

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Η προθυμοσίνη α ως καρκινικός βιοδείκτης και ανοσοθεραπευτικό μόριο

Ο θύμος αδένας, ως πρωτογενές λεμφικό όργανο, διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, συμβάλλοντας καθοριστικά στην ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Το πρώτο βιολογικά ενεργό εκχύλισμα που απομονώθηκε από θύμο ήταν η «θυμοσίνη-κλάσμα V» (TFV). Η κλασμάτωση της TFV οδήγησε στην απομόνωση σειράς ανοσοδραστικών πολυπεπτιδίων, που ονομάστηκαν θυμοσίνες. Οι σημαντικότερες και πλέον μελετημένες είναι η θυμοσίνη α1 (Ta1) και το πρόδρομο μόριό της, η προθυμοσίνη α (προTa). Παρ' όλο που οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δράσης των πολυπεπτιδίων αυτών δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, δυνητικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ιατρικούς σκοπούς σε ασθενείς με καρκίνο, τόσο ως βιοδείκτες, όσο και ως ανοσοθεραπευτικά μόρια. Η προTa εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς και, μέχρι σήμερα, της έχει αποδοθεί διπλός ρόλος: ενδοκυτταρικά, συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και εξωκυτταρικά, εμφανίζει ανοσορρυθμιστική λειτουργία. Στην παρούσα ανασκόπηση θα εστιάσουμε στην προTa, στα υπάρχοντα δεδομένα για το ρόλο της στον καρκίνο και τις πιθανές κλινικές εφαρμογές της, τόσο ως βιοδείκτη για την πρόγνωση και την παρακολούθηση της πορείας του καρκίνου, όσο και ως ανοσοθεραπευτικό εργαλείο για την ενεργοποίηση των ανοσιακών αποκρίσεων έναντι των καρκινικών κυττάρων. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν χορηγώντας Ta1 σε ασθενείς με καρκίνο, θα συζητηθεί η προοπτική χρησιμοποίησης της προTa σε αντίστοιχες κλινικές μελέτες στον άνθρωπο, με απώτερο στόχο την ενίσχυση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και τελικά την ύφεση της νόσου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο θύμος αδένας

Ο θύμος αδένας είναι πρωτογενές λεμφικό όργανο, οι λειτουργίες του οποίου παρέμεναν για πολλά χρόνια άγνωστες. Οι πρώτες ενδείξεις για την καθοριστική συμβολή του θύμου στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος αναφέρθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1960, όταν ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες μελέτησαν τις επιπτώσεις της χειρουργικής αφαίρεσης του θύμου σε ζώα νεογνικής ηλικίας.¹ Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ζώα που είχαν υποστεί θυμεκτομή παρουσίαζαν μειωμένο αριθμό Τ- και Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και σε λεμφικούς ιστούς, ελαττωμένη παραγωγή

αντισωμάτων έναντι ορισμένων αντιγόνων, καθώς και αδυναμία απόρριψης ασύμβατων μοσχευμάτων. Ορισμένα ζώα, μάλιστα, εμφάνιζαν καθυστέρηση της ανάπτυξής τους, ευαισθησία σε λοιμώξεις και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε νεαρή ηλικία.² Σήμερα είναι γνωστός ο θεμελιώδης ρόλος του θύμου στην ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, με εξέχουσα λειτουργία του την ωρίμανση και την επιλογή του ρεπερτορίου των Τ-λεμφοκυττάρων.

Ο θύμος έχει μέγιστο μέγεθος στην εφηβεία και ατροφεί με την πάροδο της ηλικίας, με επακόλουθη μείωση του μεγέθους του και των επιπέδων των παραγομένων από αυτόν «ορμονών».³ Το γεγονός αυτό συνδέεται με ελάττωση των ανοσιακών αποκρίσεων, συνοδευόμενη από αύξηση

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(4):406-419
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(4):406-419

**N. Καππά,*
E. Williams,*
K. Ιωάννου,
Π. Σαμαρά,
Ο. Τσιτσιλώνη**

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και
Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή
Θετικών Επιστημών, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα*

Prothymosin α as a cancer
biomarker and immunotherapeutic
tool

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανοσοδραστικό πεπτίδιο
Ανοσοθεραπεία του καρκίνου
Καρκινικός βιοδείκτης
Προθυμοσίνη α

Υποβλήθηκε 10.3.2013

Εγκρίθηκε 19.3.2013

*Ισότιμη συμμετοχή των κ.κ. Ν. Κάππα και Ε. Williams

των περιστατικών εμφάνισης καρκίνου και ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία.⁴ Σημαντική έρευνα έχει εστιαστεί στον εντοπισμό και την ταυτοποίηση εκκρινόμενων από το θύμο πολυπεπτιδίων, η ορμονική δράση των οποίων μπορεί να είναι τοπική (παρακρινής) ή να αφορά και σε απομακρυσμένους ιστούς και όργανα (ενδοκρινής).

1.2. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των θυμοσινών

Στο θύμο συντίθεται μεγάλη ποικιλία βιολογικά ενεργών πολυπεπτιδίων με ορμονική δράση και διαφορετική χημική δομή.⁴ Οι επιδράσεις των συγκεκριμένων μορίων στα κύτταρα καταγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Roberts και White, μετά τη χορήγηση εκχυλίσματος θύμου μοσχαριού σε ενήλικα ποντίκια με αποτέλεσμα την υπερτροφία του θύμου αδένου τους.⁵ Μεταγενέστερες *in vivo* μελέτες από την ομάδα του Goldstein οδήγησαν στην ταυτοποίηση ενός θυμικού εκχυλίσματος, το οποίο ενίσχυε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στους λεμφοειδείς ποντικών.⁶ Το 1966, ο εν λόγω παράγοντας λεμφοποίησης απομονώθηκε, χαρακτηρίστηκε και ονομάστηκε «θυμοσίνη».⁷ Η ίδια ερευνητική ομάδα, εφαρμόζοντας πέντε διαδοχικά στάδια καθαρισμού του θυμικού εκχυλίσματος, απομόνωσε ένα ιδιαίτερα ενεργό εκχύλισμα από θύμο αδένου μοσχαριού, το οποίο ονομάστηκε «θυμοσίνη-κλάσμα V» (TFV).⁸

Έλεγχος της *in vivo* δράσης της κατέδειξε ότι η TFV ενίσχυε τις ανοσιακές αποκρίσεις σε νεογέννητα ποντίκια και παρέτεινε την επιβίωση ποντικών που είχαν υποστεί θυμεκτομή.⁹ *In vitro* προσθήκη της TFV σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων από ασθενείς σε ανοσοκαταστολή, αποκατέστησε τις ανοσολογικές τους λειτουργίες και αύξησε τις λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις τους σε φυσιολογικά επίπεδα.¹⁰ Οι Dauphinee et al, μελετώντας την επίδραση της χορήγησης TFV σε ζώα με αυθόρμητα αναπτυσσόμενη αυτοάνοση νόσο αντίστοιχη του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου στον άνθρωπο, ανέδειξαν τις θεραπευτικές της ιδιότητες, καθώς η χορήγησή της οδήγησε σε σημαντική υποχώρηση των συμπτωμάτων της νόσου.¹¹ Μεταγενέστερες έρευνες αποκάλυψαν την ικανότητα της TFV να παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων γλοιώματος, κυττάρων αδενώματος της υπόφυσης και προμυελοκυττάρων. Προτάθηκε, λοιπόν, ότι η TFV συμμετέχει σε μηχανισμούς καταστολής της δημιουργίας όγκων.¹² Αντίστοιχη μείωση του πολλαπλασιασμού των κακοήθων κυττάρων φάνηκε να προκαλείται και σε περιπτώσεις οξείας T λεμφοβλαστικής¹³ και προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας.¹⁴ Χορήγηση της TFV σε αρουραίους με λευχαιμία Dunning ενίσχυσε τις ανοσιακές τους αποκρίσεις,¹⁵ ενώ αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα σε ποντίκια με λεμφοβλαστική λευχαιμία.¹⁶

Η TFV αποτελείται από τουλάχιστον 40 μικρού μεγέθους πολυπεπτίδια, με όξινο χαρακτήρα και μοριακό βάρος 1.000–15.000 Da. Ένα σύστημα ονοματολογίας για το χαρακτηρισμό των πεπτιδίων και το διαχωρισμό τους με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) τα διακρίνει σε τρεις ομάδες, που χαρακτηρίζονται με τα ελληνικά γράμματα α, β ή γ. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα πεπτίδια με pI <5,0, στη δεύτερη αυτά με 5,0 ≤ pI <7,0, ενώ στην τρίτη όσα έχουν pI ≥7,0. Ένας επί πλέον αριθμός (1, 2, 3 κ.λπ.), ο οποίος δηλώνει τη σειρά με την οποία απομονώθηκε το κάθε πεπτίδιο από την TFV, αναγράφεται δίπλα από το γράμμα που χαρακτηρίζει την ομάδα στην οποία ανήκει το εκάστοτε πεπτίδιο. Τα πεπτίδια χαρακτηρίζονται ως θυμοσίνες ή απλώς πολυπεπτίδια, ανάλογα με το αν είναι βιολογικά ενεργά ή όχι, αντίστοιχα.¹⁷ Τα πολυπεπτίδια που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα ανήκουν στις οικογένειες των α- και β-θυμοσινών, ενώ δεν έχει βρεθεί κάποιο που να ανήκει στην οικογένεια των γ-θυμοσινών.

Η οικογένεια των α-θυμοσινών εκπροσωπείται κυρίως από τη θυμοσίνη α1 (Ta1) και την προθυμοσίνη α (προTa), η οποία αποτελεί το πρόδρομο μόριο της Ta1.¹⁸ Ο κυριότερος εκπρόσωπος της οικογένειας των β-θυμοσινών είναι η θυμοσίνη β4 (Tβ4). Τα βασικά πολυπεπτίδια υπεύθυνα για την ανοσολογική δραστηριότητα της TFV είναι η προ-Ta και η Tβ4, γι' αυτό και οι περισσότερες έρευνες έχουν εστιαστεί σε αυτά.

