

Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου
Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Ειδικές CD8 T-κυτταρικές απαντήσεις
έναντι των αντιγόνων σαρβιβίνη και MAGE
στον καρκίνο του πνεύμονα
(*IRTALUNG*)**

Φαίη Σούκου

Σκοπός

Αναζήτηση CTL κλώνων έναντι επίτοπων
της Σαρβιβίνης και του MAGE
στο αίμα
ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα
και υγιών ατόμων

Σαρβιβίνη & MAGE

Σαρβιβίνη

- «Ίδιο» αντιγόνο
- Αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη
- Απαραίτητη για την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων
- Συνδεδεμένα με τους όγκους αντιγόνα (TAAs)
 - ↑ καρκίνος - υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού κύτταρα
 - ↓ σε μη καρκινικούς ιστούς

MAGE

- Ειδικά των όγκων αντιγόνα (TSAs)
- Εκφράζεται αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα

MLPC

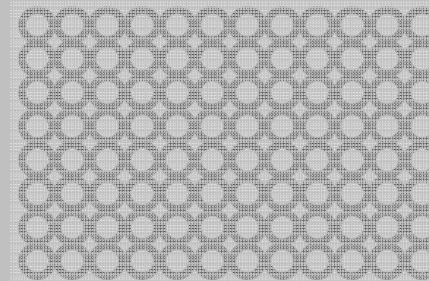
PBMC, του ίδιου δείγματος, καλλιεργούνται σε ειδικές πλάκες 96 φρεατίων.
(2×10^5 κύτταρα/φρεάτιο)

