

Αντι-hTERT CD8 T-κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα

Ε.Σ. Γραμουσιάνου,¹ Φ. Σούκου,¹ Φ. Καλαλά,¹ Θ. Κερενίδη,² Α. Χέβας,³
Κ. Γουργουλιάνης,² Α.Ε. Γερμενής,¹ Β. Καρανίκας¹

¹Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας

²Πνευμονολογική Κλινική

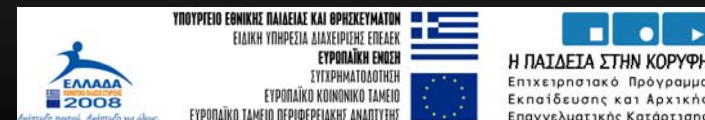
³Θωρακοχειρουργική Κλινική

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

This project is co-funded by the

- The European Union-European Social Fund (75%)
- National Resources-EPEAEK II (25%)



- έναντι πεπτιδίων του οποίου έχουν προσδιοριστεί T- και B-κυτταρικές απαντήσεις
- τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ανεπιτυχώς στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Σκοπός της μελέτης

Η ποσοτική εκτίμηση της αυτόματης CD8 T-κυτταρικής απάντησης
έναντι των πεπτιδίων
VYAETKHF_L, ILAKFLHW_L και RLFFYRKSV
της hTERT
(HLA-A2 ή -A24 παρουσιαζομένων)
στον καρκίνο του πνεύμονα

Ασθενείς / Μάρτυρες (HLA-A2 ή A24)

- 2 ασθενείς με NSCLC
- 5 ασθενείς με SCLC
- 5 φυσιολογικά άτομα

Μεθοδολογία

Σύγχρονη σειρά μικροκαλλιιεργειών (MLPC, mixed lymphocyte peptide culture)
με συγκεκριμένο αριθμό PBMC (>96 φρεάτια - 2×10^5 κύτταρα/φρεάτιο)

Διέγερση με τα πεπτίδια
Πολλαπλασιασμός των πιθανών κλώνων



Σήμανση με HLA-τετραμερή

Προσδιορισμός αριθμού θετικών μικροκαλλιιεργειών



Υπολογισμός αριθμού αντι-hTERT CD8 κυττάρων
επί του συνόλου των κυκλοφορούντων CD8 κυττάρων

Κατανομή σπανίων φαινομένων κατά Poisson
προσαρμοσμένη για την κλωνικότητα κατά Bernouli

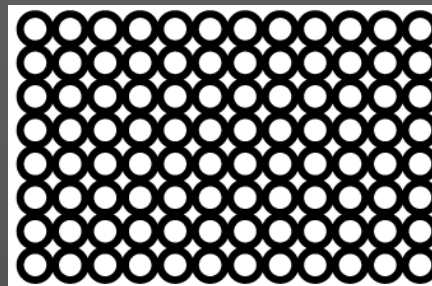
MLPC

ΜΕΡΑ 0

Σύνδεση πεπτιδίων

PBMC + πεπτίδιο 1, 2, 3

60min, 20°C, πλύση, ανάμιξη

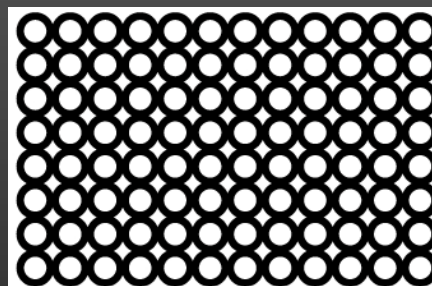


+IL-2, IL-4, IL-7



ΜΕΡΑ 7/8

Επαναδιέγερση με πεπτίδια

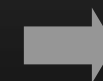
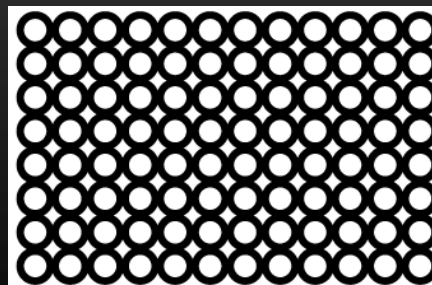


+IL-2, IL-4, IL-7



ΜΕΡΑ 14

Σήμανση με HLA-τετραμερή



ΕΠΑΝΑΔΙΕΓΕΡΣΗ ?

