

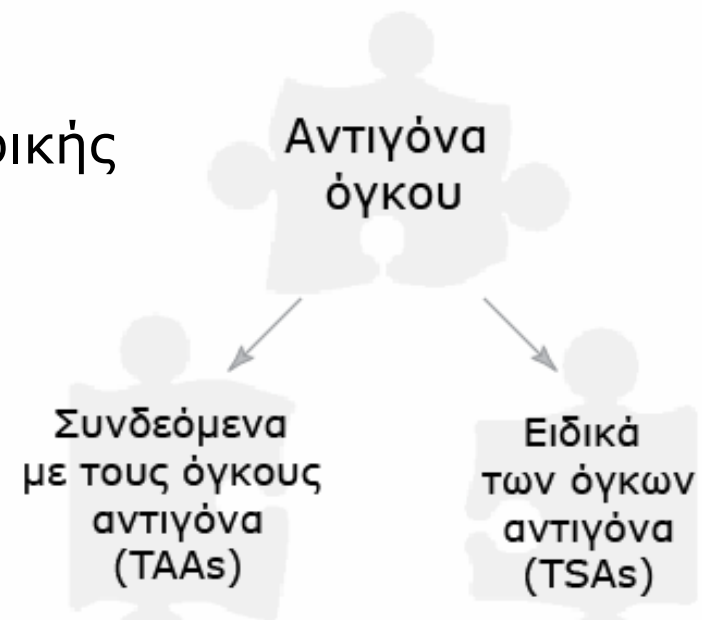
Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου, Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας
Πνευμονολογική Κλινική,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ποσοτική και Λειτουργική μελέτη
ειδικών έναντι αντιγόνων των όγκων (ΤΑΑ)
CD8 Τ-κυτταρικών (CTL) κλώνων
στον καρκίνο του πνεύμονα

Καρανίκας Β, Σούκου Φ, Καλαλά Φ, Κερενίδη Θ, Γουργουλιάνης Κ, Γερμενής ΑΕ
Clin Exp Immunology (submitted)

Εισαγωγή

- ✓ Ενίσχυση των μηχανισμών ενεργοποίησης των CD8 T-κυττάρων (**CTLs**) χρησιμοποιώντας αντιγόνα του όγκου που εκφράζονται από καρκινικά κύτταρα
- ✓ Μικρός αριθμός ασθενών που παρουσίασε υποχώρηση όγκου
- ✓ Λίγα ειδικά έναντι του καρκίνου του πνεύμονα αντιγόνα έχουν αναγνωρισθεί από **CTLs**
- ✓ Μέχρι στιγμής η συχνότητα T-κυτταρικής απάντησης αυτών των αντιγόνων δεν έχει αξιολογηθεί.



Αντιγόνα όγκων

Σαρβιβίνη

- Αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη (απαραίτητη για επιβίωση και ανάπτυξη κυττάρων)
- Έκφραση:
 - ↑ καρκίνος – κύτταρα με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού
 - ↓ σε μη καρκινικούς ιστούς

hTERT

- μέρος του συμπλέγματος της τελομεράσης
- Έκφραση απαραίτητη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων
- Υψηλή έκφραση – Κακή πρόγνωση
- Ευρέως εκφραζόμενο αντιγόνο των όγκων

Η συχνότητα T-κυτταρικής απάντησης των παραπάνω αντιγόνων δεν έχει αξιολογηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα

MAGE-A

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

Αναζήτηση και Αξιολόγηση
κυτταρολυτικών κλώνων (CTL) έναντι
γνωστών επίτοπων της
σαρβιβίνης, hTERT και της MAGE στο αίμα
ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα
και υγιών ατόμων

Απομόνωση και Λειτουργικός χαρακτηρισμός
των CTL κλώνων

Υλικά & Μέθοδοι

Ασθενείς/ Μάρτυρες

(HLA-A1 ή HLA-A2 ή HLA-A24 ή HLA-B35)