ΜΕΡΑ 0

Σύνδεση πεπτιδίων

PBMC + πεπτίδιο

60min, 20°C, πλύση, ανάμιξη

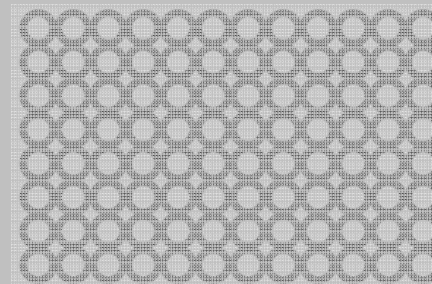


+IL-2, IL-4, IL-7



ΜΕΡΑ 7/8

Επαναδιέγερση με πεπτίδια

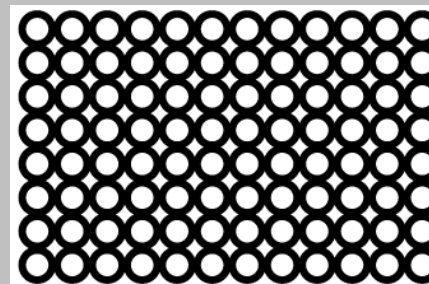


+IL-2, IL-4, IL-7



ΜΕΡΑ 14

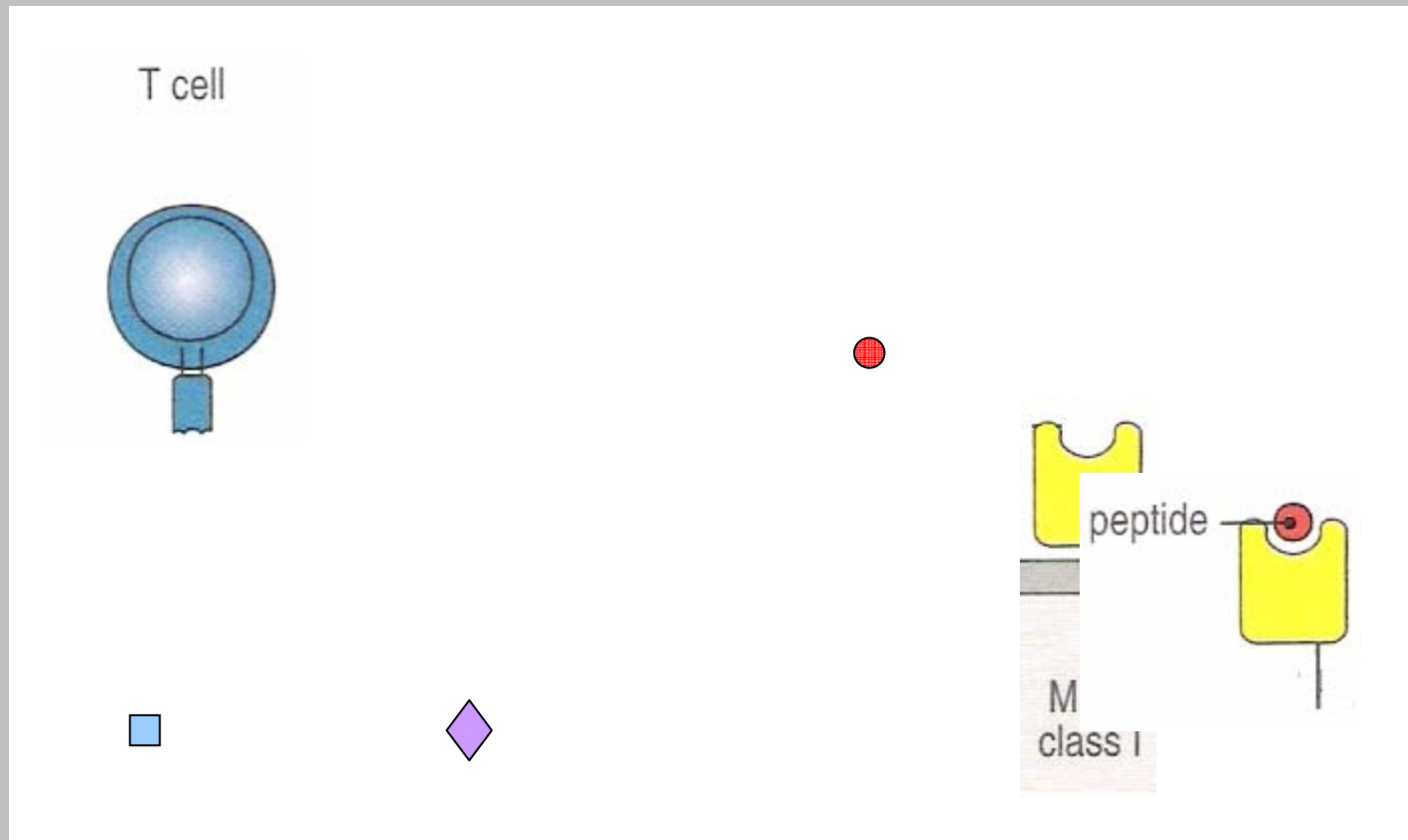
Σήμανση με HLA-τετραμερή



ΕΠΑΝΑΔΙΕΓΕΡΣΗ ?

Προσδιορισμός ειδικών T-κυττάρων με την τεχνολογία των HLA-τετραμερών

Αντιγόνα δεν μπορούν να αναγνωριστούν άμεσα από T-κύτταρα, αλλά μέσω συμπλέγματος αντιγόνου – MHC μορίου



Τετραμερή

Το τετραμερές είναι
σημασμένο με ένα
φθοριόχρωμα (μέσω
αβιδίνης)



Εντοπισμός τετραμερών
με κυτταρομετρία ροής

✓ Κυτταρόμετρο

Προετοιμασία: Τετραμερή & Κυτταρομετρία Ροής

MLPC + Τετραμερές PE* (575 nm)

+ Τετραμερές ελέγχου APC*⁺ (675 nm)

Επώαση 37°C, 30min

Περιορισμός:
HLA-A1
HLA-A2
HLA-A24



+ CD8-FITC (525 nm)