2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α

Η προTa κωδικοποιείται από το γονίδιο *PTMA*, το οποίο, στον άνθρωπο, εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q37.1).¹⁹ Πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο 109 ή 110 αμινοξικών καταλοίπων, πλούσιο σε γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ, αποτέλεσμα του οποίου είναι ο ιδιαίτερα όξινος χαρακτήρας του (pI 3,55). Εμφανίζει υψηλή συντηρητικότητα ως προς την πρωτοταγή του δομή στα θηλαστικά²⁰ (πίν. 1), εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, αφθονεί σε κύτταρα με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό²¹ και ο αριθμός των ενδοκυτταρικών αντιγράφων του πολυπεπτιδίου σχετίζεται με τον κυτταρικό τύπο.²² Η προTa δεν έχει καθορισμένη δευτεροταγή δομή, αλλά πιθανόν αποκτά δομή στο χώρο μετά από αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή μακρομόρια στην κυτταρική επιφάνεια,²³ ενώ υπό ορισμένες συνθήκες (χαμηλό pH και υψηλή συγκέντρωση) δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια.²⁴ Ενδοκυτταρικά, εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα²⁵ και δεν εκκρίνεται, εφ' όσον δεν διαθέτει πεπτίδιο-οδηγητή.

3. ΟΙ ΔΙΑΚΡΙΤΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α

Η παρουσία της προTa σε όλους τους ιστούς και τα

Πίνακας 1. Πολλαπλή στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της προθυμοσίνης α από διάφορα θηλαστικά.²⁰

	10	20	30	40
<i>B. taurus</i>	SDAAVDTSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	EAPANGNA-N
<i>H. sapiens</i>	SDAAVDTSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	DAPANGNAEN
<i>M. musculus</i>	SDAAVDTSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	DAPANGNAQN
<i>R. norvegicus</i>	SDAAVDTSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	DAPANGNAQN
<i>S. scrofa</i>	SDAAVDTSSE	ITTKDLKEKK	EVVEEAENGR	EAPANGNA-N
	*****	*****	*****	:***** *
	50	60	70	80
<i>B. taurus</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>H. sapiens</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>M. musculus</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>R. norvegicus</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
<i>S. scrofa</i>	EENGEQEADN	EVDEEEEEGG	EEEEEEEEGD	GEEEDGDEDE
	*****	*****	*****	*****
	90	100	110	
<i>B. taurus</i>	EAEAAATGKRA	AEDDEDDVD	TKKQK-TDED D	
<i>H. sapiens</i>	EAESATGKRA	AEDDEDDVD	TKKQK-TDED D	
<i>M. musculus</i>	EAEAPTGKRV	AEDDEDDVD	TKKQK-TEED D	
<i>R. norvegicus</i>	EAEAPTGKRV	AEDDEDDVE	TKKQKKTDED D	
<i>S. scrofa</i>	EAEAAATGKRA	AEDDEDDVD	TKKQK-TDED D	
	** * . * * * *	***** :	***** * : * * *	

* Ταυτόσημα αμινοξικά κατάλοιπα, : Αμινοξικά κατάλοιπα με ταυτόσημες χημικές ιδιότητες, . Αμινοξικά κατάλοιπα με παρόμοιες χημικές ιδιότητες

κύτταρα υποδηλώνει την καθοριστική συμμετοχή της σε σημαντικά μοριακά μονοπάτια. Οι μέχρι τώρα έρευνες υποδεικνύουν ένα διπλό ρόλο για το πολυπεπτιδίο: (α) ενδοκυτταρικά συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ (β) εξωκυτταρικά δρα ανοσορρυθμιστικά. Η απόδοση δύο διακριτών ρόλων σε πρωτεΐνες ανάλογα με τη θέση εντοπισμού τους, εντός ή εκτός του κυττάρου, δεν χαρακτηρίζει αποκλειστικά την προΤα.²⁶ Αντίστοιχοι ρόλοι έχουν αποδοθεί στην πρωτεΐνη θερμικού shock 90 (HSP90) και στην πρωτεΐνη B1 της ομάδας των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (HMGB1). Ενδοκυτταρικά, η HSP90 δρα ως μοριακή συνοδός και η HMGB1 ως ρυθμιστικό μόριο της μεταγραφής, ενώ εξωκυτταρικά και οι δύο επιτελούν ανοσορρυθμιστικό ρόλο ως μεσολαβητές της προφλεγμονώδους αντίδρασης.^{27,28}

3.1. Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α

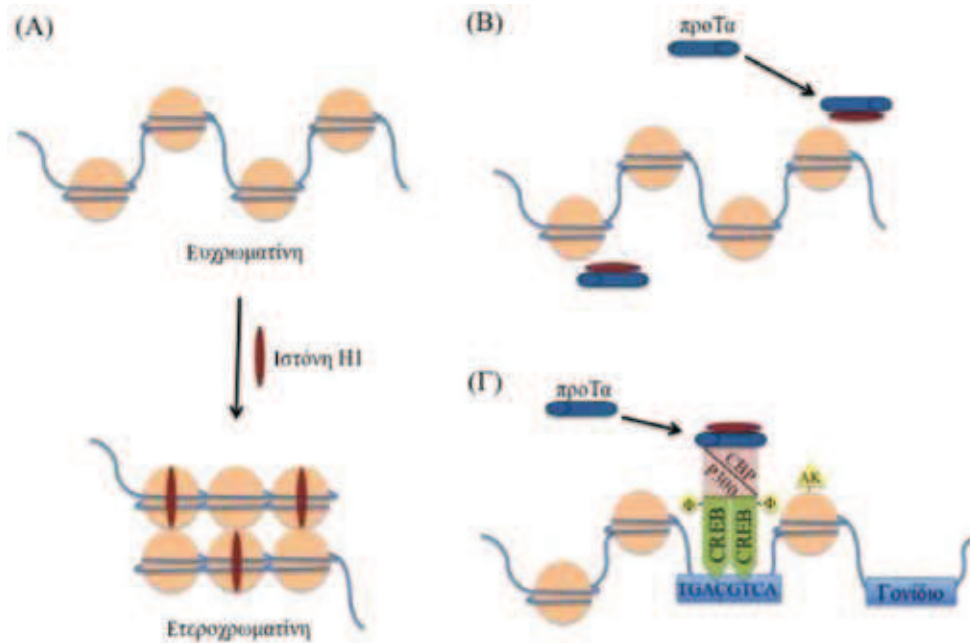
Η προΤα είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων.²³ Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον ενδοκυτταρικό της ρόλο εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου.²⁹ Σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται έντονα έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του *PTMA*,³⁰ γεγονός που τελικά οδηγεί σε υπερπαραγωγή

της προΤα, η οποία φωσφορυλιώνεται³¹ και μεταναστεύει στον πυρήνα.²⁵ Εκεί, αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 και την πρωτεΐνη που δεσμεύει τον CREB (CBP)³² και ρυθμίζει τη δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης p300,³³ συμμετέχοντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά την κυτταρική διαίρεση (εικ. 1). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *c-myc* οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του *PTMA*, με αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού κύκλου.³⁰

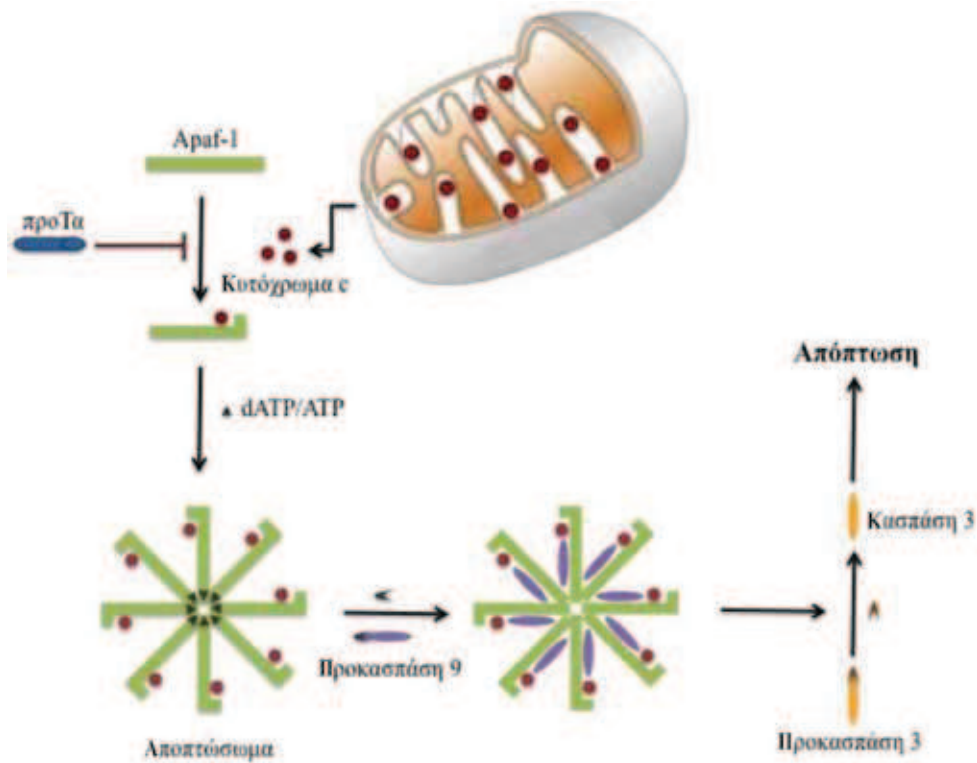
Στο κυτταρόπλασμα, η παρουσία της προΤα αποτρέπει την απόπτωση, αναστέλλοντας το σχηματισμό του αποπτωσώματος,³⁴ μετά από αλληλεπιδράσή της με τον ενεργοποιητικό παράγοντα των πρωτεασών της απόπτωσης 1 (Araf-1)³⁵ (εικ. 2). Επίσης, η προΤα ρυθμίζει τους αμυντικούς μηχανισμούς του συστήματος Nrf2-Keap1, ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας μονοπάτια που επάγονται από το οξειδωτικό stress, γεγονός το οποίο συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων^{36,37} (εικ. 3).

