



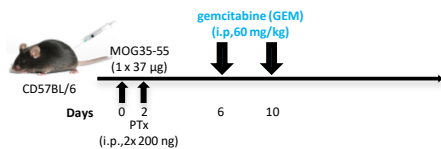
# ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΚΝΣ ΑΠΟ ΤΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΜΕ ΜΑΝΝΑΝΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ Ly6C<sup>hi</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ.

Αναστασία Δαγκανάκη<sup>1</sup>, Μαρία Αυλωνίτη<sup>1</sup>, Θεόδωρος Τσέλιος<sup>2</sup>, Μαρία-Ελένη Ανδρούτσου<sup>3</sup>, Λέσλυ Πρόμπρετ<sup>1\*</sup>.  
<sup>1</sup> Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Τμήμα Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα.  
<sup>2</sup> Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Πάτρα, Ελλάδα.  
<sup>3</sup> Βιανέξ ΑΕ, Βαρυμπόμπη, Αθήνα, Ελλάδα.

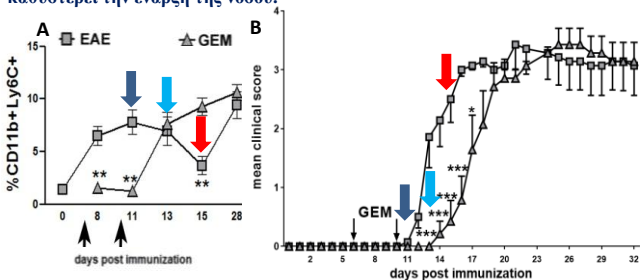
**Εισαγωγή:** Η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) θεωρείται ως ικανοποιητικό μοντέλο για τη σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ). Στην ανάπτυξη της νόσου κύριο ρόλο παίζουν τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα και τα ανώριμα μονοκύτταρα με φαινότυπο CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (Ly6C<sup>hi</sup>). Πρόσφατα δείξαμε την αντιγόνο-ειδική θεραπευτική δράση του συζευγμένου με μαννάνη πεπτιδίου 35-55 της μυελινικής γλυκοπρωτεΐνης των ολιγοδενδροκυττάρων (OM-MOG) στην EAE μέσω της επαγωγής T κυτταρικής ανέργειας και της τύπου 2 μυελοειδούς απόκρισης. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την εμπλοκή των Ly6C<sup>hi</sup> κυττάρων και του κατασταλτικού μορίου PD-L1 στην επαγωγή της νόσου και στην ανοσολογική ανοχή.

## 1<sup>ο</sup> Πρωτόκολλο

Θηλυκοί ποντικοί C57BL/6 ανασοποιήθηκαν για την EAE και τους χορηγήθηκε η γεμισταβίνη (GEM), που αναστέλλει τα Ly6C<sup>hi</sup> κύτταρα, τις ημέρες 6 και 10 μετά την ανασοποίηση (dpt), πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων.



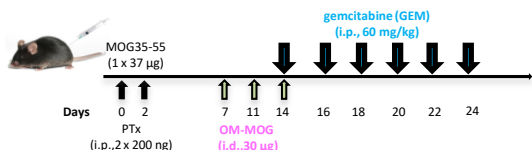
**Αποτελέσματα 1:** Τα Ly6C<sup>hi</sup> μονοκύτταρα είναι απαραίτητα για την έναρξη της EAE και μεταναστεύουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα κατά την κορύφωση της νόσου. Η αναστολή τους μέσω της γεμισταβίνης (GEM) καθυστερεί την έναρξη της νόσου.



**Figure 1:** (A) Ποσοστά των CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> κυττάρων στο περιφερικό αίμα με FACS τις ημέρες 8,11,13,15 και 28 μετά την ανασοποίηση. (B) Μέσος όρος κλινικού σκορ των ποντικών με EAE στους οποίους χορηγήθηκε GEM (μαύρα βέλη). Τα εγχρώμα βέλη δείχνουν την έναρξη και την κορύφωση της EAE σε συνδυασμό με τα ποσοστά στο αίμα και την καθυστέρηση της έναρξης από την GEM. Στατιστική ανάλυση με Student's T test (A) και two-way ANOVA (B) (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

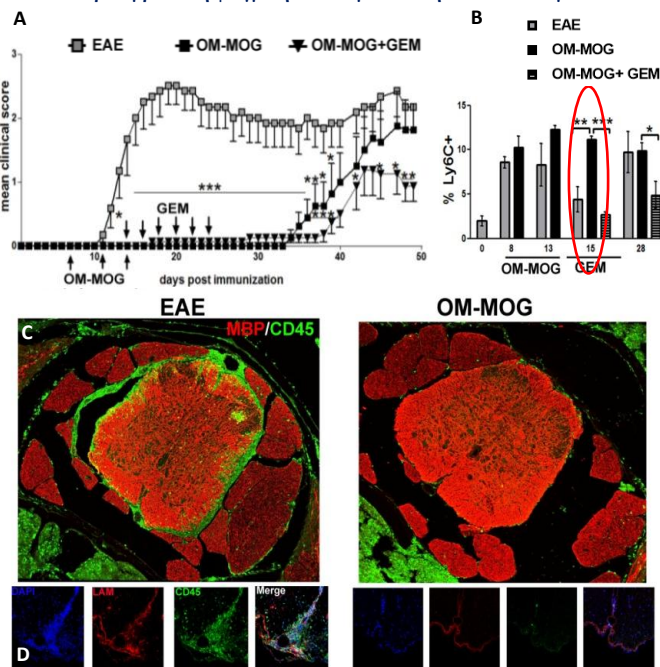
## 2<sup>ο</sup> Πρωτόκολλο

Θηλυκοί ποντικοί C57BL/6 ανασοποιήθηκαν για την EAE και τους χορηγήθηκε OM-MOG τις ημέρες 7-14 (πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων) και η γεμισταβίνη τις ημέρες 14-24 μετά την ανασοποίηση.