Σήμανση με HLA-τετραμερή

MLPC + Τετραμερές PE* (575 nm)
+ Τετραμερές ελέγχου APC*+ (675 nm)

Επώαση 37°C, 30min



+ CD8-FITC (525 nm)

Επώαση 37°C, 30min



Ανάλυση FC500 (488 + 633/635 nm)

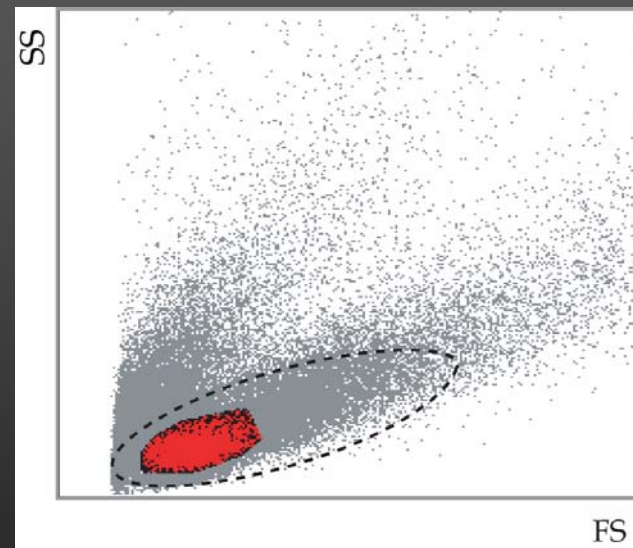
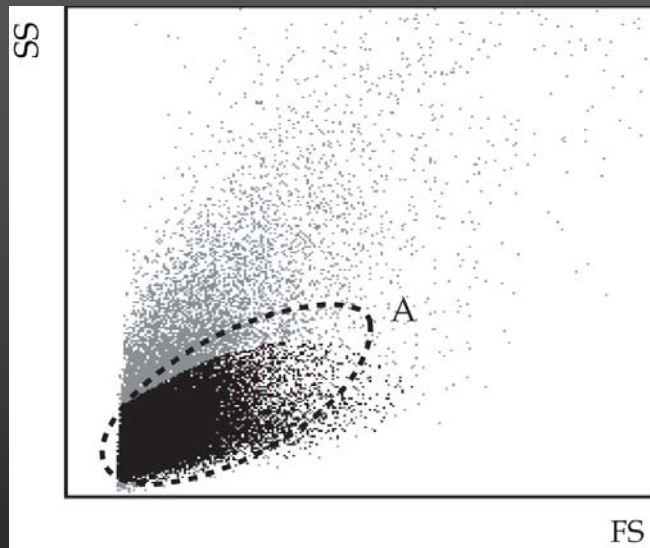
*Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels

+EBV πεπτίδια: BMLF1.A2-APC, GLCTLVAML / EBNA3C.A24-APC, RYSIFFDYM

Κυτταρομετρική ανάλυση

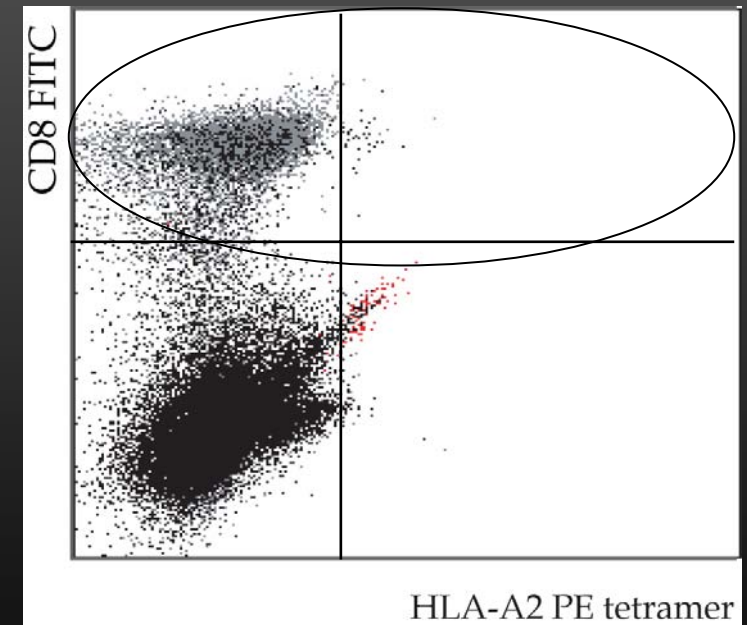
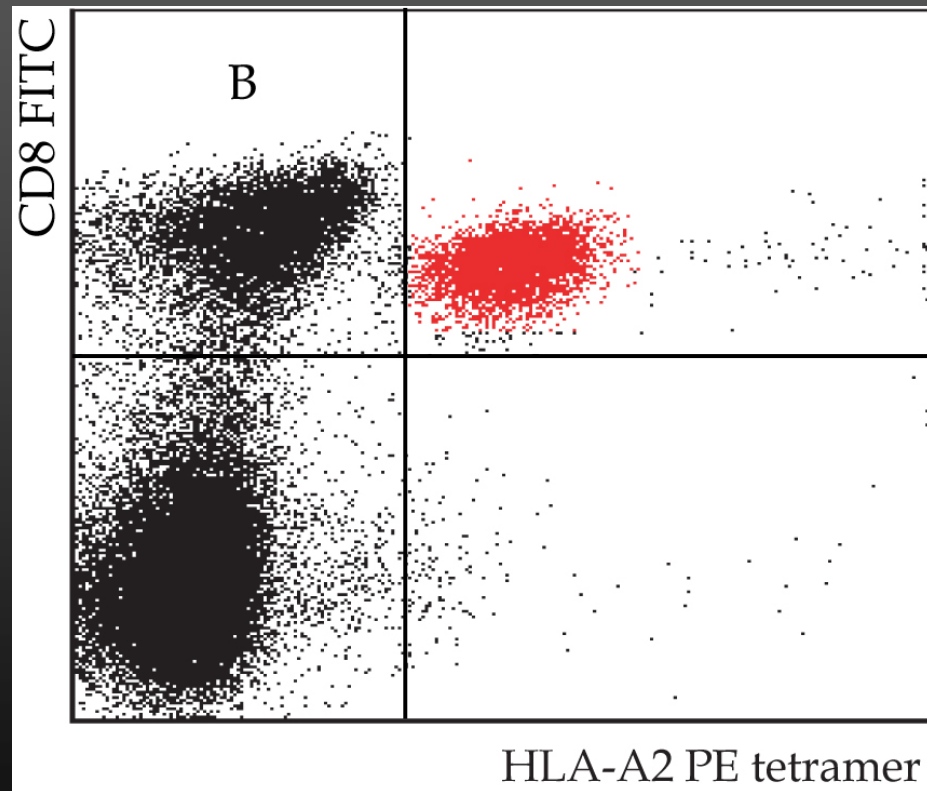
1. Σκεδαστικό διάγραμμα