3.2. Ο εξωκυτταρικός ρόλος της προθυμοσίνης α

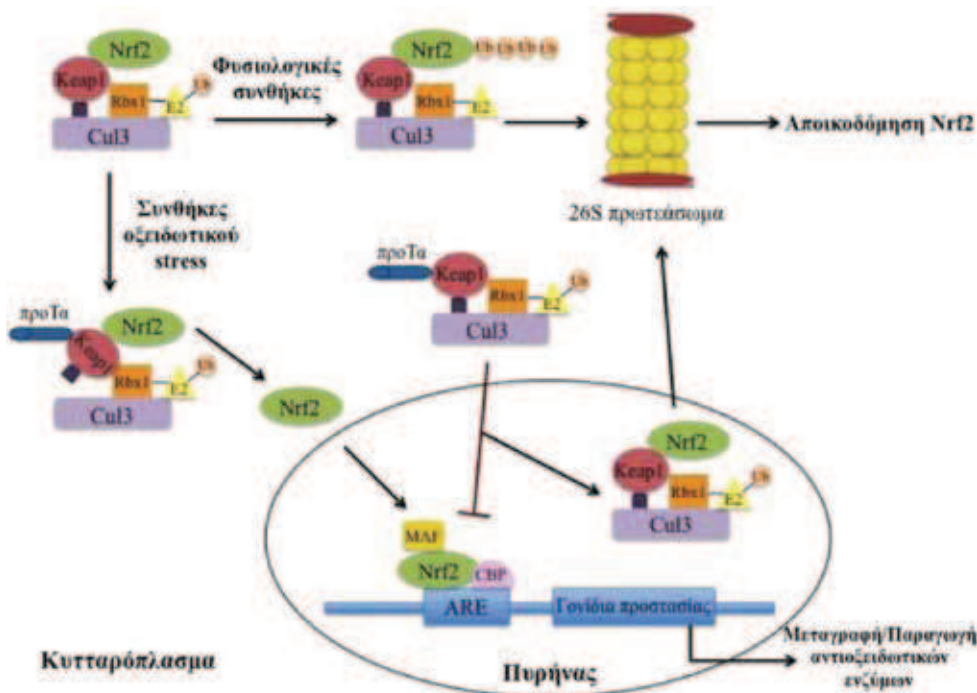
Η προΤα έχει την ικανότητα να διεγείρει τις ανοσιακές αποκρίσεις, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η περιοχή του πολυπεπτιδίου που είναι υπεύθυνη για την ανοσορρυθμι-



Εικόνα 1. Η proTa αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1, βοηθώντας στη μεταγραφή γονιδίων. (Α) Απουσία proTa, η ιστόνη H1 προσδένεται στα νουκλεοσώματα και προκαλεί τη συμπίκνωση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. (Β) Παρουσία proTa, το μόριο αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1, βοηθώντας στη μεταφορά της από και προς τη χρωματίνη. (Γ) Κατά τη μεταγραφή, αποκαλύπτεται η αλληλουχία CRE (TGACGTCA) στο γενετικό υλικό, όπου προσδένεται το ομοδιμερές CREB. Το CREB φωσφορυλιώνεται (Φ) από κινάσες και το σύμπλεγμα CBP-p300 στρατολογείται από την proTa. Το σύμπλοκο CREB-CBP-p300 σταθεροποιείται, οδηγώντας σε ακετυλίωση (ΑΚ) ιστονών από την p300, σε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στη μεταγραφή γονιδίων.



Εικόνα 2. Η proTa αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου. Το αποπτωτικό σήμα προκαλεί την έξοδο του κυτοχρώματος c από το μεσομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο κυτταρόπλασμα. Η σύνδεση του κυτοχρώματος c με τον Araf-1 οδηγεί στην ενεργοποίησή του και στο σχηματισμό του αποπτωσώματος. Η επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης 9 ενεργοποιεί την προκασπάση 3 προς κασπάση 3, η οποία επάγει την απόπτωση του κυττάρου. Παρουσία proTa, παρεμποδίζεται η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1 και συνεπώς αναστέλλεται το αποπτωτικό μονοπάτι.



Εικόνα 3. Η προΤα προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό stress. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το σύμπλοκο Nrf2-Keap1-Cul3-Rbx1 ουβικιτινιλιώνεται (Ub) στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα, όπου αποικοδομείται. Υπό συνθήκες οξειδωτικού stress, η προΤα προσδένεται στο σύμπλοκο μέσω του Keap1, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του Nrf2, τη μετανάστευσή του στον πυρήνα και την ενεργοποίηση του μηχανισμού μεταγραφής γονιδίων και παραγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων. Απενεργοποίηση του μηχανισμού προκαλείται από το σύμπλοκο προΤα-Keap1-Cul3-Rbx1, το οποίο προσδένει τον Nrf2 και τον οδηγεί στο πρωτεάσωμα, όπου αποικοδομείται.

στική του λειτουργία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό του άκρο (αμινοξικά κατάλοιπα 100–109).³⁸ Η εξωκυτταρική ανοσορρυθμιστική δράση της προΤα φάνηκε ήδη από τα αρχικά *in vivo* πειράματα, όπου η χορήγηση προΤα προστατεύσε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια από ευκαιριακές λοιμώξεις (π.χ. από *Candida albicans*), αλλά και διέγειρε την έκκριση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μακροφάγων (MIF).³⁹ Προσθήκη προΤα σε *in vitro* καλλιέργειες λεμφοκυττάρων αύξησε τόσο την παραγωγή ιντερλευκίνης 2 (IL-2) από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, όσο και την έκφραση των υποδοχέων της σε αυτά.⁴⁰ Επί πλέον, η προΤα αύξησε την έκφραση των αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, αλλά και σε καρκινικά κύτταρα, τα οποία δεν εξέφραζαν τα συγκεκριμένα μόρια.⁴¹ Οι Cordero et al, μελετώντας την επίδραση της προΤα σε διάφορους πληθυσμούς κυττάρων, έδειξαν ότι διεγείρει την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών (NK) κυττάρων,⁴² ενώ σε συνέργεια με την IL-2 ενισχύει τη δράση των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (LAK) κυττάρων.⁴³

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης της

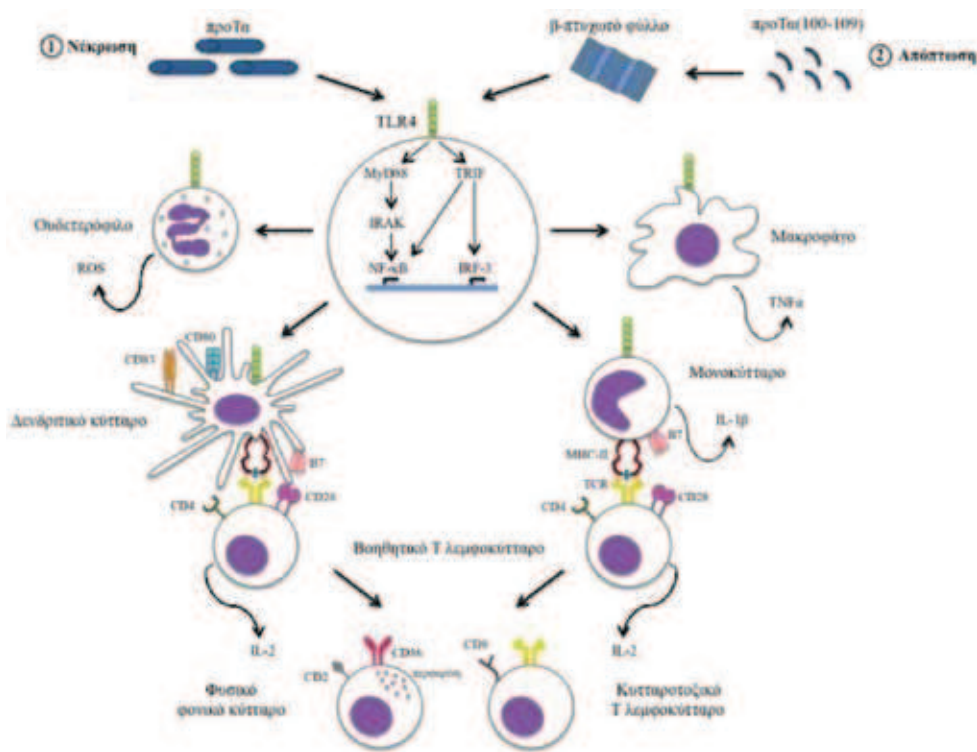
προΤα, καλλιιεργήθηκαν ανθρώπινοι λεμφοβλάστες με ραδιοεργάσημασμένη προΤα και παρατηρήθηκαν δύο θέσεις δέσμευσης του μορίου στην κυτταρική επιφάνεια, μια υψηλής και μια χαμηλής συγγένειας.²³ Στα πρώτα αυτά ασαφή πειράματα, με μικροσκοπία φθορισμού εντοπίστηκε δομή τύπου «καπέλου» στον έναν πόλο των λεμφοβλαστών, στην οποία δεσμευόταν η προΤα. Η δομή αυτή αποτελείται από τρεις υπομονάδες και σχετιζόταν με λιπιδικές σχεδίες,⁴⁴ αλλά τα πειραματικά δεδομένα δεν επιβεβαιώθηκαν με ταυτοποίηση ειδικού υποδοχέα για την προΤα. Πλέον πρόσφατα, δείχθηκε ότι η προΤα προσδένεται και σηματοδοτεί μέσω υποδοχέων τύπου

Toll (Toll-like receptors, TLRs) και συγκεκριμένα μέσω του TLR4, ενεργοποιώντας τόσο το εξαρτώμενο από τον TRIF σηματοδοτικό μονοπάτι για την παραγωγή ιντερφερόνης-β (IFN-β), όσο και το εξαρτώμενο από το MyD88 μονοπάτι για την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α)⁴⁵ (εικ. 4).

4. Η ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Με βάση τη συμμετοχή της προΤα στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα, η παρουσία αυξημένων επιπέδων προΤα τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης σε κακοήθεις ιστούς ήταν αναμενόμενη. Έτσι, πολλές μελέτες έχουν εστιαστεί στη διερεύνηση των επιπέδων της προΤα σε διάφορους τύπους καρκίνου και την πιθανή προγνωστική της σημασία^{46–64} (πίν. 2).