Επώαση 37°C, 30min

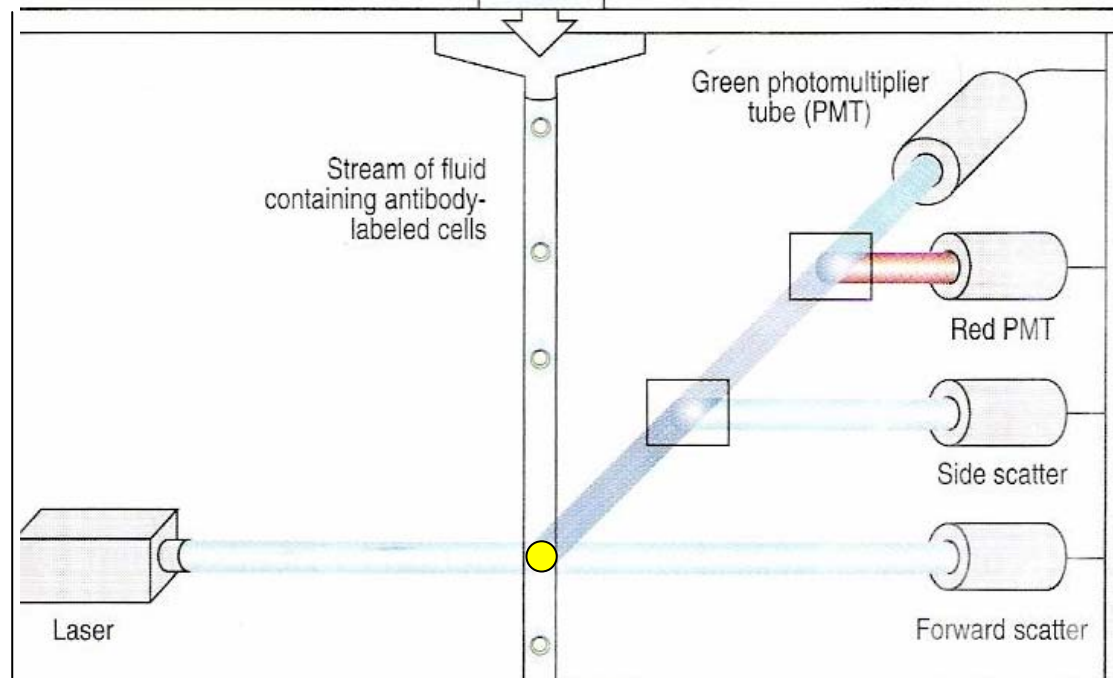
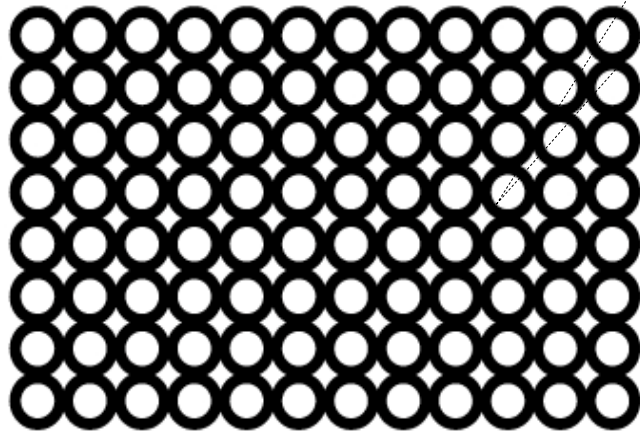
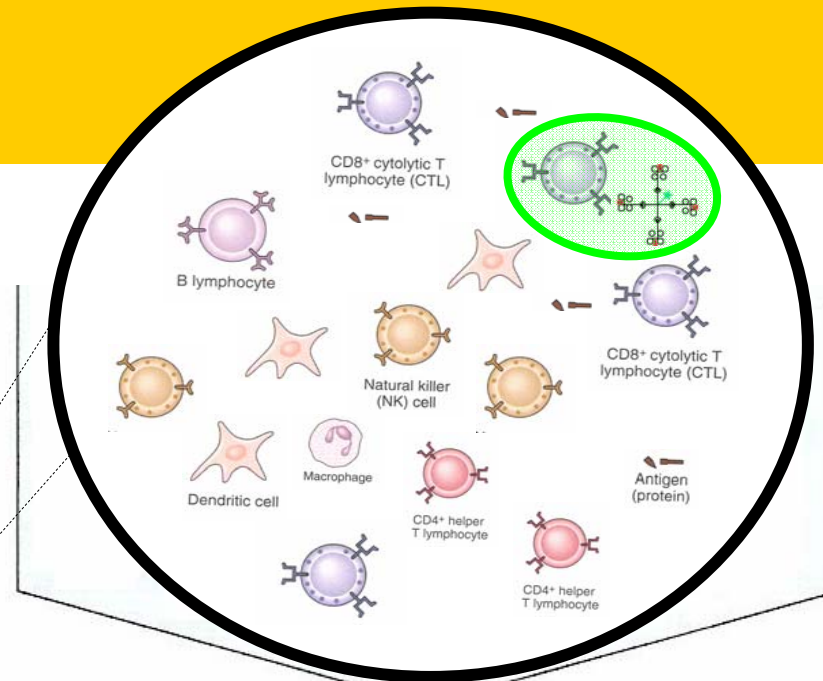