Η έρευνα αυτή διεξάγεται με τη συγχρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των Ελληνικών εθνικών πόρων μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία υπό την ονομασία ΕΡΕΥΝΑ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ (έργο ΑΚΕΣΩ, κωδικός έργου :Τ1ΕΔΚ-01859).

**Αποτελέσματα 2:** Το OM-MOG παρεμποδίζει τη μετανάστευση των Ly6C<sup>hi</sup> στο ΚΝΣ και προλαμβάνει τη φλεγμονή και απομυελίνωση του νωτιαίου μυελού.



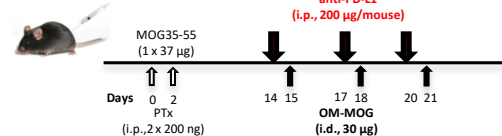
**Figure 2:** (A) Μέσος όρος κλινικού σκορ των ποντικών με EAE στους οποίους χορηγήθηκε OM-MOG ή OM-MOG+GEM τις χρονικές στιγμές που υποδεικνύονται από τα βέλη (B) Ποσοστά των CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> κυττάρων στο περιφερικό αίμα με FACS τις ημέρες 8,11,13,15 και 28 μετά την ανασοποίηση. (C) Εικόνες ανοσοφθορισμού κροτομών νωτιαίου μυελού μαζί με το περιβάλλον οστό, που επωάστηκαν με αντισώματα έναντι της βασικής πρωτεΐνης μυελίνης (MBP) και του CD45, στη φάση της κορύφωσης της EAE (dpt8) (D) Εικόνες ανοσοφθορισμού κροτομών νωτιαίου μυελού όπως στο C, που επωάστηκαν με αντισώματα έναντι της λαμίνης (κόκκινο) και του CD45 (πράσινο). Στατιστική ανάλυση με two-way ANOVA (A) και Student's T test (B) (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

## Συμπεράσματα

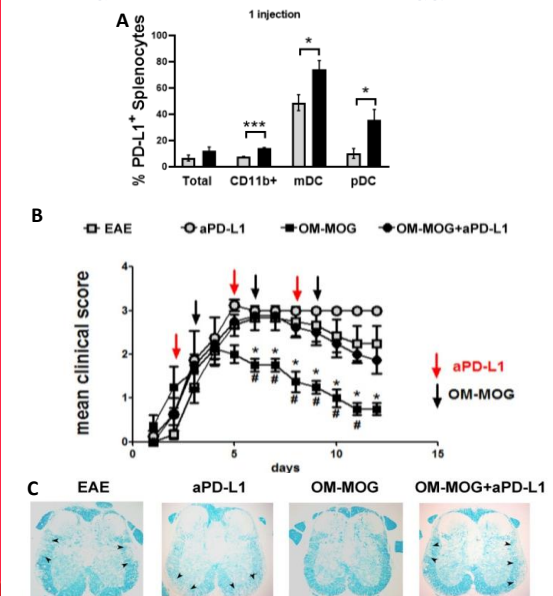
- Τα Ly6C<sup>hi</sup> μονοκύτταρα είναι απαραίτητα για την έναρξη της EAE και η αναστολή τους από τη GEM εμποδίζει την έναρξη της νόσου.
- Το OM-MOG αναστέλλει την EAE, παρεμποδίζοντας τη μετανάστευση των Ly6C<sup>hi</sup> μονοκυττάρων στο ΚΝΣ.
- OM-MOG αυξάνει την παραγωγή PD-L1 από τα μυελοειδή κύτταρα του σπλήνα, το οποίο είναι απαραίτητος μεσολαβητής της ανοσολογικής ανοχής.

## 3<sup>ο</sup> Πρωτόκολλο

Θηλυκοί ποντικοί C57BL/6 ανασοποιήθηκαν για την EAE και τους χορηγήθηκε anti-PD-L1 αντίσωμα και OM-MOG εναλλάξ ανά 3 μέρες, ξεκινώντας από την 14<sup>η</sup> ημέρα μετά την ανασοποίηση.



**Αποτελέσματα 3:** Το OM-MOG αυξάνει την παραγωγή PD-L1 από τα CD11b, CD11c κύτταρα του σπλήνα, η αναστολή του οποίου οδηγεί στην απόλυτη της ανοσολογικής ανοχής.



**Figure 3:**(A) Ποσοστά του PD-L1 που παράγεται από τους CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (mDC) και CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (pDC) κυτταρικούς πληθυσμούς του σπλήνα ποντικών με EAE (γκρι) 24h μετά από μία θεραπευτική ένεση OM-MOG (μαύρο). (B) Μέσος όρος κλινικού σκορ των ποντικών με EAE στους οποίους χορηγήθηκε OM-MOG καὶ/ἢ anti-PD-L1 αντίσωμα χρονικές στιγμές που υποδεικνύονται από τα βέλη (C) Τομές νωτιαίου μυελού με τη χροστί μυελίνης Luxol Fast Blue (τα βέλη δείχνουν περιοχές απομυελίνωσης). Ο νωτιαίος μυελός απομυελίνθηκε από τους ποντικούς του Β κατά την ημέρα της θυσίας. Στατιστική ανάλυση με Student's T test (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001) (A) Mann-Whitney test (B) (\*p<0.05, EAE vs OM-MOG, # p<0.05, OM-MOG vs PD-L1)