Καθορισμός του παράθυρου που περιέχει τα ζώντα CD8 λεμφοκύτταρα



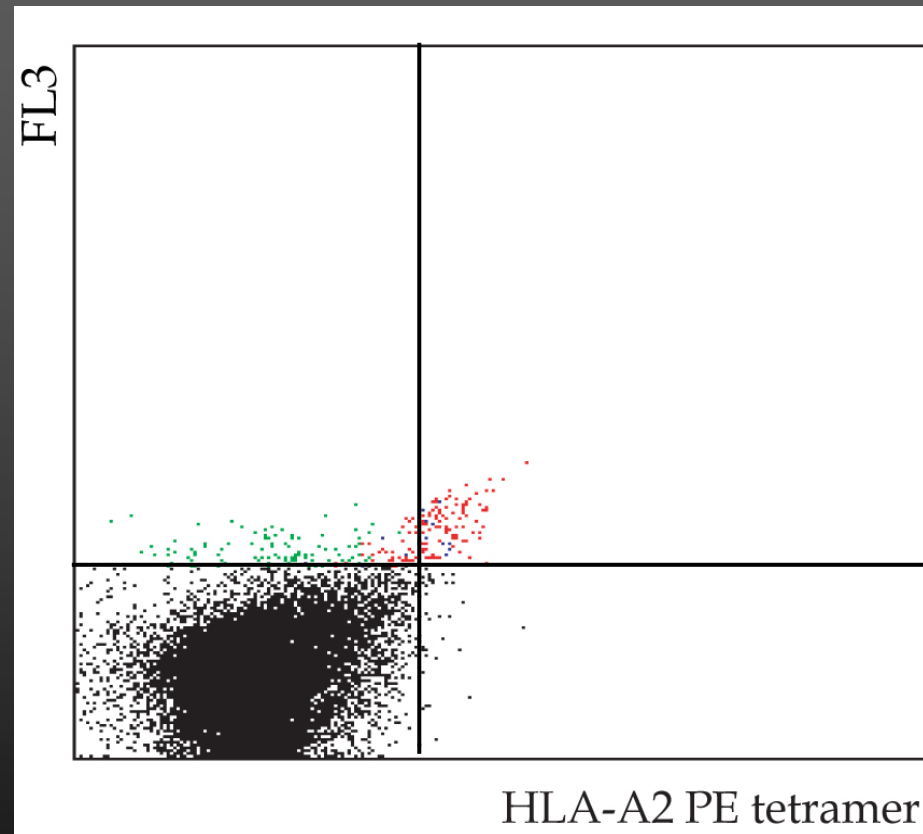
Κυτταρομετρική ανάλυση

2. Προσδιορισμός CD8⁺/τετραμερές⁺ κυττάρων



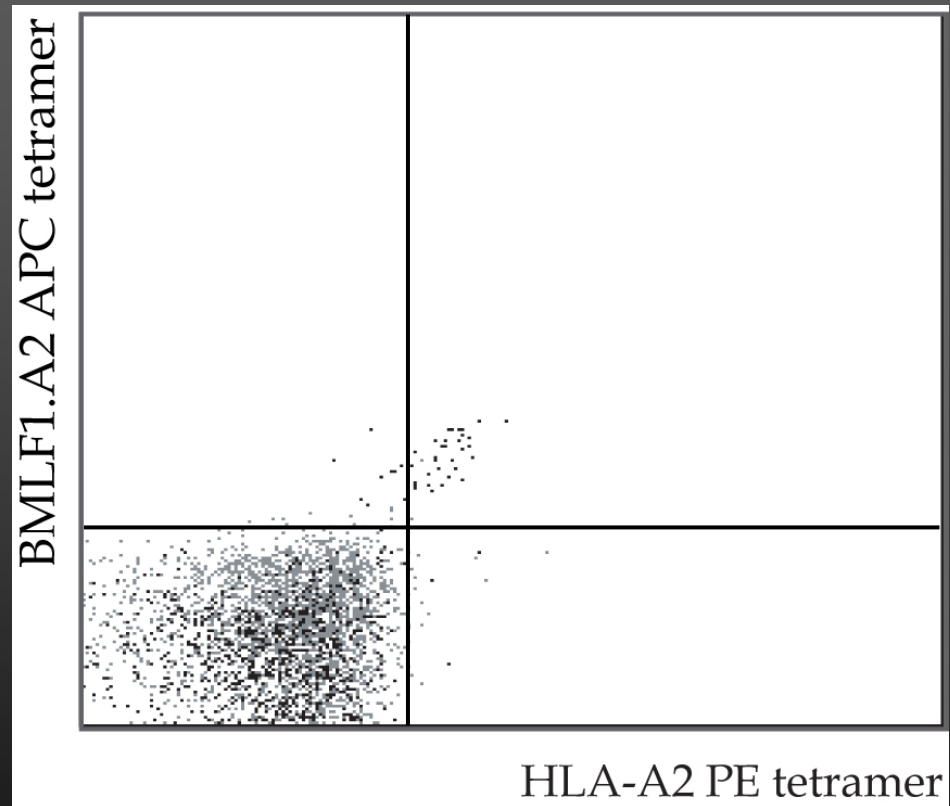
Κυτταρομετρική ανάλυση