Ειδικότερα, τα επίπεδα μεταγραφής του *PTMA* έχουν συσχετιστεί με αυτά του *c-myc* στον καρκίνο του παχέος εντέρου⁴⁸ και του ήπατος,⁴⁹ καθώς και με αυτά του *N-myc*



Εικόνα 4. Η προΤα και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτιδίου προΤα(100–109) επάγουν ανοσιακές απαντήσεις. Κατά τη νέκρωση (1) η προΤα απελευθερώνεται από το κύτταρο, ενώ κατά την απόπτωση (2) διασπάται ενδοκυτταρικά από τις ενεργοποιημένες κασπάσες και απελευθερώνεται το προΤα(100–109), το οποίο πολυμερίζεται σε β-πτυχωτά φύλλα. Εξωκυτταρικά, η προΤα ή το προΤα(100–109) προσδένονται σε υποδοχείς τύπου Toll (TLR4) σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας, ενεργοποιώντας τα εξαρτώμενα από τα MyD88 και TRIF σηματοδοτικά μονοπάτια. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή TNF-α από τα μακροφάγα, IL-1β από τα μονοκύτταρα και ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) από τα ουδετερόφιλα, καθώς και η ενίσχυση της αντιγονοπαρουσίασης από τα δενδριτικά κύτταρα και τα μονοκύτταρα. Η επακόλουθη σύναψη δενδριτικών κυττάρων ή και μονοκυττάρων με βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα οδηγεί στην ενεργοποίηση, στον πολλαπλασιασμό και στην παραγωγή IL-2 από τα τελευταία. Η IL-2 ενισχύει την ειδική και τη μη ειδική κυτταροτοξικότητα, που μεσολαβούνται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα, αντίστοιχα.

στο νευροβλάστωμα.⁵⁰ Αντίθετα, στον καρκίνο του πνεύμονα, αν και ανιχνεύτηκαν υψηλά επίπεδα mRNA της προΤα, τα επίπεδα του *c-myc* δεν εμφάνισαν αντίστοιχη αύξηση,⁵¹ γεγονός που υποδηλώνει ότι η ταυτόχρονη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των *c-myc* και *PTMA* δεν επάγεται σε όλους τους τύπους καρκίνου. Αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του *PTMA* έχουν εντοπιστεί και σε βιοψίες ραβδομυοσαρκωμάτων και πιθανόν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικός δείκτης της νόσου.⁵² Οι Letsas et al, αναπτύσσοντας μια υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας μέθοδο ανίχνευσης των επιπέδων της προΤα σε πολύ μικρά δείγματα βιοψιών, εντόπισαν υψηλά επίπεδα mRNA της σε καλά διαφοροποιημένα θυρεοειδικά καρκινώματα, σε αντίθεση με θυρεοειδικά αδενώματα και βρογχοκήλες,⁵³ προτείνοντας την πιθανή χρήση της προΤα ως δείκτη πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα των Ojima et al, όπου αυξημένα επίπεδα mRNA της προΤα σε καρκινικά κύτταρα παχέος

εντέρου σχετίστηκαν με την ανθεκτικότητά τους στην ακτινοθεραπεία.⁵⁴

Ως προς τη μέτρηση των επιπέδων του πολυπεπτιδίου σε καρκινικούς ιστούς, η ομάδα μας, για πρώτη φορά, έδειξε ότι ιστοί από καρκίνο του μαστού και του εντέρου περιέχουν αυξημένα προΤα σε σύγκριση με γειτονικούς υγιείς ιστούς,⁵⁵ προτείνοντας ότι τα επίπεδα της προΤα αντανακλούν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κακοήθων κυττάρων. Οι Dominguez et al παρατήρησαν ότι όταν η συγκέντρωση της προΤα σε καρκινικούς ιστούς μαστού υπερέβαινε τα 124 ng/mg, οι ασθενείς είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μετάστασης.⁵⁶ Όπως αποδείχθηκε στη συνέχεια, τα επίπεδα της προΤα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξαρτώνται από το βαθμό κακοήθειας (grade)

του όγκου⁵⁷ και συσχετίζονται τόσο με την πιθανότητα μετάστασης όσο και τη γενικότερη έκβαση της νόσου. Συγκεκριμένα, ασθενείς με χαμηλά ή μέτρια επίπεδα προΤα στον πρωτοπαθή όγκο παρουσίασαν στατιστικά χαμηλότερη συχνότητα υποτροπής και θνησιμότητα, σε σχέση με ασθενείς στους όγκους των οποίων ανιχνεύτηκε υψηλή συγκέντρωση προΤα.⁵⁸ Μελετώντας τα επίπεδα της προΤα κατά την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη, οι Suzuki et al διαπίστωσαν σταδιακή αύξηση των επιπέδων του πολυπεπτιδίου κατά τη μετάπτωση του φυσιολογικού επιθηλίου σε ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και, τελικά, σε αδενοκαρκίνωμα.⁵⁹ Ανάλογες διακυμάνσεις των επιπέδων της προΤα παρατηρήθηκαν και σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Με μικροσυστοιχίες διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα του μορίου σε καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με υγιείς ιστούς, ενώ σε όγκους πιο προχωρημένου σταδίου τα επίπεδα της προΤα ήταν ακόμη υψηλότερα.⁶⁰ Υπερέκφραση της προΤα παρατηρήθηκε και σε καρκίνο του ανώτερου ουροποιητικού

Πίνακας 2. Η προθυμοσίνη α ως βιοδείκτης για την πρόγνωση του καρκίνου στον άνθρωπο.

Τύπος καρκίνου	Μετρήσεις επιπέδων	Συσχέτιση με	Βιβλιογραφική παραπομπή
Ανώτερου ουροποιητικού συστήματος	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	61
Ήπατος	mRNA/πρωτεΐνη σε ιστούς	Έκφραση του <i>c-myc</i> , κακή πρόγνωση	49, 62
Θυρεοειδούς	mRNA σε ιστούς/πρωτεΐνη σε ιστούς και ορό	Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων	53, 67
Κεφαλής και τραχήλου	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	64
Μαστού	Πρωτεΐνη σε ιστούς και ορό	Βαθμό κακοήθειας, υποτροπή, μετάσταση, μειωμένη επιβίωση	55–58, 66
Νευροβλάστωμα	mRNA σε ιστούς	Έκφραση του <i>N-myc</i>	50
Ορθού	mRNA σε ιστούς	Αποτελεσματικότητα ακτινοθεραπείας	54
Ουροδόχου κύστης	Πρωτεΐνη σε ιστούς και ούρα	Ανίχνευση και βαθμό κακοήθειας, παρακολούθηση νόσου	60, 68
Παχέος εντέρου	mRNA σε ιστούς	Έκφραση του <i>c-myc</i>	48, 55
Πνεύμονα	mRNA σε ιστούς	Κακή πρόγνωση	51
Προστάτη	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων, εξέλιξη του όγκου	59, 47
Ραβδομυοσάρκωμα	mRNA σε ιστούς	–	52
Στομάχου	Πρωτεΐνη σε ιστούς	–	46
Υπόφυσης	Πρωτεΐνη σε ιστούς	Υποτροπή	63

συστήματος και, μάλιστα, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι ο εντοπισμός του μορίου στο κυτταρόπλασμα συνδέεται με την πιθανότητα υποτροπής.⁶¹ Τέλος, υψηλά επίπεδα προΤα έχουν σχετιστεί με επιθετικότερους όγκους και πτωχότερη πρόγνωση σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα,⁶² υποφυσιακούς όγκους⁶³ και καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου.⁶⁴

Εφ' όσον φυσιολογικά η προΤα είναι αμιγώς ενδοκυτταρικό πολυπεπτίδιο, οι αρχικές μελέτες για τη συσχέτισή της με τον καρκίνο είχαν εστιαστεί, κυρίως, στους κακοήθεις όγκους ή και στα κυτταρικά εκχυλίσματά τους. Το πλεονέκτημα αυτών των αναλύσεων είναι ότι ανιχνεύονται τα επίπεδα του περιεχόμενου mRNA ή της πρωτεΐνης άμεσα στα κύτταρα του όγκου, αλλά βασικό μειονέκτημα αποτελεί η μη επαρκής διαθέσιμη ποσότητα ιστού. Ένας καρκινικός βιοδείκτης συνήθως ποσοτικοποιείται στο αίμα ή και στα ούρα. Έτσι και η προΤα, σύντομα μετά το χαρακτηρισμό της, ανιχνεύτηκε στο ανθρώπινο αίμα⁶⁵ και η παρουσία της αυτή αποδόθηκε είτε σε «διαρροή» της από νεκρά λευκοκύτταρα, είτε σε απελευθέρωσή της από πλούσια σε προΤα κύτταρα, μέσω ενός άγνωστου μέχρι σήμερα μηχανισμού. Προς το παρόν, η ανίχνευση προΤα στον ορό ασθενών με καρκίνο έχει αναφερθεί σε δύο μόνο μελέτες: (α) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού⁶⁶ και (β) σε ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από καρκίνο του θυρεοειδούς.⁶⁷ Παρ' όλα αυτά, δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της προΤα στο αίμα και του βαθμού κακοήθειας του όγκου, αλλά ούτε και με την πρόγνωση της νόσου.

Αντίθετα, μια ενδιαφέρουσα μελέτη αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της προΤα στα ούρα μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμο βιοδείκτη για την ανίχνευση και την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.⁶⁸ Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι (α) η προΤα στα ούρα ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που διαγνώστηκαν σχετικά πρόσφατα με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, (β) οι ασθενείς με υψηλής διαφοροποίησης όγκους εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα προΤα στα ούρα σε σχέση με ασθενείς με χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο της ουροδόχου κύστης και (γ) κατά τη διάρκεια της τρίμηνης παρακολούθησης, τα επίπεδα της προΤα στα ούρα αυξάνονταν σε περιπτώσεις παρουσίας υπολειμματικής νόσου ή υποτροπής μετά τη θεραπεία.

5. Η ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α ΩΣ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Η ιδιότητα της προΤα να δρα εξωκυτταρικά ως ρυθμιστής των ανοσιακών αποκρίσεων έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών στην πιθανή αντικαρκινική δράση του μορίου (πίν. 3).