Ανάλυση

**Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels*

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

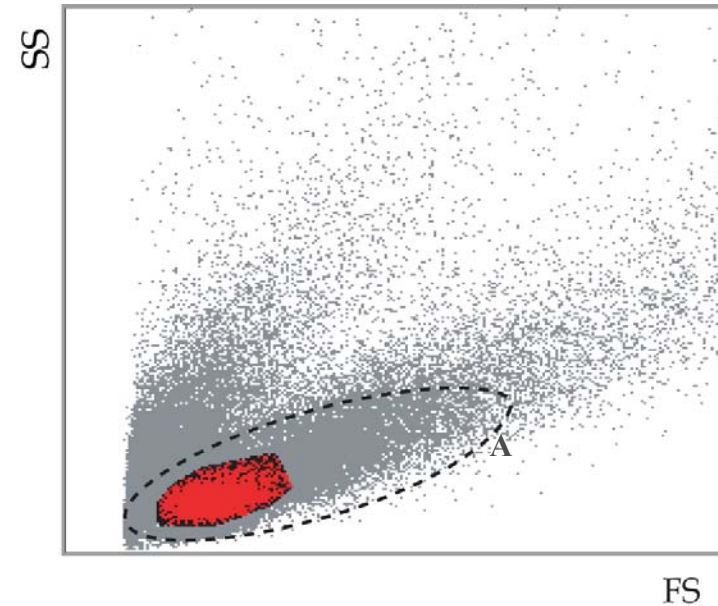
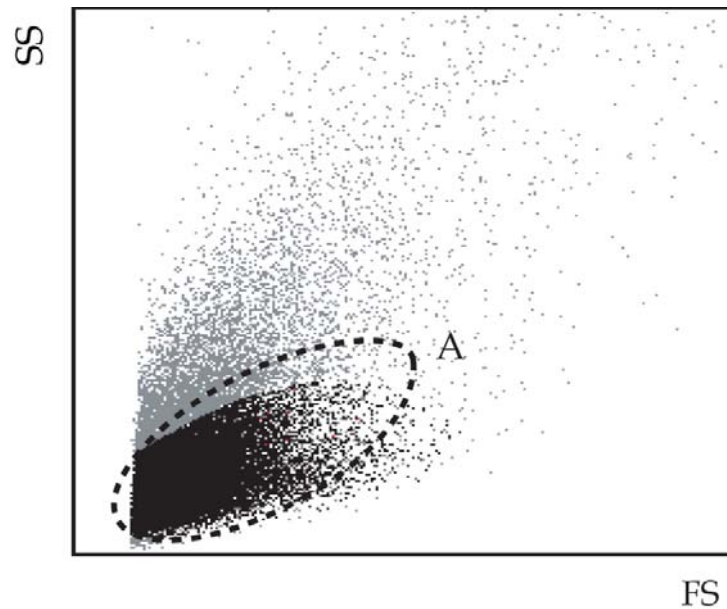
Τετραμερή & Κυτταρομετρία Ροής