- 12 ασθενείς με NSCLC
- 10 ασθενείς με SCLC
- 13 φυσιολογικά άτομα

Περιορισμός:

HLA-A1

HLA-A2

HLA-A24

HLA-B35

Πεπτίδια

Σαρβιβίνης:

LTLGEFLKL (HLA-A2)

AYACNTSTL (HLA-A24)

hTERT:

ILAKFLHWL (HLA-A2)

RLFFYRKSV (HLA-A2)

VYAETKHFL (HLA-A24)

MAGE-A3:

FLWGPRALV (HLA-A2)

TFPDLESEF (HLA-A24)

EVDPIGHLY (HLA-A1/B35)

MAGE-A1:

EADPTGHSY (HLA-A1/B35)

Μικτές Λεμφοκυτταρικές Καλλιέργειες (MLPC)

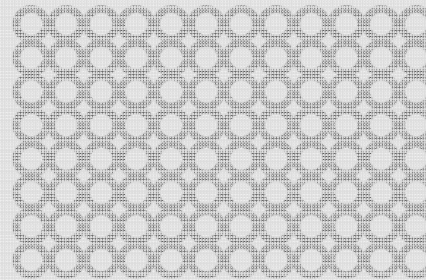
PBMC, του ίδιου δείγματος, καλλιεργούνται σε ειδικές πλάκες 96 φρεατίων (10%HS)M(2×10^5 κύτταρα/φρεάτιο)

ΜΕΡΑ 0

Σύνδεση πεπτιδίων

PBMC + πεπτίδιο

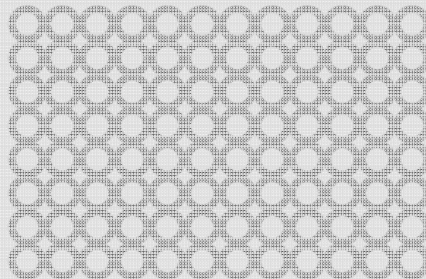
60min, 20°C, πλύση,
ανάμιξη



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

ΜΕΡΑ 7

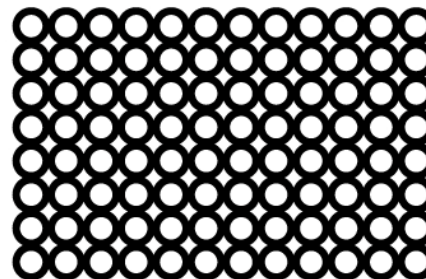
Επαναδιέγερση με
πεπτίδια



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

ΜΕΡΑ 14

Σήμανση με HLA-
τετραμερή



ΕΠΑΝΑΔΙΕΓΕΡΣΗ ?

Προετοιμασία: Τετραμερή & Κυτταρομετρία Ροής

MLPC + Τετραμερές PE* (575 nm)

+ Τετραμερές ελέγχου APC*⁺ (675 nm)

Επώαση 37°C, 30min



+ CD8-FITC (525 nm)