Οι πρώτες *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα διενεργήθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Η ομάδα του Baxevanis, μελετώντας την επίδραση της χορήγησης προΤα σε DBA/2 ποντίκια που είχαν ενοφθαλμιστεί με συγγενικά λευχαιμικά κύτταρα L1210, παρατήρησαν ότι η προΤα

Πίνακας 3. Η προθυμοσίνη α στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Τύπος καρκίνου <i>in vitro</i> (ανθρώπινα κύτταρα)	Συνέργεια με	Επίδραση	Βιβλιογραφική παραπομπή
Διάφοροι όγκοι	–	Αποκατάσταση CML και NK δραστικότητας, αύξηση παραγωγής IL-2, ελάττωση παραγωγής PGE2	72, 79
Μαστού	IL-2	Αύξηση πολλαπλασιασμού CD4+ T λεμφοκυττάρων, ανάπτυξη ογκοειδικών CTLs	78, 81, 87
	Αντι-CD3	Βελτίωση NK και T κυτταροτοξικότητας	
	–	Αύξηση φαγοκυττάρωσης, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	
Μελάνωμα	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	73, 74, 81
	±IFN-γ	Ενίσχυση κυτταροτοξικότητας	
	IL-2	Αποκατάσταση LAK δραστικότητας	
Παχέος εντέρου	±fMLP	Αύξηση χημειοταξίας, οξειδωτικών αποκρίσεων και κυτταροτοξικότητας PMNs	75–77, 81
	±IFN-γ	Ελάττωση παραγωγής TGF-β και PGE2, αύξηση παραγωγής IL-1β και TNF-α από μονοκύτταρα, αύξηση της επαγόμενης από μονοκύτταρα κυτταροτοξικότητας	
	IL-2	Ενίσχυση LAK δραστικότητας, αύξηση έκφρασης επιφανειακών μορίων ενεργοποίησης σε NK, NKT και T-λεμφοκύτταρα	
Πνεύμονα	Αντι-CD3	Βελτίωση κυτταροτοξικότητας	78
Ωοθηκών	IL-2	Βελτίωση NK και T κυτταροτοξικότητας	88
	Αντι-CD3	Βελτίωση κυτταροτοξικότητας	78
<i>In vivo</i> (ποντίκια)			
Λευχαιμία	–	Επιμήκυνση επιβίωσης, ενίσχυση NK και επαγωγή LAK δραστικότητας σε λεμφοκύτταρα, αύξηση παραγωγής TNF-α, επαγωγή ογκολυτικής δραστικότητας από περιτοναϊκά κύτταρα, έκπτυξη ογκοειδικών T-λεμφοκυττάρων	69–71

παρεμπόδιζε την εξέλιξη της δημιουργίας ασκίτη, επιμηκύνοντας την επιβίωση των ζώων από 8–12 ημέρες στις 70 ημέρες, σε ποσοστό 40–60%. Τα περιτοναϊκά μακροφάγα των ποντικών που έλαβαν θεραπευτικά προΤα παρήγαγαν 6–7 φορές υψηλότερα επίπεδα TNF-α, ενώ παράλληλα ήταν έντονα κυτταροτοξικά έναντι πολλών καρκινικών σειρών.⁶⁹ Περαιτέρω πειράματα στο ίδιο μοντέλο αποκάλυψαν την ικανότητα της προΤα να ενισχύει τη δράση των NK κυττάρων και να ενεργοποιεί LAK κύτταρα και *in vivo*. Συγκεκριμένα, ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί προΤα, παρήγαγαν υψηλότερες συγκεντρώσεις TNF-α και IL-2 και είχαν αυξημένα ποσοστά ενεργοποιημένων και ισχυρά κυτταροτοξικών NK και T κυττάρων.⁷⁰ Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη χορήγηση προΤα και λευχαιμικών κυττάρων στα ποντίκια προκαλούσε την παραγωγή και ογκοειδικών T κυτταροτοξικών κυττάρων (CTLs), τα οποία στόχευαν και έλυαν ειδικά τα λευχαιμικά κύτταρα. Τα ζώα αυτά συνεπώς ανέπτυσσαν αφ' ενός μη περιορισμένη από τα MHC μόρια (NK και LAK) και αφ' ετέρου περιορισμένη από τα MHC μόρια (CTLs) κυτταροτοξικότητα, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν για μεγαλύτερο διάστημα.⁷¹

Στη συνέχεια, η μελέτη της δράσης της προΤα εστιάστηκε στον άνθρωπο. Δεδομένου ότι τα λεμφοκύτταρα των καρκινοπαθών παρουσιάζουν μειωμένη κυτταροτοξική

δράση και χαμηλή παραγωγή κυτταροκινών, αρχικά ελέγχθηκε *in vitro* η ικανότητα της προΤα να επαναφέρει τις εν λόγω ανεπαρκείς αποκρίσεις στα φυσιολογικά επίπεδα. Πράγματι, η προΤα ενίσχυσε την κυτταροτοξική αντίδραση (CML) και τη δραστικότητα των NK κυττάρων, οι οποίες λόγω της νόσου είναι ιδιαίτερα χαμηλές σε ασθενείς με προχωρημένες κακοήθειες. Το φαινόμενο αυτό σχετίστηκε με τη μείωση της παραγωγής της ανοσοκατασταλτικής προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και την αύξηση της παραγωγής της ανοσοενισχυτικής IL-2 από τα λεμφοκύτταρα των καρκινοπαθών παρουσία προΤα, υποδεικνύοντας ότι το πολυπεπτίδιο είναι ικανό να αποκαθιστά, μερικώς ή και πλήρως, τις ανοσοανεπάρκειες που προκαλούνται από τον καρκίνο.⁷²

Ειδικότερα, σε μονοκύτταρα ασθενών με μελάνωμα, η προΤα αποκατέστησε μερικώς τη λειτουργικότητά τους *in vitro*,⁷³ καθώς και τη LAK κυτταροτοξικότητα και την έκκριση IL-2 από τα λεμφοκύτταρα.⁷⁴ Η συγκεκριμένη αποκατάσταση όμως εξαρτιόταν από το στάδιο της νόσου, αφού κύτταρα ασθενών με μελάνωμα σε πρώιμα στάδια ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη θεραπεία με προΤα. Αντίστοιχα, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, η προΤα ενίσχυσε την κυτταροτοξικότητα των NK και LAK κυττάρων μόνο στα αρχικά στάδια της νόσου,^{75,76} αύξησε την παραγωγή και

την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1β και TNF-α),^{76,77} ενώ μείωσε τις συγκεντρώσεις του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β (TGF-β) και της PGE2 από τα μονοκύτταρα. Συνολικά, οι σχετικές μελέτες έδειξαν ότι το πολυπεπτίδιο μπορεί αποτελεσματικά να αναστρέφει την ήπια βαθμού ανοσοκαταστολή που επάγεται από καρκινικούς όγκους.

Ως προς το μηχανισμό επαγωγής αυξημένης κυτταροτοξικότητας από τα CTLs, NK και LAK κύτταρα παρουσία προΤα, φάνηκε ότι οφείλεται (α) στην αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών (IL-1β, IL-2, TNF-α), (β) στην αυξημένη έκφραση επιφανειακών μορίων προσκόλλησης και (γ) στην αύξηση των επιπέδων περφορίνης.^{77,78}

Μια σημαντική μελέτη που οδήγησε στη διαλεύκανση του τρόπου δράσης της προΤα είναι αυτή των Voutsas et al.⁷⁹ Καλλιερρώντας λεμφοκύτταρα καρκινοπαθών με αυτόλογα κύτταρα όγκου *in vitro*, δείχθηκε ότι η συνεργιστική παρουσία προΤα και IL-2 αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των CD4+ T-κυττάρων και την παραγωγή έντονα κυτταροτοξικών ογκοειδικών CTLs. Η ανάπτυξη όμως των συγκεκριμένων CTLs απαιτούσε την ταυτόχρονη παρουσία στην ίδια καλλιέργεια και CD4+ T-κυττάρων και μονοκυττάρων. Η απουσία ενός από τους δύο υποπληθυσμούς ή η απουσία αντιγόνου οδηγούσε σε μείωση τόσο του ρυθμού πολλαπλασιασμού όσο και της κυτταροτοξικής δράσης των T-κυττάρων. Συνεπώς, για να εκδηλωθεί η ευεργετική επίδραση της προΤα απαιτείται η παρουσία τόσο των βοηθητικών T-κυττάρων όσο και των αντιγονοπαρουσιαστικών μονοκυττάρων.⁷⁹

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η ομάδα μας διερεύνησε τις ενδοκυτταρικές αλλαγές που επάγονται σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος μετά από διέγερσή τους με προΤα για 3 ημέρες. Αναλύοντας, με τη μέθοδο της πρωτεομικής, τις πρωτεΐνες από μονοκύτταρα φυσιολογικών δοτών και καρκινοπαθών, σκιαγραφήθηκε για πρώτη φορά το μοντέλο δράσης της προΤα. Συγκεκριμένα, η προΤα αρχικά διεγείρει τα μονοκύτταρα μέσω πρόσδεσής της σε TLRs. Τα μονοκύτταρα υπερεκφράζουν μόρια MHC τάξης II στην επιφάνειά τους, ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση και τη σύναψή τους με τα T-λεμφοκύτταρα και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1). Τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα παράγουν IL-2 και πολλαπλασιάζονται έντονα, εκφράζουν υψηλά επίπεδα μορίων προσκόλλησης (CD2) και ενδοκυτταρικών κυτταρολυτικών μορίων (περφορίνη), με αποτέλεσμα τη γενικότερη ενίσχυση της κυτταροτοξικής τους δράσης.⁸⁰ Τα εν λόγω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν αργότερα από τους Mosoian et al, που έδειξαν ότι πράγματι η προΤα σηματοδοτεί μέσω του TLR4 σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας.⁴⁵

TLR4 εκφράζει και ο πολυπληθέςτερος υποπληθυσμός λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, τα πολυμορφοπύρνα (PMNs). Έτσι, εξετάστηκε η ικανότητα της προΤα να ενισχύει και τις ιδιότητες των PMNs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προΤα διεγείρει τη χημειοταξία και τις οξειδωτικές αποκρίσεις PMNs από υγιείς δότες και ασθενείς με μελάνωμα, καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού, καθώς και την ικανότητά τους να ασκούν κυτταροτοξική δράση.⁸¹ Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες δράσεις της προΤα, υποδεικνύουν ότι το πολυπεπτίδιο δρα πλειοτροπικά και είναι ικανό να βελτιώνει ορισμένες λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, υπό συνθήκες ανοσοκαταστολής.