Τετραμερή & Κυτταρομετρική Ανάλυση

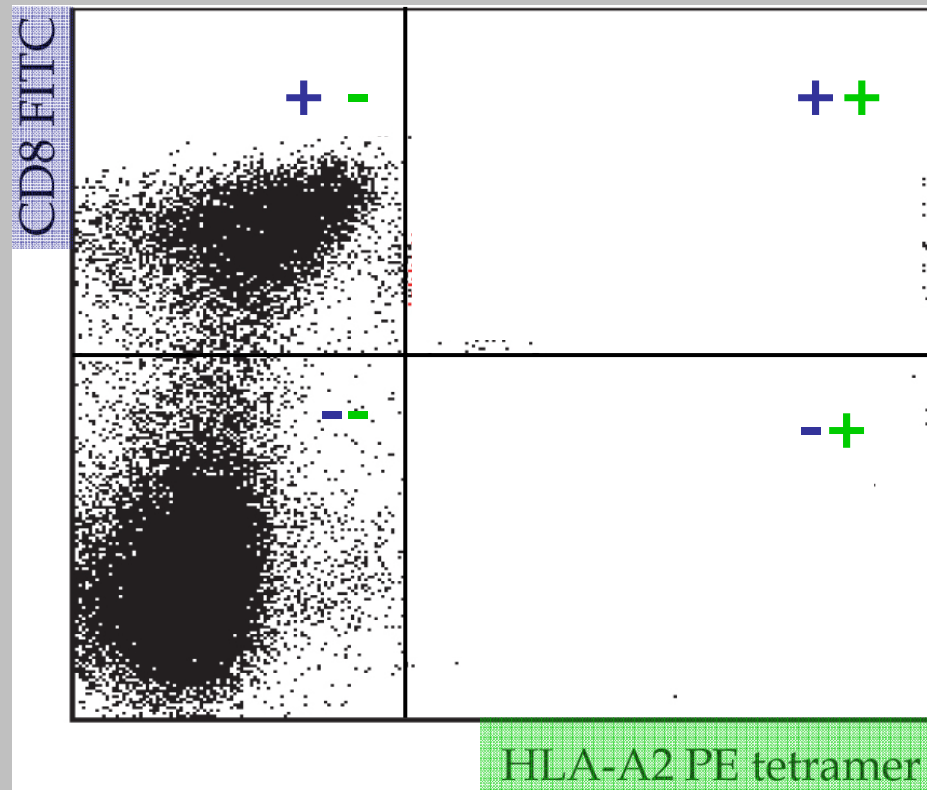
1. Σκεδαστικό διάγραμμα

Καθορισμός του παράθυρου που περιέχει τα ζώντα CD8 T-λεμφοκύτταρα



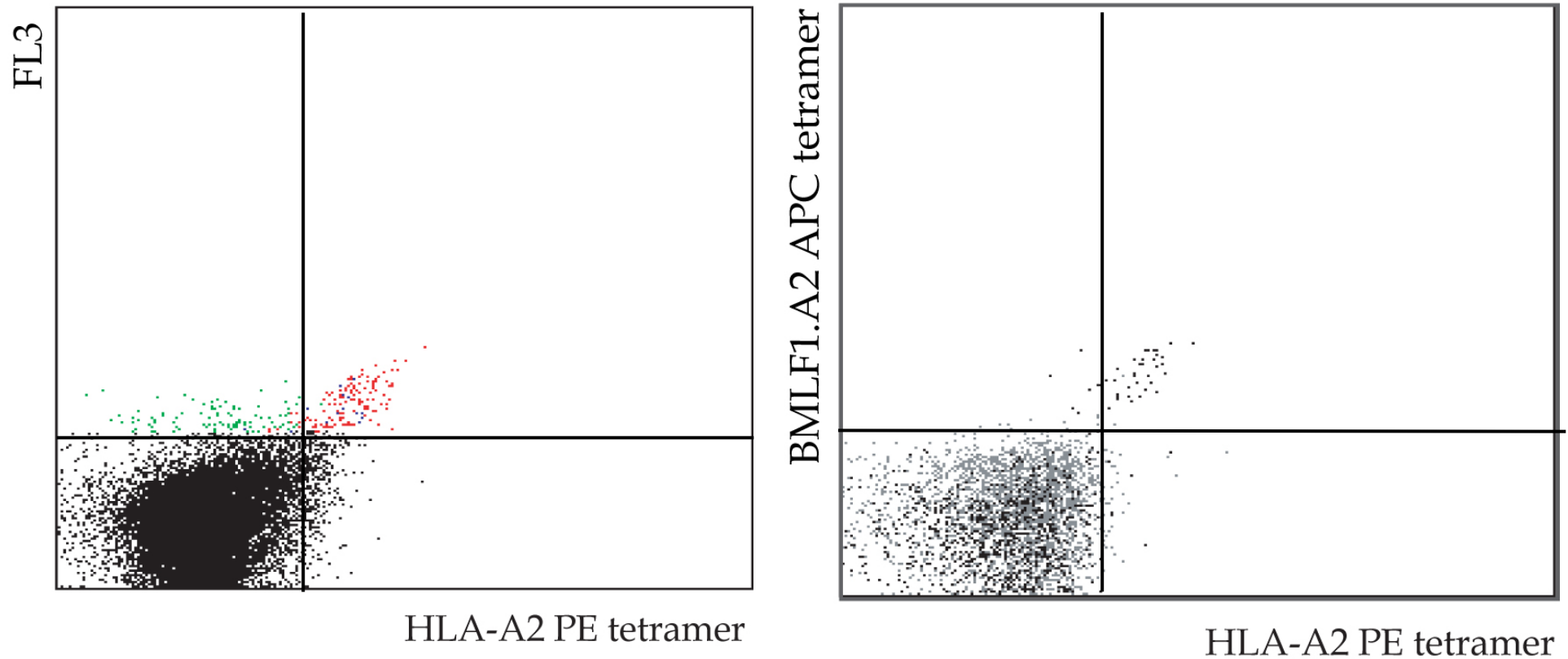
Κυτταρομετρική Ανάλυση

2. Προσδιορισμός CD8⁺/τετραμερές⁺ κυττάρων



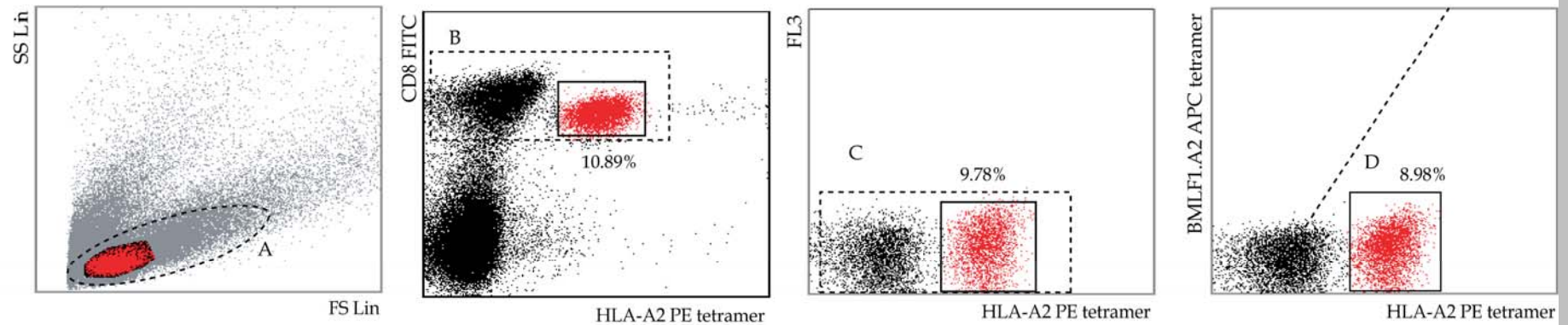
