in mouse splenocytes by stimulation with low doses of corresponding ligands, and determined by detecting reduced TNF- α production on specific challenge. TLR tolerance-induced changes in splenocytes and purified T-cells were assessed at the cellular and molecular level by immunophenotypic and gene expression analysis, respectively. aGvHD incidence was evaluated by the clinical score and survival, and by the histopathol-

ogy of target tissues. **RESULTS** Tolerance was induced to all the TLRs tested (TLR-2, -4 and -7) in mouse splenocytes. Only the *ex vivo*, R848-induced TLR-7 tolerance in splenocytes or purified CD3⁺ T-cells was able to prevent aGvHD *in vivo*, and it persisted for at least 30 days post-BMT. This anti-GvHD effect was associated with distinct cellular and molecular signatures compared with unmanipulated counterparts or differently TLR tolerized cells, both *ex vivo* and *in vivo*, characterized by a shift of T-lymphocytes towards a Treg phenotype, repression of inflammatory signaling pathways and innate immune responses, and upregulation of negative mediators of inflammation. Importantly, despite downregulation of innate immunity pathways, TLR-7 tolerized T-cells maintained the immunological memory and produced virus-specific T-cells on antigen encounter. The anti-GvHD tolerance effect was specific to TLR-7, as TLR-7^{-/-} T-cells failed to prevent aGvHD lethality *in vivo*. **CONCLUSIONS** An effective, clinically applicable approach is proposed for aGvHD prevention through a transient and reversible immune reprogramming induced by *ex vivo* induced TLR-7 tolerance in donor lymphocytes.

Key words: aGvHD prevention, Innate immunity, TLR signaling, TLR7 tolerance, Toll-like receptors

Βιβλιογραφία

- AGASIA M, ARORA M, FLOWERS ME, CHAO NJ, MCCARTHY PL, CUTLER CS ET AL. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012, 119:296–307
- MATTE CC, LIU J, CORMIER J, ANDERSON BE, ATHANASIADIS I, JAIN D ET AL. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004, 10:987–992
- FISCHER M, EHLERS M. Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2008, 1143:21–34
- COOKE KR, GERBITZ A, CRAWFORD JM, TESHIMA T, HILL GR, TESOLIN A ET AL. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001, 107:1581–1589
- CALCATERRA C, SFONDRINI L, ROSSINI A, SOMMARIVA M, RUMIO C, MÉNARD S ET AL. Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 2008, 181:6132–6139
- ELMAAGACLI H, KOLDEHOFF M, BEELEN DW. Improved outcome of hematopoietic SCT in patients with homozygous gene variant of Toll-like receptor 9. *Bone Marrow Transplant* 2009, 44:295–302
- IMADO T, IWASAKI T, KITANO S, SATAKE A, KUROIWA T, TSUNEMI S ET AL. The protective role of host Toll-like receptor-4 in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2010, 90:1063–1070
- BRENNAN TV, LIN L, HUANG X, CARDONA DM, LI Z, DREDGE K ET AL. Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2012, 120:2899–2908
- ZHAO Y, LIU Q, YANG L, HE D, WANG L, TIAN J ET AL. TLR4 inactivation protects from graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Mol Immunol* 2013, 10:165–175
- XIAO HW, LUO Y, LAI XY, SHI JM, TAN YM, HE JS ET AL. Donor TLR9 gene tagSNPs influence susceptibility to aGVHD and CMV reactivation in the allo-HSCT setting without polymorphisms in the TLR4 and NOD2 genes. *Bone Marrow Transplant* 2014, 49:241–247
- SATO S, TAKEUCHI O, FUJITA T, TOMIZAWA H, TAKEDA K, AKIRA S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int Immunol* 2002, 14:783–791
- HAYASHI T, GRAY CS, CHAN M, TAWATAO RI, RONACHER L, MCGARGILL MA ET AL. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:2764–2769
- KIM DH, LEE JC, KIM S, OH SH, LEE MK, KIM KW ET AL. Inhibition of autoimmune diabetes by TLR2 tolerance. *J Immunol* 2011, 187:5211–5220
- HOSSAIN MS, JAYE DL, POLLACK BP, FARRIS AB, TSELANYANE ML, DAVID E ET AL. Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity. *J Immunol* 2011, 187:5130–5140
- MIZEL SB, SNIPES JA. Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 2002, 277:22414–22420
- BOURQUIN C, HOTZ C, NOERENBERG D, VOELKL A, HEIDEGGER S, ROETZER LC ET AL. Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer Res* 2011, 71:5123–5133
- DALPKE AH, LEHNER MD, HARTUNG T, HEEG K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology* 2005, 116:203–212
- EDINGER M, HOFFMANN P, ERMANN J, DRAGO K, FATHMAN CG, STROBER S ET AL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003, 9:1144–1150
- COHEN JL, TRENADO A, VASEY D, KLATZMANN D, SALOMON BL. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: New therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002, 196:401–406
- NAWIJN MC, MOTTA AC, GRAS R, SHIRINBAK S, MAAZI H, VAN OOSTERHOUT AJ. TLR-2 activation induces regulatory T cells and long-term suppression of asthma manifestations in mice. *PLoS One* 2013, 8:e55307
- CRELLIN NK, GARCIA RV, HADISFAR O, ALLAN SE, STEINERTS, LEVINGS

- MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005, 175:8051–8059
22. VAN PL, BARDEL E, GREGOIRE S, VANOIRBEEK J, SCHNEIDER E, DY M ET AL. Treatment with the TLR7 agonist R848 induces regulatory T-cell-mediated suppression of established asthma symptoms. *Eur J Immunol* 2011, 41:1992–1999
23. FORWARD NA, FURLONG SJ, YANG Y, LIN TJ, HOSKIN DW. Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Leukoc Biol* 2010, 87:117–125
24. FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, 4:330–336
25. RICOTE M, LI AC, WILLSON TM, KELLY CJ, GLASS CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998, 391:79–82
26. HUANG W, RHA GB, HAN MJ, EUM SY, ANDRÁS IE, ZHONG Y ET AL. PPARalpha and PPARgamma effectively protect against HIV-induced inflammatory responses in brain endothelial cells. *J Neurochem* 2008, 107:497–509
27. SONG EK, YIM JM, YIM JY, SONG MY, RHO HW, YIM SK ET AL. Rosiglitazone prevents graft-versus-host disease (GVHD). *Transpl Immunol* 2012, 27:128–137
28. LEI J, HASEGAWA H, MATSUMOTO T, YASUKAWA M. Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ agonists together with TGF- β convert human CD4+CD25- T cells into functional Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2010, 185:7186–7198
29. MENDES ME, BAGGIO-ZAPPIA GL, BRUNIALTI MK, FERNANDES Mda L, RAPOZO MM, SALOMAO R. Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 2011, 216:285–295

Corresponding author:

E. Yannaki, Gene and Cell Therapy Center, Hematology Department-BMT Unit
G. Papanicolaou Hospital, Exokhi 57010, Thessaloniki, Greece
e-mail: eyannaki@u.washington.edu

.....