Παρόλες όμως τις εκτεταμένες ερευνητικές εργασίες αναφορικά με τους μηχανισμούς δράσης της προΤα ως ανοσοθεραπευτικό μόριο, το πολυπεπτίδιο δεν έχει ακόμη χρησιμοποιηθεί σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας ασθενών με καρκίνο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μοριακός μηχανισμός της εξωκυτταρικής δράσης της προΤα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Επί πλέον, η σύνθεση του πολυπεπτιδίου και η απομόνωσή του δεν είναι ιδιαίτερα εύκολες.⁸² Τέλος, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι διαφορετικές περιοχές του μορίου επιδεικνύουν διαφορετική λειτουργία.⁸³ Η ομάδα μας έδειξε ότι το δεκαπεπτίδιο προΤα(100–109) (με αμινοξική αλληλουχία TKKQKTDEDD) είναι υπεύθυνο για την ανοσοτροποποιητική της δράση.⁸⁴ Το προΤα(100–109) επάγει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων και την ωρίμανση δένδριτικών κυττάρων, αποκτά διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου και η δραστηριότητά του είναι ειδική για την αλληλουχία του και συγκρίσιμη με αυτή του ακέραιου πολυπεπτιδίου. Σήμερα, είναι γνωστή η παραγωγή του και *in vivo*, μέσω θραύσης της προΤα από τις ενεργοποιημένες κασπάσες κατά την απόπτωση.^{85,86}

Σε πρόσφατη έρευνα των Samara et al δείχθηκε ότι και το προΤα(100–109) ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα, κυρίως ασθενών με καρκίνο του μαστού.⁸⁷ Συγκεκριμένα, ουδετερόφιλα περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού, μετά από διέγερση με προΤα(100–109), παρουσίασαν αύξηση της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας και της παραγωγής και απελευθέρωσης ενεργών ριζών οξυγόνου, αλλά και ενισχυμένη κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων.

Στην επίσης πρόσφατη έρευνα των Voutsas et al μελετήθηκε η επίδραση της προΤα και του προΤα(100–109) σε λεμφοκύτταρα από ασκίτικο υγρό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (TALs). Τα TALs εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα εξ αιτίας της ενδογενούς ανοσοκαταστολής που υφίστανται στο περιβάλλον του ασκίτη, ενώ όταν καλλιεργήθηκαν *in*

vitro με προΤα ή προΤα(100–109) παρουσίασαν βελτιωμένη κυτταροτοξική δράση έναντι και των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Αντίστοιχα ενεργοποιημένα TALs χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID), τα οποία είχαν ενοφθαλμιστεί με καρκινικά κύτταρα από την ίδια ασθενή. Αποτέλεσμα ήταν η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων και η επιμήκυνση της επιβίωσης των ποντικών,⁸⁸ υποδεικνύοντας την ικανότητα της προΤα και του προΤα(100–109) να επάγουν ανοσοενισχυτική δράση και *in vivo*.

Πρόσφατα πειράματα του εργαστηρίου μας έδειξαν για πρώτη φορά ότι η προΤα και το προΤα(100–109), ακόμη και σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις (10 μg/mL), δεν προκαλούν την άμεση λύση καρκινικών κυττάρων μαστού, εντέρου, ωοθηκών, ενδομητρίου, μελανώματος, καθώς και λευχαιμικών, αλλά ούτε και φυσιολογικών κυττάρων. Συνεπώς, πράγματι, τόσο η προΤα όσο και το προΤα(100–109) δρουν μέσω ανοσοεπαγωγικών μηχανισμών, χωρίς παράλληλα να επάγουν τοξικές ανεπιθύμητες ενέργειες και να καταστρέφουν τα φυσιολογικά κύτταρα (αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, παρουσιάζει πλέον ιδιαίτερο ενδιαφέρον η δοκιμή της δραστηριότητας της προΤα και του προΤα(100–109) στον άνθρωπο. Δυστυχώς μέχρι σήμερα, η μοναδική α-θυμοσίνη που έχει δοκιμαστεί κλινικά είναι η Τα1, παρ' όλο που τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών δεν υποστηρίζουν την ευρύτερη χρήση της. Ενδεικτικά, παρατίθενται μερικές από τις κλινικές δοκιμές με την Τα1, για ιστορικούς λόγους, αλλά περισσότερο ως πρότυπα μελλοντικής χρήσης της προΤα και του προΤα(100–109) ως ανοσοενισχυτικών μορίων σε ασθενείς με καρκίνο.

6. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗ ΘΥΜΟΣΙΝΗ α1

Η πρώτη μελέτη στον άνθρωπο εκπονήθηκε το 1985 από τους Goldstein et al σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία, η χορήγηση Τα1 για 14 ημέρες αποκατέστησε τον αριθμό και τη λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων, μείωσε τα περιστατικά υποτροπής και αύξησε τα ποσοστά επιβίωσης, κυρίως ασθενών με μικρότερου μεγέθους όγκους.⁸⁹ Το 1994, σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα, χορηγήθηκε Τα1 μαζί με δακαρβαζίνη (DTIC) και IL-2 και αναφέρθηκε πλήρης απόκριση σε δύο ασθενείς και σταθεροποίηση της νόσου σε άλλους 5 ασθενείς.⁹⁰ Σε κλινική μελέτη φάσης II σε ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ο συνδυασμός Τα1 με *cis*-διαμινοδιχλωρολευκόχρυσο (DDP), ετοποσίδη (VP-16) και

χαμηλή δόση IFN-α-2α οδήγησε στην πλήρη απόκριση δύο και στη μερική απόκριση άλλων 22 ασθενών, ενώ η μέση επιβίωσή τους επιμηκύνθηκε σε 12,6 μήνες.⁹¹ Αντίστοιχα, ο συνδυασμός Τα1 με DTIC και χαμηλή δόση IFN-α ενίσχυσε τις ανοσοαπαντήσεις και αύξησε τη μέση επιβίωση ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα κατά 11,5 μήνες.⁹² Συνολικά, η Τα1, αν και βελτίωσε τον αριθμό και τη λειτουργικότητα ορισμένων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, τελικά δεν επιμήκυνε σημαντικά το χρόνο ζωής των ασθενών. Έτσι, το 2010, οι Maio et al δοκίμασαν κλινικά την Τα1 σε μεγάλο αριθμό ασθενών (n=488) με μεταστατικό μελάνωμα σταδίου IV.⁹³ Στην αξιολόγηση της εν λόγω μελέτης φάνηκε ότι η χορήγηση Τα1 δεν συνοδεύτηκε από τοξικότητα ή ανεπιθύμητες ενέργειες, ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας με DTIC, επιμήκυνε τη μέση επιβίωση από 6,6 στους 9,4 μήνες και αύξησε την ελεύθερη νόσου επιβίωση (PFS) κατά 12%.⁹³ Τέλος, σε επίσης πρόσφατη τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή, οι Gish et al χορήγησαν Τα1 για 6 μήνες σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που είχαν υποβληθεί σε ενδοαρτηριακό χημειοεμβολισμό (TACE). Αποτέλεσμα ήταν η πλήρης προστασία τους από βακτηριακές λοιμώξεις και η αύξηση του μέσου χρόνου επιβίωσής τους σε >13 μήνες.⁹⁴

Σύμφωνα με τις προαναφερθείσες κλινικές δοκιμές, η Τα1 θα μπορούσε να χορηγηθεί με ασφάλεια σε ποσότητα μέχρι και 6,4 mg, χωρίς τοξικότητα και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες και να συνδυαστεί με πρωτόκολλα χημειοθεραπείας. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη σαφείς ενδείξεις που να υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης της σε καρκινοπαθείς, αν και μερικοί ασθενείς υπό χημειοθεραπεία θα μπορούσαν πιθανόν να ωφεληθούν από τη χορήγησή της, μέσω ελάττωσης της πιθανότητας εμφάνισης λοιμώξεων ή και επιπλοκών.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα τα παραπάνω ερευνητικά αποτελέσματα που αφορούν στην προΤα και στο ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο οδήγησαν στις παρακάτω παρατηρήσεις: (α) τα επίπεδα της προΤα, κυρίως στους καρκινικούς ιστούς αλλά και σε βιολογικά υγρά, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως βιολογικός δείκτης για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της πορείας του καρκίνου, (β) η αναστολή της ενδοκυτταρικής δράσης της προΤα, μέσω στόχευσής της από ειδικούς αναστολείς, θα μπορούσε να συμβάλλει στην αντικαρκινική θεραπεία, μειώνοντας την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και επάγοντας την απόπτωσή τους, (γ) η υπό προϋποθέσεις χορήγηση της προΤα ή του προΤα(100–109) δυναμικά αυξάνει τη δραστηριότητα των ογκοειδικών ανοσοκυττά-

ρων, (δ) η προΤα ή το προΤα(100–109) ενδεχομένως θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή και ακτινοβολία, ως ανοσοενισχυτικά μόρια, (ε) η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων προΤα σε ζώα δεν φαίνεται να προκαλεί τοξικότητα και σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, γεγονός που καθιστά αισιόδοξη την προοπτική χορήγησής της και σε ασθενείς και (στ) η προΤα, όπως και το ανοσοδραστικό της δεκαπεπτίδιο, δρώντας ως αγωνιστές των TLRs σε κύτταρα της φυσικής ανοσίας, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ανοσοενισχυτικά, με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών εμβολίων.

Τελικά, μετά από πολλά χρόνια έρευνας, η αρχική

ιδέα ότι η προΤα ή κάποιο τμήμα της θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν προγνωστικά, ως βιοδείκτες, αλλά και θεραπευτικά, ως ανοσοενισχυτικά φάρμακα, παραμένει πολλά υποσχόμενη. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του καρκίνου, η θεραπευτική χορήγηση της προΤα ή του προΤα(100–109) σε ασθενείς και η προοπτική συνδυασμού τους με άλλους ανοσορρυθμιστικούς ή χημειοθεραπευτικούς παράγοντες φαίνεται να εξασφαλίζει (α) την ικανοποιητική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, άρα και την προστασία τους από παθογόνα και (β) την ειδική στόχευση των καρκινικών κυττάρων από ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, συμβάλλοντας στην ύφεση της νόσου και στην παράταση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο.