Κυτταρομετρική Ανάλυση

3. Αυτοφθορίζοντα CD8⁺ κύτταρα & μη ειδική σύνδεση

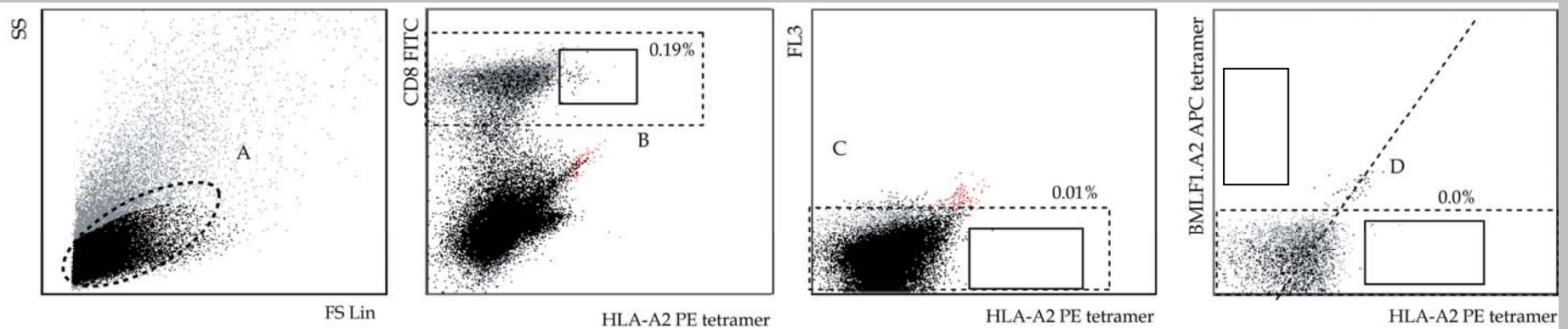


Τετραμερή-Ανάλυση

Θετικός πληθυσμός κυττάρων για το τετραμερές-PE



Αρνητικός πληθυσμός κυττάρων για το τετραμερές PE & APC (αυτοφθορισμός)



Υλικό

Ασθενείς/ Μάρτυρες
(HLA-A1 ή HLA-A2 ή HLA-A24)

- 3 ασθενείς με NSCLC