3. Αυτοφθορίζοντα CD8⁺ κύτταρα



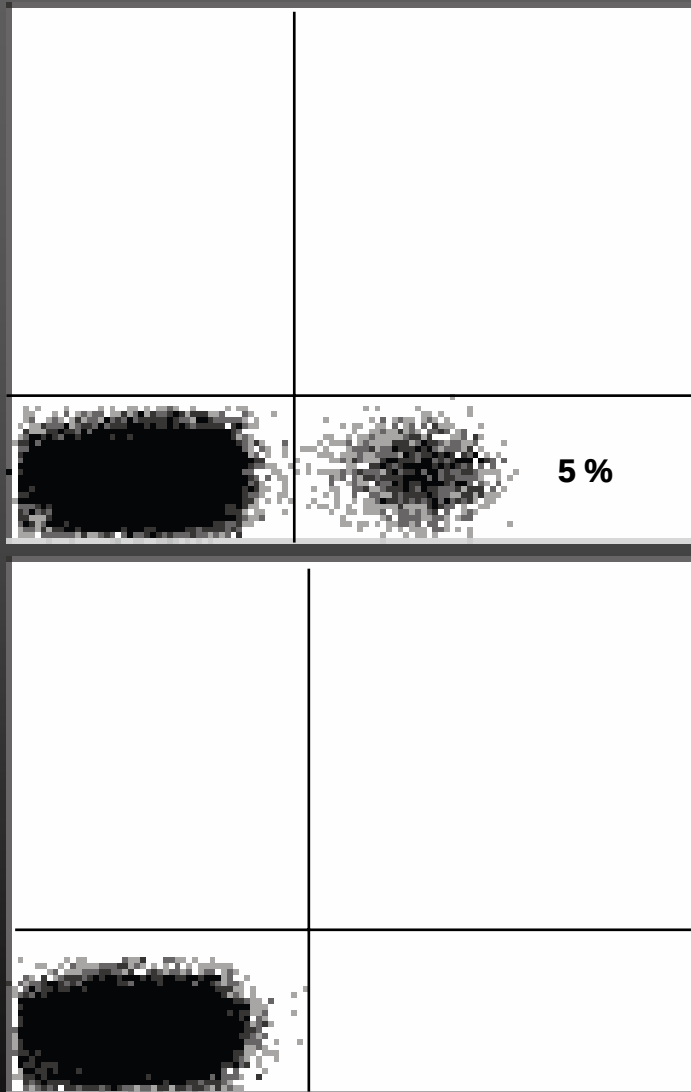
Κυτταρομετρική ανάλυση

4. Μη ειδική σύνδεση των τετραμερών



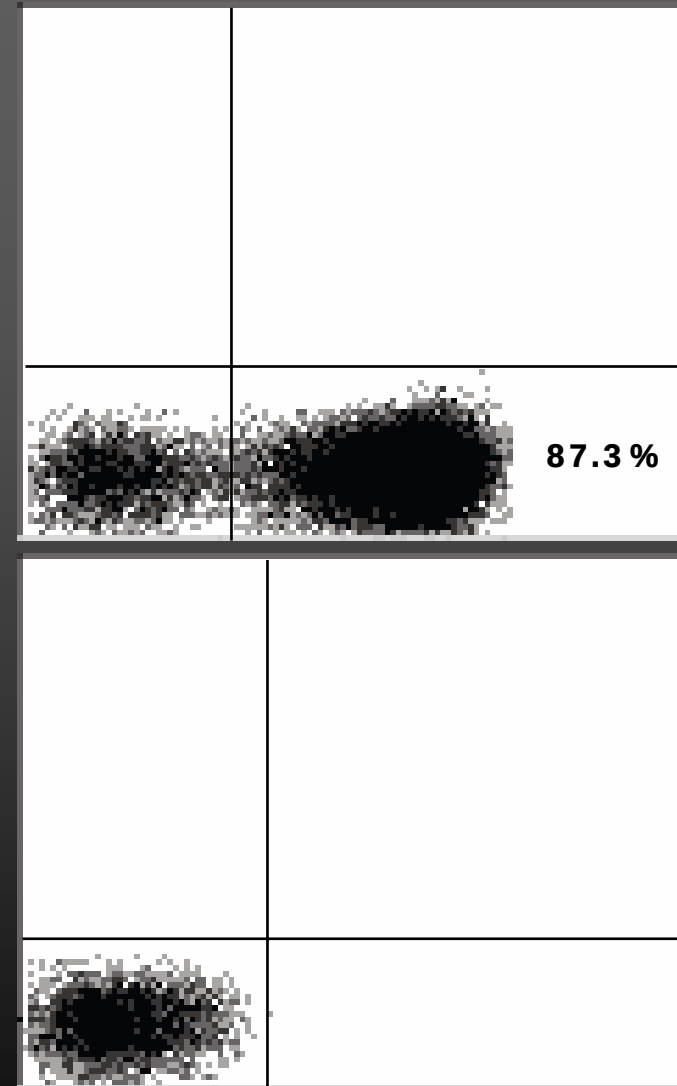
Κυτταρομετρική ανάλυση - Περιπτώσεις μαρτύρων