ABSTRACT

Prothymosin α as a cancer biomarker and immunotherapeutic tool

N. KAPPA, E. WILLIAMS, K. IOANNOU, P. SAMARA, O. TSITSILONIS

Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(4):406–419

The thymus gland, as a primary lymphoid organ, plays a crucial role in the normal development and appropriate functioning of the immune system, contributing to the maturation and differentiation of T lymphocytes. The first biologically active extract isolated from the thymus was named thymosin fraction V (TFV). The fractionation of TFV led to the isolation of a series of immunoreactive polypeptides, termed thymosins, the most important and well-studied of which are thymosin α1 (Ta1) and its precursor molecule, prothymosin α (proTa). Although the precise molecular mechanism of action of these polypeptides has not yet been fully elucidated, it is thought that they have a potential use in medical practice, both as cancer biomarkers and as immunotherapeutic agents for the treatment of cancer patients. ProTa is ubiquitously expressed in all tissues and plays a dual role; intracellularly, it participates in the regulation of the cell cycle, while extracellularly it acts as an immunomodulator. This review focuses on proTa and the data accumulated to date with respect to its role in cancer, and specifically its potential clinical utility, both as a biomarker for cancer prognosis and monitoring, and as an immunotherapeutic tool for the activation of immune responses against tumor cells. Based on the results derived from clinical trials of Ta1 in patients with cancer, the eventual use of proTa in similar studies in humans is discussed, aiming at the enhancement of the functions of the immune system and, ultimately, at cancer regression.

Key words: Cancer biomarker, Cancer immunotherapy, Immunoactive peptide, Prothymosin α

Βιβλιογραφία

- GOOD RA, DALMASSO AP, MARTINEZ C, ARCHER OK, PIERCE JC, PAPERMASTER BW. The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J Exp Med* 1962, 116:773–796
- MILLER JF. Role of the thymus in immunity. *Br Med J* 1963, 2:459–464
- BERTHIAUME F, APARICIO CL, EUNG DAMRONG J, YARMUSH ML. Age- and disease-related decline in immune function: an opportunity for “thymus-boosting” therapies. *Tissue Eng* 1999, 5:499–514
- SCHULOF RS. Thymic peptide hormones: Basic properties and clinical applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1985, 3:309–376
- ROBERTS S, WHITE A. Studies on the origin of serum proteins. *J Biol Chem* 1949, 180:505–516
- KLEIN JJ, GOLDSTEIN AL, WHITE A. Enhancement of *in vivo* incorporation of labeled precursors into DNA and total protein of mouse lymph nodes after administration of thymic extracts.

- Proc Natl Acad Sci USA* 1965, 53:812–817
7. GOLDSTEIN AL, SLATER FD, WHITE A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci USA* 1966, 56:1010–1017
 8. HOOPER JA, McDANIEL MC, THURMAN GB, COHEN GH, SCHULOF RS, GOLDSTEIN AL. Purification and properties of bovine thymosin. *Ann N Y Acad Sci* 1975, 249:125–144
 9. SPANGELO BL, HALL NR, GOLDSTEIN AL. Biology and chemistry of thymosin peptides. Modulators of immunity and neuroendocrine circuits. *Ann N Y Acad Sci* 1987, 496:196–204
 10. WARA DW, AMMANN AJ. Activation of T-cells rosettes in immunodeficient patients by thymosin. *Ann N Y Acad Sci* 1975, 249:308–315
 11. DAUPHINEE MJ, TALAL N, GOLDSTEIN AL, WHITE A. Thymosin corrects the abnormal DNA synthetic response of NZB mouse thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974, 71:2637–2641
 12. SPANGELO BL, FARRIMOND DD, POMPILIUS M, BOWMAN KL. Interleukin-1 beta and thymic peptide regulation of pituitary and glial cell cytokine expression and cellular proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 917:597–607
 13. HO AD, MA DD, PRICE G, HUNSTEIN W, HOFFBRAND AV. Biochemical and immunological differentiation of human thymocytes induced by thymic hormones. *Immunology* 1983, 50:471–476
 14. SPANGELO BL, ROACH JD, HADI F, DAMAVANDY AA, PLIESKATT J, BADAMCHIAN M. Thymosin fraction-5 possesses antiproliferative properties in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: Characterization of an active peptide. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1112:305–316
 15. KHAW BA, RULE AH. Immunotherapy of the Dunning leukemia with thymic extracts. *Br J Cancer* 1973, 28:288–292
 16. PETRO TM, WATSON RR. Resistance to L1210 mouse leukemia cells in moderately protein-malnourished BALB/c mice treated *in vivo* with thymosin fraction V. *Cancer Res* 1982, 42:2139–2145
 17. GOLDSTEIN AL. History of the discovery of the thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1112:1–13
 18. HARITOS AA, GOODALL GJ, HORECKER BL. Prothymosin alpha: Isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:1008–1011
 19. SZABO P, PANNEERSELVAM C, CLINTON M, FRANGOU-LAZARIDIS M, WEKSLER D, WHITTINGTON E ET AL. Prothymosin alpha gene in humans: Organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 1993, 90:629–634
 20. LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, McGETTIGAN PA, McWILLIAM H ET AL. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, 23:2947–2948
 21. HARITOS AA. Alpha-thymosins: Relationships in structure, distribution, and function. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1987, 14:123–152
 22. ESCHENFELDT WH, BERGER SL. The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: Evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:9403–9407
 23. PIÑEIRO A, CORDERO OJ, NOGUEIRA M. Fifteen years of prothymosin alpha: Contradictory past and new horizons. *Peptides* 2000, 21:1433–1446
 24. PAVLOV NA, CHERNY DI, HEIM G, JOVIN TM, SUBRAMANIAM V. Amyloid fibrils from the mammalian protein prothymosin alpha. *FEBS Lett* 2002, 517:37–40
 25. MANROW RE, SBURLATI AR, HANOVER JA, BERGER SL. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem* 1991, 266:3916–3924
 26. BUTLER GS, OVERALL CM. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8:935–948
 27. JOLY AL, WETTSTEIN G, MIGNOT G, GHIRINGHELLI F, GARRIDO C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010, 2:238–247
 28. AGUILERA R, SAFFIE C, TITTARELLI A, GONZÁLEZ FE, RAMÍREZ M, REYES D ET AL. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2011, 17:2474–2483
 29. PAPAMARCAKI T, TSOLAS O. Prothymosin alpha binds to histone H1 *in vitro*. *FEBS Lett* 1994, 345:71–75
 30. EILERS M, SCHIRM S, BISHOP JM. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 1991, 10:133–141
 31. PÉREZ-ESTÉVEZ A, DÍAZ-JULLIEN C, COVELO G, SALGUEIRO MT, FREIRE M. A 180-kDa protein kinase seems to be responsible for the phosphorylation of prothymosin alpha observed in proliferating cells. *J Biol Chem* 1997, 272:10506–10513
 32. KARETSOU Z, KRETISOVALI A, MURPHY C, TSOLAS O, PAPAMARCAKI T. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep* 2002, 3:361–366
 33. SUBRAMANIAN C, HASAN S, ROWE M, HOTTIGER M, ORRE R, ROBERTSON ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol* 2002, 76:4699–4708
 34. JIANG X, KIM HE, SHU H, ZHAO Y, ZHANG H, KOFRON J ET AL. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 2003, 299:223–226
 35. QI X, WANG L, DU F. Novel small molecules relieve prothymosin alpha-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 2010, 49:1923–1930
 36. KARAPETIAN RN, EVSTAFIEVA AG, ABAEVA IS, CHICHKOVA NV, FILONOV GS, RUBTSOV YP ET AL. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: Implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 2005, 25:1089–1099
 37. NITURE SK, JAISWAL AK. Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* 2009, 284:13856–13868
 38. SKOPELITI M, VOUTSAS IF, KLIMENTZOU P, TSIATAS ML, BECK A, BAMIAS A ET AL. The immunologically active site of prothymosin alpha is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its *in vitro* effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1247–1257
 39. PAN LX, HARITOS AA, WIDEMAN J, KOMIYAMA T, CHANG M, STEIN S ET AL. Human prothymosin alpha: Amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986, 250:197–201
 40. BAXEVANIS CN, FRILLINGOS S, SEFERIADIS K, RECLOS GJ, ARSENIS P, KATSIYIANNIS A ET AL. Enhancement of human T lymphocyte function by prothymosin alpha: Increased production