- 8 ασθενείς με SCLC
- 6 φυσιολογικά άτομα

Περιορισμός:
HLA-A1
HLA-A2
HLA-A24

Πεπτίδια

Σαρβιβίνης

- LTLGEFLKL (HLA-A2)
- AYACNTSTL (HLA-A24)

MAGE-A3

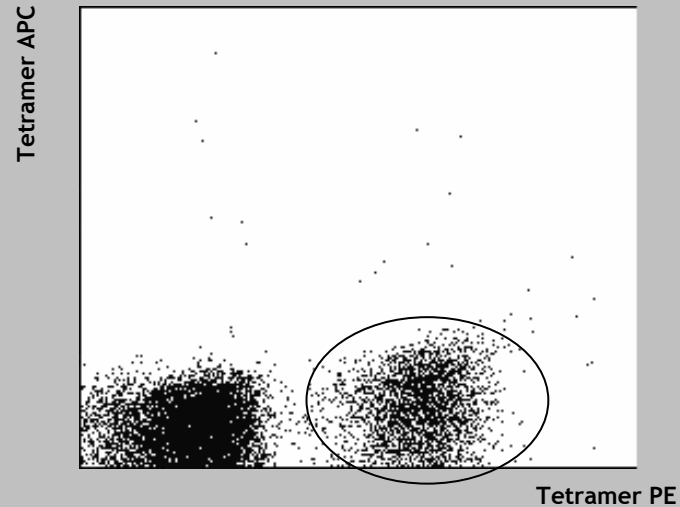
- FLWGPRALV (HLA-A2)
- TFPDLESEF (HLA-A24)
- EVDPIGHLY (HLA-A1)

MAGE-A1

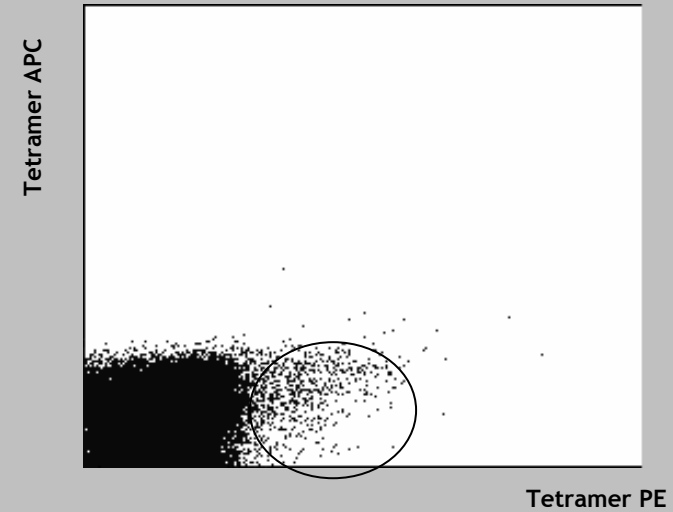
- EADPTGHSY (HLA-A1)