Επώαση 37°C, 30min

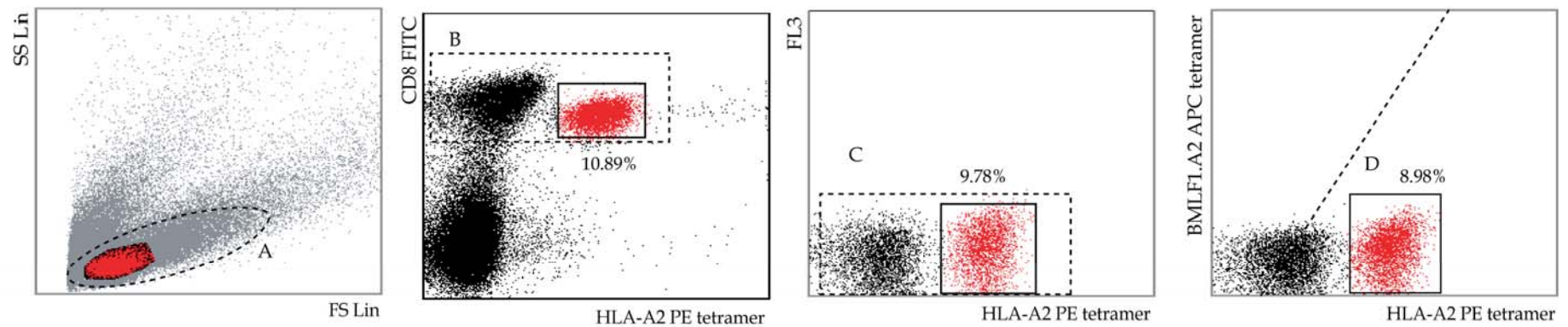
Ανάλυση

**Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels*

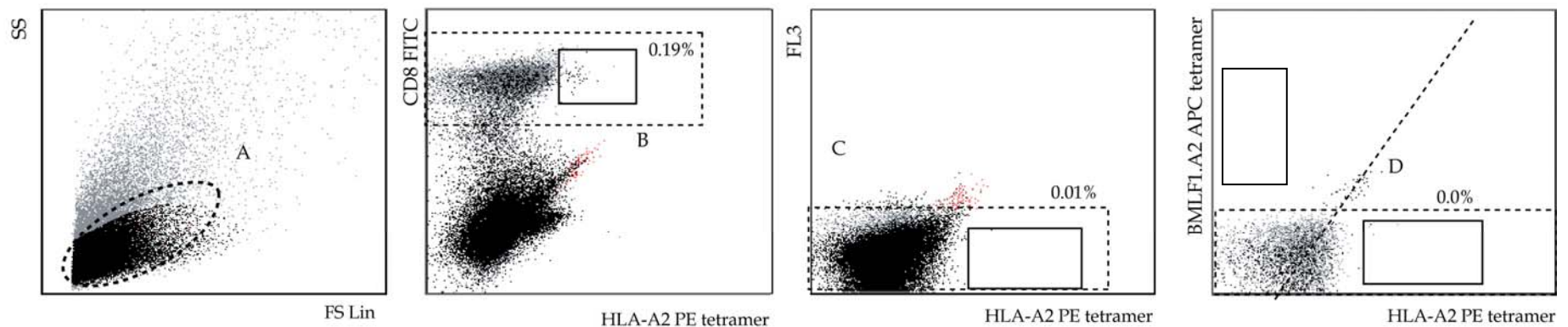
+EBV πεπτίδια: BMLF1.A2-APC, GLCTLVAML / EBNA3C.A24-APC, RYSIFFDYM

Τετραμερή & Κυτταρομετρική Ανάλυση

Θετικός πληθυσμός κυττάρων για το τετραμερές-PE



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



Υγιείς Δότες

Pt No	Age (yrs)	HLA	SURV.A2	SURV.A24	hTERT.A2 IL	hTERT.A2 RL	hTERT.A24	MAGE3.A1	MAGE3.A2	MAGE3.A24	MAGE3.B35	MAGE1.A1	MAGE1.B35
1	53	A02			2,6	<2,7							
2	55	A02	<1,0		1,0	<1,0			3,6				
3	55	A01						<2,0				<2,0	
4	54	A01						1,0				<1,0	
5	54	A01,A02	<0,4		<0,4	<0,4		<0,4	<0,4			<0,4	
6	54	A02	<2,0		2,0	<2,0			2,0				
7	60	A02, A24, B35	<2,3	<2,3	<2,3	<2,3	<2,3		<2,3	<2,3	<2,3		<2,3
8	57	A01, A24		<1,6			1,6	<1,6		<1,6		<1,6	
9	64	A02	<1,0		<1,0	<1,0			1,0				
10	60	A02			<1,15	<1,5			1,2				
11	51	A24, B35	<2,3	<2,3	<2,3	<2,3	<2,3		<2,3	<2,3	<2,3		<2,3
12	62	A01						<2,0				<2,0	
13	57	A01, A24		<2,7			<2,7	<2,7	<2,7			<2,7	

