

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

Εύα Σ. Γραμουσιάνου, Post-Doc

Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου

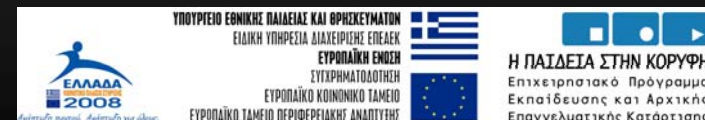
Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

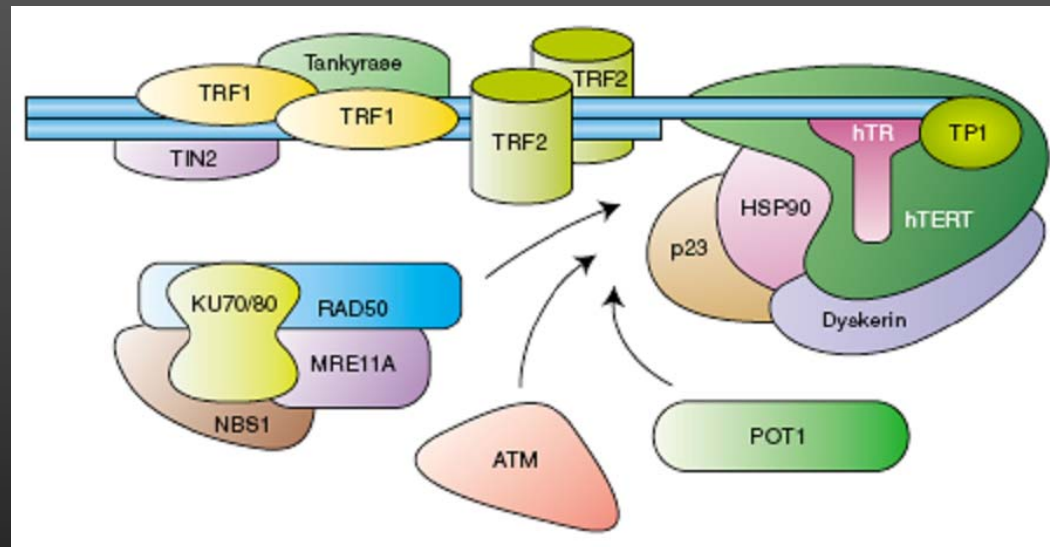
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

This project is co-funded by the

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



- Συστατικό της τελομεράσης
- Έκφραση απαραίτητη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων
- Υψηλή έκφραση - Κακή πρόγνωση



Ευρέως εκφραζόμενο αντιγόνο των όγκων

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

Η ποσοτική εκτίμηση της αυτόματης CD8 T-κυτταρικής απάντησης
έναντι 3 πεπτιδίων της hTERT

ILAKFLHWL

RLFFYRKSV

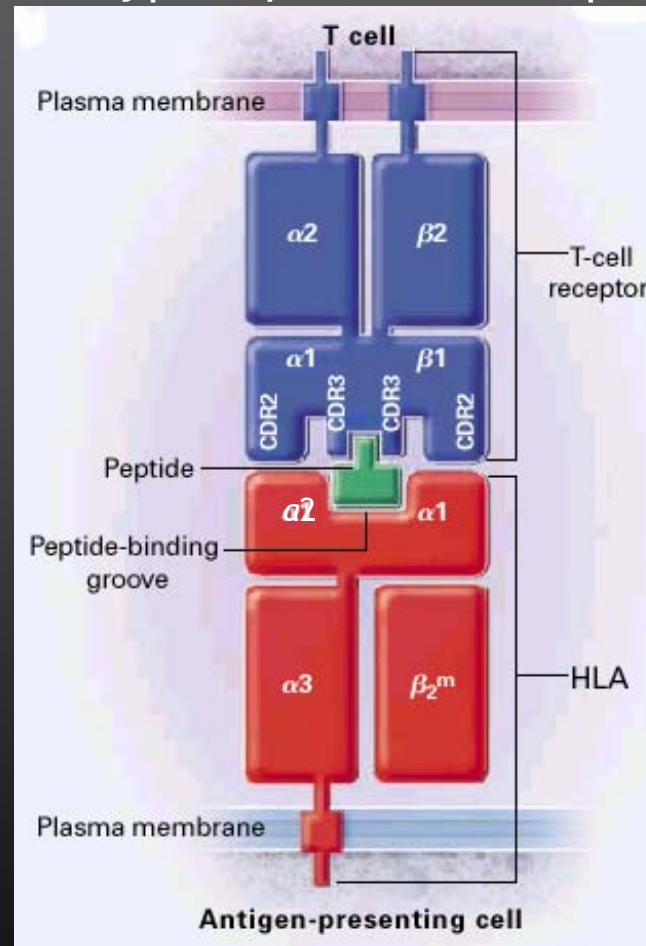
VYAETKHFL

(HLA-A2 ή A24 παρουσιαζόμενων)
στον καρκίνο του πνεύμονα

Επιλογή πεπτιδίων (1)

04/12

Ανίχνευση CD8 T απάντησης έναντι των πεπτιδίων αυτών σε ασθενείς με άλλους τύπους καρκίνου
Υπάρχει απάντηση σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα?



hTERT - 1132aa

Επίτοποι (8-10aa) ενώνονται με τάξης I HLA για να παρουσιαστούν σε CD8 T κύτταρα
Ποια είναι αυτή η αλληλουχία αμινοξέων?