Control HLA-A2 APC



hTERT-A2 PE

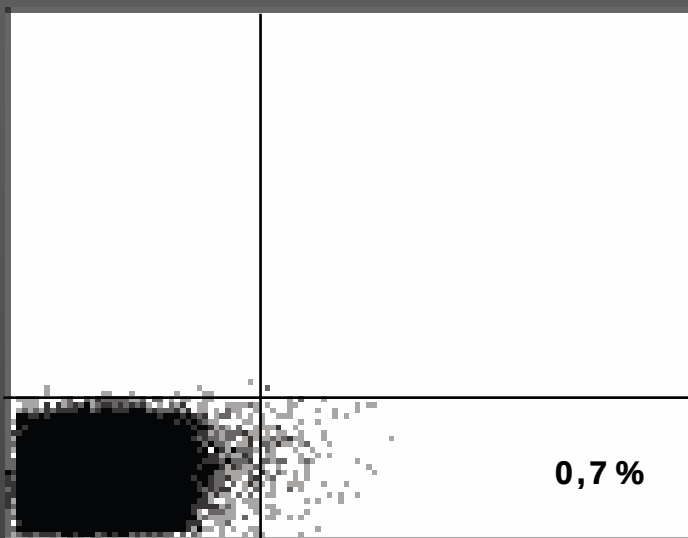
Control HLA-A24 APC



hTERT-A24 PE

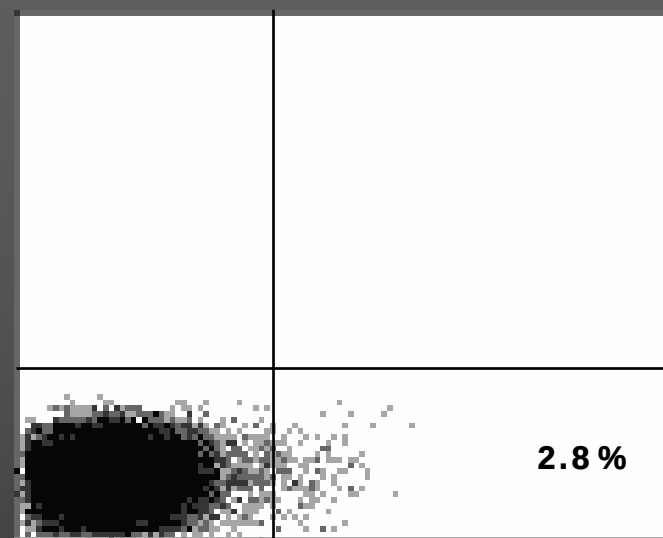
Κυτταρομετρική ανάλυση - Περιπτώσεις ασθενών