Frequency = $\times 10^{-7}$ CD8+ cells

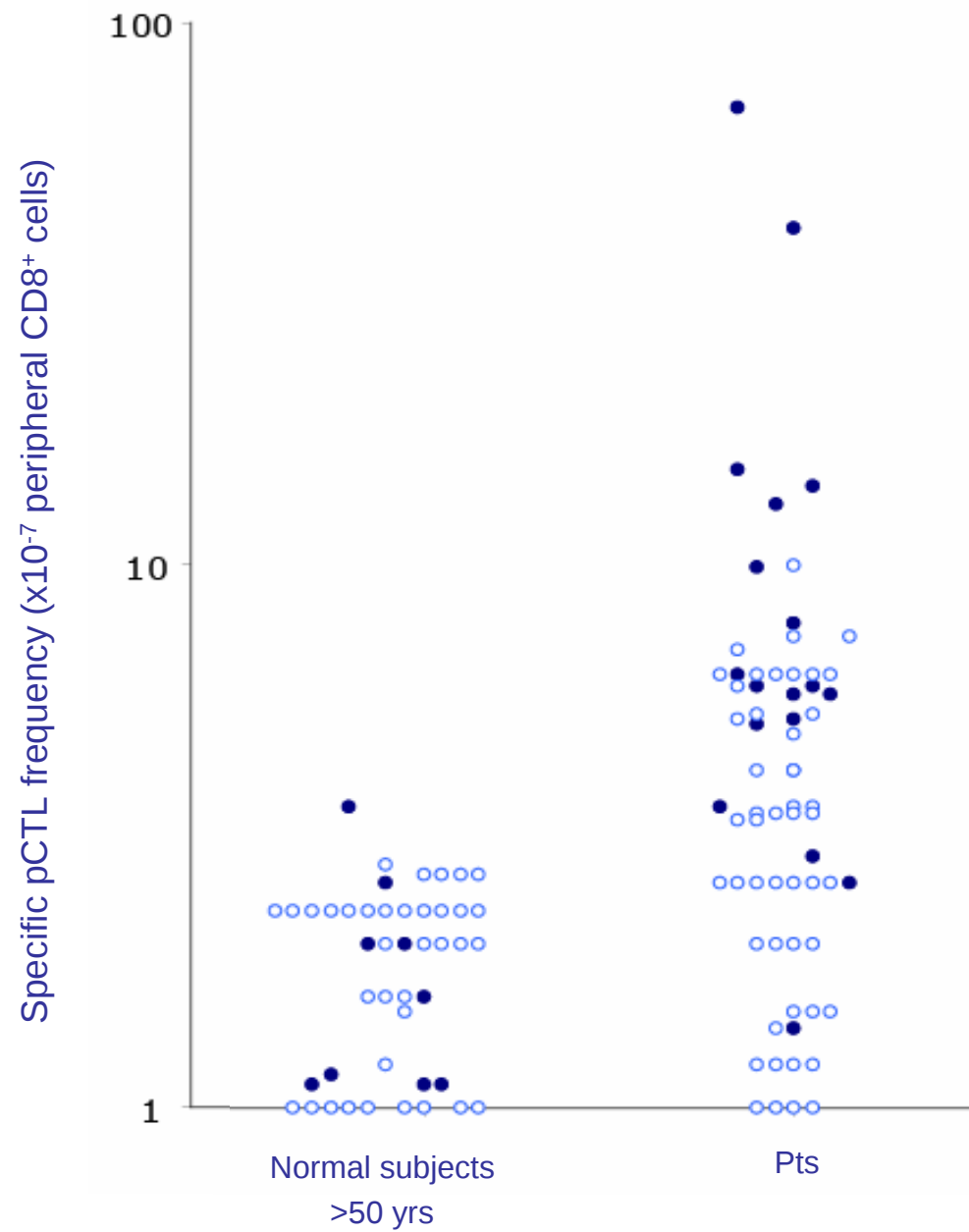
Αποτελέσματα

Συχνότητα

Pt No	Age (yrs)	HLA	SURV.A2	SURV.A24	hTERT.A2 IL	hTERT.A2 RL	hTERT.A24	MAGE3.A1	IMAGE3.A2	MAGE3.A24	MAGE3.B35	MAGE1.A1	MAGE1.B35
Non small cell lung cancer													
1	74	A02, 24, B35	15,0	<5	<7.4		<7.4		<7	5,2	NT		NT
2	75	A02, 11	<2.6			<3.6			<2.6				
3	73	A24, 32 B35		<1			<1	<1		<1	NT	<1	NT
4	45	A24, 24		<3.6			3,6			<3.6			
5	81	A2, 32	<2.6		7,8	<2.6			<2.6				
6	69	A2	1,5		<1.5	<1.5			<1.5				
7	58	A24, B35		<4.2			<4.2				<4.2		<4.2
8	55	A1, B35						<1.2			<1.2	<1.2	<1.2
9	47	A2	<2.8		2,6	<2.6			5,8				
10	66	A2, B35	<6.3		<6.3	<6.3		<6.3	<6.3		<6.3	<6.3	
11	70	A2, B35	<3.5		42,0	<3.5			<3.5		<3.5		<3.5
12	80	A2	<6.3		6,3				70,0				
Small cell lung cancer													
13	69	A24, 24		<6			<10			6,0			
14	56	A2, 2	1,5		13,0				5,1				
15	71	A24, 68		1,4			<1.4			1,4			
16	74	A24, 25, B35		<2.9			2,9			5,8	NT		NT
17	54	A02, 23	<2.6		<2.6	<2.6			<2.6				
18	74	A24, 03		<3.4			<3.4			<3.4			
19	70	A02, 32	<5.2		<5.2	<5.2			<5.2				
20	63	A01, 02	<2		<2	<2		<2	14,0			<2	
21	56	A30, 32, B35									6,0		<6
22	71	A02	15,0		9,9	<4.9			15,0				