Αποτελέσματα: MAGE

Υγιείς δότες

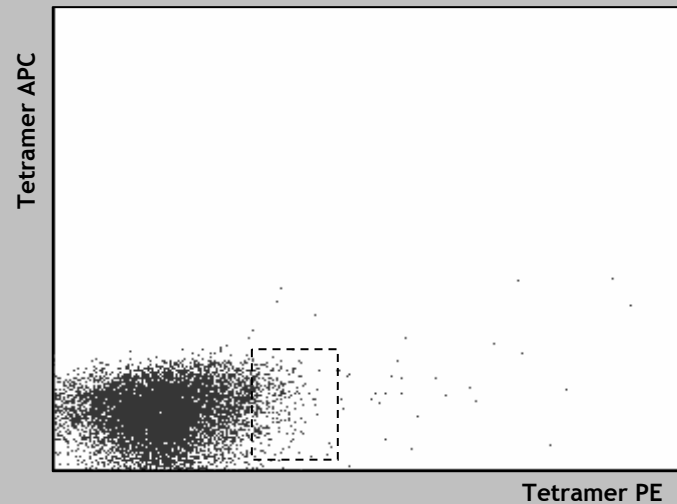


Ασθενείς

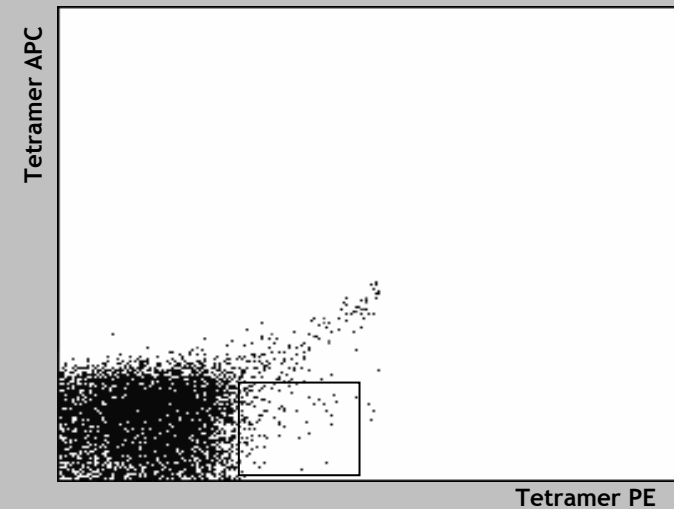


Αποτελέσματα: Σαρβιβίνης

Υγιείς δότες

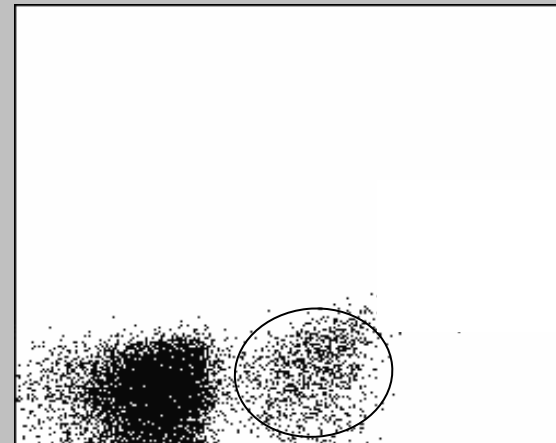
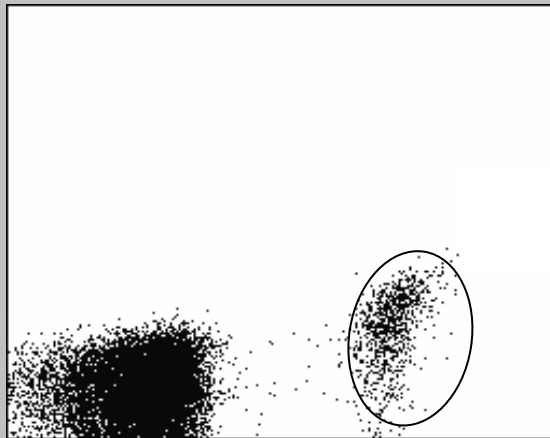


Ασθενείς



Αποτελέσματα

τετραμερές⁺ πληθυσμοί με διαφορετική ένταση φθορισμού



Αποτελέσματα

CTL απάντηση έναντι πεπτιδίων των MAGE και σαρβιβίνης ανιχνεύεται τόσο σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα όσο και σε υγιή άτομα