- of interleukin-2 and expression of interleukin-2 receptors in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1990, 12:595–617
41. BAXEVANIS CN, THANOS D, RECLOS GJ, ANASTASOPOULOS E, TSOKOS GC, PAPAMATHEAKIS J ET AL. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J Immunol* 1992, 148:1979–1984
 42. CORDERO OJ, SARANDESES CS, LÓPEZ JL, NOGUEIRA M. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: Role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 1992, 11:277–285
 43. LÓPEZ-RODRÍGUEZ JL, CORDERO OJ, SARANDESES C, VIÑUELA J, NOGUEIRA M. Interleukin-2 killer cells: *In vitro* evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1994, 13:175–182
 44. SALGADO FJ, PIÑEIRO A, CANDA-SÁNCHEZ A, LOJO J, NOGUEIRA M. Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol Membr Biol* 2005, 22:163–176
 45. MOSOIAN A, TEIXEIRA A, BURNS CS, SANDER LE, GUSELLA GL, HE C ET AL. Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:10178–10183
 46. LEYS CM, NOMURA S, LaFLEUR BJ, FERRONE S, KAMINISHI M, MONTGOMERY E ET AL. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery* 2007, 141:41–50
 47. KLIMENTZOU P, DROUGOU A, FEHRENBACHER B, SCHALLER M, VOELTER W, BARBATIS C ET AL. Immunocytological and preliminary immunohistochemical studies of prothymosin alpha, a human cancer-associated polypeptide, with a well-characterized monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 2008, 56:1023–1031
 48. MORI M, BARNARD GF, STANIUNAS RJ, JESSUP JM, STEELE GD Jr, CHEN LB. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene* 1993, 8:2821–2826
 49. WU C, HABIB N, MITRY R, REITSMA P, VANDEVENTER S, CHAMULEAU R. Increased hepatic ferritin-H messenger RNA levels correlate with those of c-myc in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1997, 11:187–192
 50. SASAKI H, SATO Y, KONDO S, FUKAI I, KIRIYAMA M, YAMAKAWA Y ET AL. Expression of the prothymosin alpha mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001, 168:191–195
 51. SASAKI H, NONAKA M, FUJII Y, YAMAKAWA Y, FUKAI I, KIRIYAMA M ET AL. Expression of the prothymosin-a gene as a prognostic factor in lung cancer. *Surg Today* 2001, 31:936–938
 52. CAREY KA, SEGAL D, KLEIN R, SANIGORSKI A, WALDER K, COLLIER GR ET AL. Identification of novel genes expressed during rhabdomyosarcoma differentiation using cDNA microarrays. *Pathol Int* 2006, 56:246–255
 53. LETSAS KP, VARTHOLOMATOS G, TSEPI C, TSATSOU LIS A, FRANGOU-LAZARIDIS M. Fine-needle aspiration biopsy-RT-PCR expression analysis of prothymosin alpha and parathymosin in thyroid: Novel proliferation markers? *Neoplasia* 2007, 54:57–62
 54. OJIMA E, INOUE Y, MIKI C, MORI M, KUSUNOKI M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *J Gastroenterol* 2007, 42:730–736
 55. TSITSILONI OE, STIAKAKIS J, KOUTSELINIS A, GOGAS J, MARKOPOULOS C, YIALOURIS P ET AL. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:9504–9507
 56. DOMINGUEZ F, MAGDALENA C, CANCIO E, ROSON E, PAREDES J, LOIDI L ET AL. Tissue concentrations of prothymosin alpha: A novel proliferation index of primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1993, 29A:893–897
 57. TSITSILONIS OE, BEKRIS E, VOUTSAS IF, BAXEVANIS CN, MARKOPOULOS C, PAPADOPOULOU SA ET AL. The prognostic value of alpha-thymosins in breast cancer. *Anticancer Res* 1998, 18:1501–1508
 58. MAGDALENA C, DOMINGUEZ F, LOIDI L, PUENTE JL. Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer* 2000, 82:584–590
 59. SUZUKI S, TAKAHASHI S, TAKAHASHI S, TAKESHITA K, HIKOSAKA A, WAKITA T ET AL. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate* 2006, 66:463–469
 60. TSAI YS, JOU YC, LEE GF, CHEN YC, SHIAU AL, TSAI HT ET AL. Aberrant prothymosin-alpha expression in human bladder cancer. *Urology* 2009, 73:188–192
 61. JOU YC, TUNG CL, TSAI YS, SHEN CH, SYUE-YI C, SHIAU AL ET AL. Prognostic relevance of prothymosin-alpha expression in human upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2009, 74:951–957
 62. FRAGA M, GARCÍA-CABALLERO T, DOMÍNGUEZ F, PÉREZ-BECERRA E, BEIRAS A, FORTEZA J. Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993, 423:449–452
 63. PAWLIKOWSKI M, WINCZYK K. Immunohistochemical detection of prothymosin alpha in pituitary adenomas – a new marker of tumor recurrence? *Folia Histochem Cytobiol* 2009, 47:559–562
 64. TRIPATHI SC, MATTA A, KAUR J, GRIGULL J, CHAUHAN SS, THAKAR A ET AL. Overexpression of prothymosin alpha predicts poor disease outcome in head and neck cancer. *PLoS One* 2011, 6:e19213
 65. PANNEERSELVAM C, HARITOS AA, CALDARELLA J, HORECKER BL. Prothymosin alpha in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:4465–4469
 66. COSTOPOULOU D, LEONDIADIS L, CZARNECKI J, FERDERIGOS N, ITHAKISSIOS DS, LIVANIOU E ET AL. Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J Immunoassay* 1998, 19:295–316
 67. KASHAT L, SO AK, MASUI O, WANG XS, CAO J, MENG X ET AL. Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res* 2010, 9:5757–5769
 68. TZAI TS, TSAI YS, SHIAU AL, WU CL, SHIEH GS, TSAI HT. Urine prothymosin-alpha as novel tumor marker for detection and follow-up of bladder cancer. *Urology* 2006, 67:294–299
 69. PAPANASTASIOU M, BAXEVANIS CN, PAPAMICHAIL M. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment: I. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1992, 35:145–150
 70. BAXEVANIS CN, GRITZAPIS AD, DEDOISSIS GV, PAPADOPOULOS NG, TSOLAS O, PAPAMICHAIL M. Induction of lymphokine-ac-

- tivated killer activity in mice by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1994, 38:281–286
71. BAXEVANIS CN, GRITZAPIS AD, SPANAKOS G, TSITSILONIS OE, PAMICHAIL M. Induction of tumor-specific T lymphocyte responses *in vivo* by prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1995, 40:410–418
 72. BAXEVANIS CN, RECLOS GJ, PAMICHAIL M. Prothymosin alpha restores depressed allogeneic cell-mediated lympholysis and natural-killer-cell activity in patients with cancer. *Int J Cancer* 1993, 53:264–268
 73. GARBIN F, ECKERT K, BÜTTNER P, GARBE C, MAURER HR. Prothymosin alpha augments deficient antitumor activity of monocytes from melanoma patients *in vitro*. *Anticancer Res* 1994, 14:2405–2411
 74. ECKERT K, GARBIN F, MAURER HR, BÜTTNER P, GARBE C, CZARNECKI J. Prothymosin alpha 1 modulates lymphokine-activated killer cell activity and IL-2 production by peripheral blood lymphocytes from melanoma patients *in vitro*. *Int J Immunopharmacol* 1995, 17:555–561
 75. ECKERT K, GRÜNBERG E, IMMENSCHUH P, GARBIN F, KREUSER ED, MAURER HR. Interleukin-2-activated killer cell activity in colorectal tumor patients: Evaluation of *in vitro* effects by prothymosin alpha 1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997, 123:420–428
 76. ECKERT K, GRÜNBERG E, GARBIN F, MAURER HR. Preclinical studies with prothymosin alpha 1 on mononuclear cells from tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997, 19:493–500
 77. GARBIN F, ECKERT K, IMMENSCHUH P, KREUSER ED, MAURER HR. Prothymosin alpha 1 effects, *in vitro*, on the antitumor activity and cytokine production of blood monocytes from colorectal tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997, 19:323–332
 78. BAXEVANIS CN, SPANAKOS G, VOUSAS IF, GRITZAPIS AD, TSITSILONIS OE, MAMALAKI A ET AL. Increased generation of autologous tumor-reactive lymphocytes by anti-CD3 monoclonal antibody and prothymosin alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1999, 48:71–84
 79. VOUSAS IF, BAXEVANIS CN, GRITZAPIS AD, MISSITZIS I, STATHOPOULOS GP, ARCHODAKIS G ET AL. Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha for the increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2000, 49:449–458
 80. SKOPELITI M, KRATZER U, ALTENBEREND F, PANAYOTOU G, KALBACHER H, STEVANOVIĆ ET AL. Proteomic exploitation on prothymosin alpha-induced mononuclear cell activation. *Proteomics* 2007, 7:1814–1824
 81. HEIDECHE H, ECKERT K, SCHULZE-FORSTER K, MAURER HR. Prothymosin alpha 1 effects *in vitro* on chemotaxis, cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997, 19:413–420
 82. WILSON CL, MONTEITH WB, DANELL AS, BURNS CS. Purification and characterization of the central segment of prothymosin-alpha: Methodology for handling highly acidic peptides. *J Pept Sci* 2006, 12:721–725
 83. CORDERO OJ. Data on the interaction between prothymosin alpha and TLR4 may help to the design of new antiviral compounds. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011, 56:e110–e111
 84. SKOPELITI M, ICONOMIDOU VA, DERHOVANESSIAN E, PAWELEC G, VOELTER W, KALBACHER H ET AL. Prothymosin alpha immunoreactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol* 2009, 46:784–792
 85. ENKEMANN SA, WANG RH, TRUMBORE MW, BERGER SL. Functional discontinuities in prothymosin alpha caused by caspase cleavage in apoptotic cells. *J Cell Physiol* 2000, 182:256–268
 86. EVSTAFIEVA AG, BELOV GA, RUBSTOV YP, KALKUM M, JOSEPH B, CHICHKOVA NV ET AL. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res* 2003, 284:211–223
 87. SAMARA P, IOANNOU K, NEAGU M, ARNOGIANNAKI N, ARDAVANIS A, VOELTER W ET AL. The C-terminal decapeptide of prothymosin alpha is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils *in vitro*. *Int Immunopharmacol* 2013, 15:50–57
 88. VOUSAS IF, PISTAMALTZIAN N, TSIATAS ML, SKOPELITI M, KATSI-LA T, MAVROTHALASSITI I ET AL. Ovarian malignant ascites-derived lymphocytes stimulated with prothymosin alpha or its immunoreactive decapeptide lyse autologous tumor cells *in vitro* and retard tumour growth in SCID mice. *Eur J Cancer* 2013, 49:1706–1714
 89. SCHULOF RS, LLOYD MJ, CLEARY PA, PALASZYNSKI SR, MAI DA, COX JW Jr ET AL. A randomized trial to evaluate the immunorestorative properties of synthetic thymosin-alpha 1 in patients with lung cancer. *J Biol Response Mod* 1985, 4:147–158
 90. LOPEZ M, CARPANO S, CAVALIERE R, DI LAURO L, AMEGLIO F, VITELLI G ET AL. Biochemotherapy with thymosin alpha 1, interleukin-2 and dacarbazine in patients with metastatic melanoma: Clinical and immunological effects. *Ann Oncol* 1994, 5:741–746
 91. GARACI E, LOPEZ M, BONSIGNORE G, DELLA GIULIA M, D'APRILE M, FAVALLI C ET AL. Sequential chemoimmunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using cisplatin, etoposide, thymosin-alpha 1 and interferon-alpha 2a. *Eur J Cancer* 1995, 31A:2403–2405
 92. RASI G, TERZOLI E, IZZO F, PIERIMARCHI P, RANUZZI M, SINIBALDI-VALLEBONA P ET AL. Combined treatment with thymosin-alpha 1 and low dose interferon-alpha after dacarbazine in advanced melanoma. *Melanoma Res* 2000, 10:189–192
 93. MAIO M, MACKIEWICZ A, TESTORI A, TREFZER U, FERRARESI V, JASSEM J ET AL. Large randomized study of thymosin alpha 1, interferon alpha, or both in combination with dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2010, 28:1780–1787
 94. GISH RG, GORDON SC, NELSON D, RUSTGIV, RIOS I. A randomized controlled trial of thymalfasin plus transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2009, 3:480–489
- Corresponding author:*
- O. Tsitsilonis, Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, NKUA, Panepistimioupolis, GR-157 84 Ilissia, Greece
e-mail: rtsitsil@biol.uoa.gr