Control HLA-A2 APC



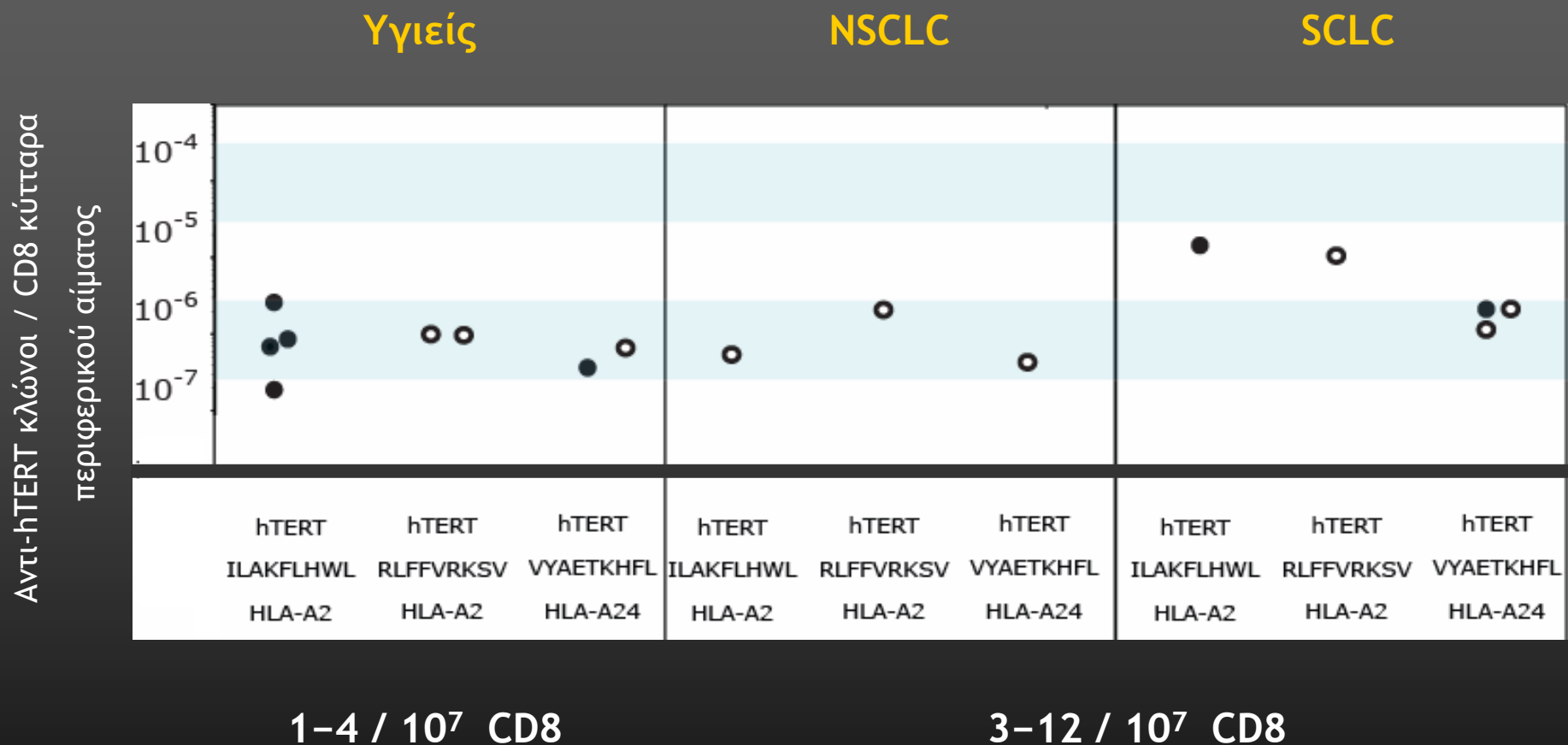
hTERT-A2 PE

Control HLA-A24 APC



hTERT-A24 PE

Αποτελέσματα



Συζήτηση

1. Ανίχνευση CD8 απάντησης έναντι «ιδίων» αντιγόνων
στον καρκίνο και σε υγιή άτομα

2. Απομόνωση των κλώνων και λειτουργικός
χαρακτηρισμός τους

3. Μηχανισμοί περιφερικής ανοχής;

Ευχαριστώ πολύ...