Frequency = $\times 10^{-7}$ CD8+ cells

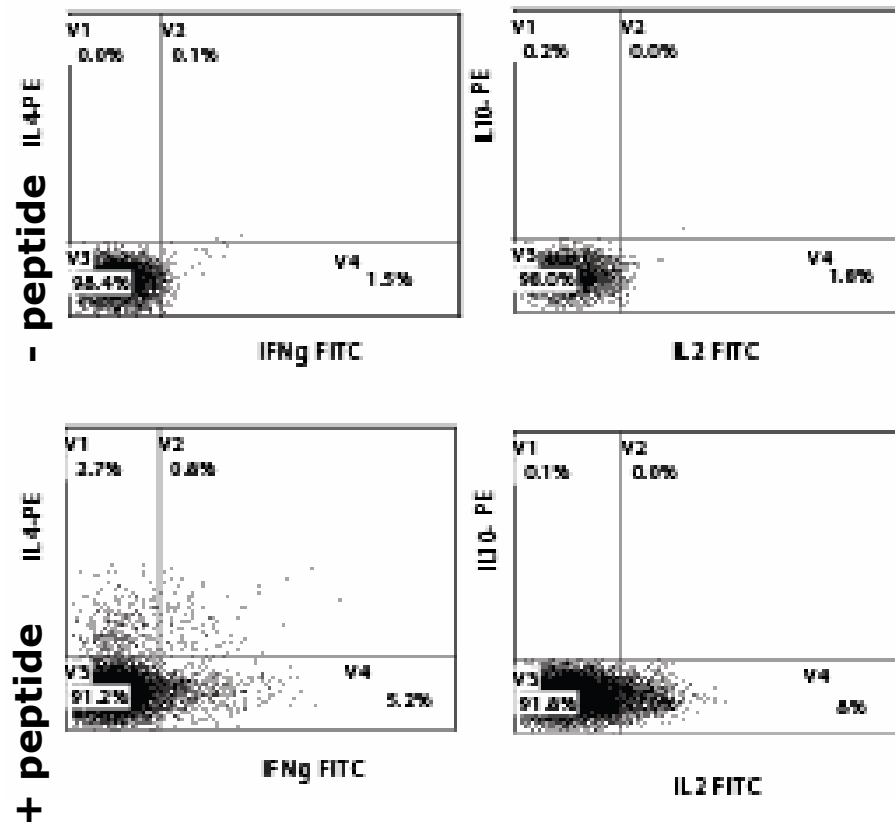
Συχνότητα



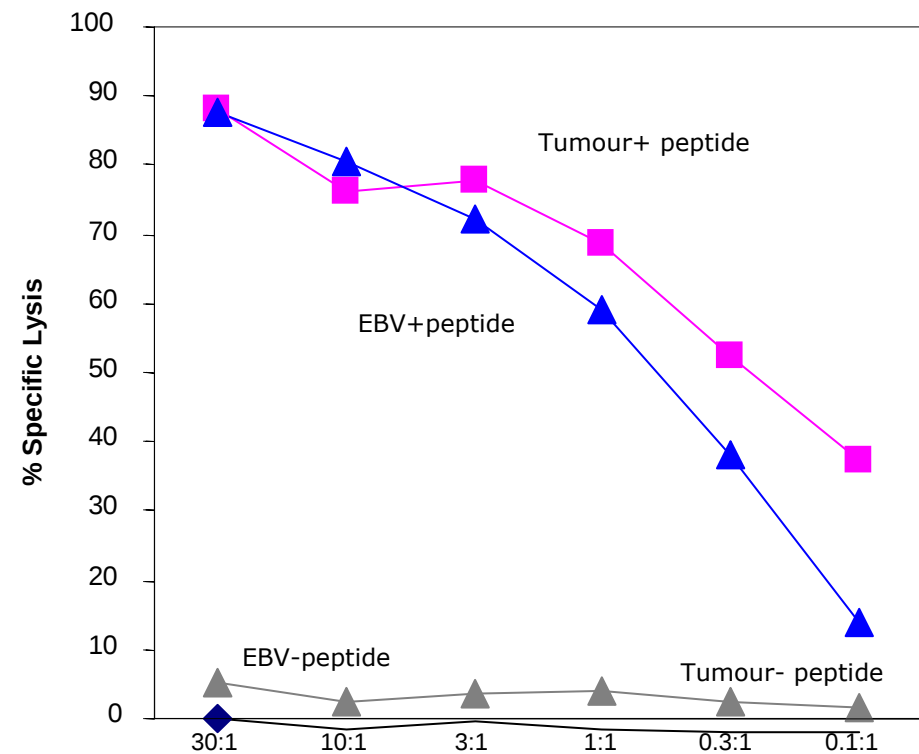
Αποτελέσματα

Λειτουργικός Χαρακτηρισμός

ικανότητα παραγωγής
ενδοκυττάριων κυτταροκινών
(IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10)



ικανότητα των κλώνων να
σκοτώνουν καρκινικά
κύτταρα



Συμπεράσματα

Ποσοτική εκτίμηση της παρουσίας CTL κλώνων στον καρκίνο του πνεύμονα και σε υγιείς δότες

CTL κλώνοι απομονωμένοι από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και υγιείς δότες, δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά

Ποιές μπορεί να είναι οι ποιοτικές διαφορές CTL κλώνων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων;



Cancer Immunology Unit, Department of Immunology and Histocompatibility

**Karanikas V, Soukou F, Zamanakou M, Kalala F,
Kerenidi T, Gourgoulialis K, Germanis AE**

Collaborators

- **Respiratory Medicine Department, UTH:** Prof Gourgoulialis K, Kerenidi N
- **Genetic and Cellular Unit, Ludwig Institute for Cancer Research, Belgium:** Prof Coulie

Funding

EU (MIF1-CT-2006-021795, EPEAEK II Pythagoras), **GSRT** (ENTER 04EP09)