Επιλογή πεπτιδίων (1)

05/12

- Αναγνώριση των πεπτιδίων αυτών με Αντίστροφη Ανοσολογική Στρατηγική (Reverse immunology)
- Ταυτοποίηση επιτόπων για την πλειοψηφία των αντιγόνων των όγκων

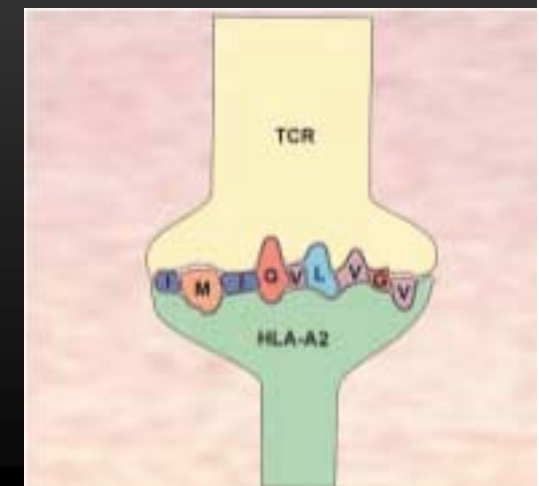
Αλληλουχία αμινοξέων του αντιγόνου πρέπει να είναι γνωστή
Έλεγχος με χρήση αλγορίθμων



Για μικρές αλληλουχίες αμινοξέων (επίτοποι) που μπορούν να
συνδεθούν με μόρια HLA



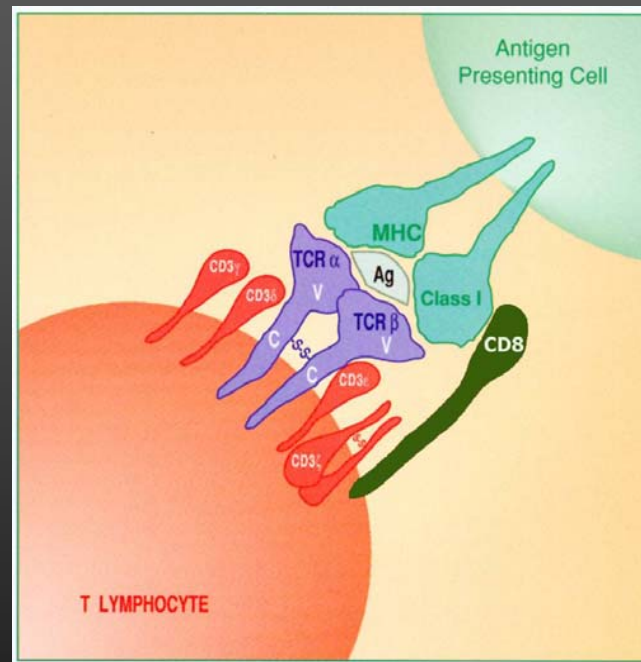
Σύνθεση πεπτιδίων και μελέτη τους



Η ποσοτική εκτίμηση της αυτόματης CD8 T-κυτταρικής απάντησης έναντι 3 πεπτιδίων της hTERT: ILAKFLHWL, RLFFYRKSV, VYAETKHFL

HLA-A2 ή A24 παρουσιαζόμενων

στον καρκίνο του πνεύμονα



Γιατί χρησιμοποιούμε πεπτίδια που παρουσιάζονται από HLA-A2, -A24

- Μεγάλο ποσοστό των Καυκάσιων είναι HLA-A2 και A24
- Τα τετραμερή που υπάρχουν είναι HLA-A2 και A24
- Επιλογή ασθενών μόνο με HLA-A2 ή A24

- PBMC (Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος)

Απομόνωση από περιφερικό αίμα

Ασθενείς / Μάρτυρες (HLA-A2 ή A24)

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

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

ΜΕΡΑ 0

Σύνδεση πεπτιδίων

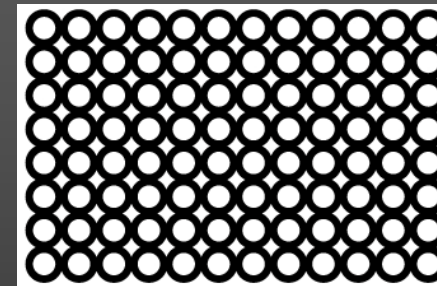
Απόψυξη PBMC

Προσθήκη 3 πεπτιδίων της hTERT

Επώαση για 1 ώρα, 21°C (πρόσδεση στα APC)

Πλύση και προσθήκη θρεπτικού υλικού με ILs

200,000 κύτταρα ανά φρεάτιο (96-300 φρεάτια)



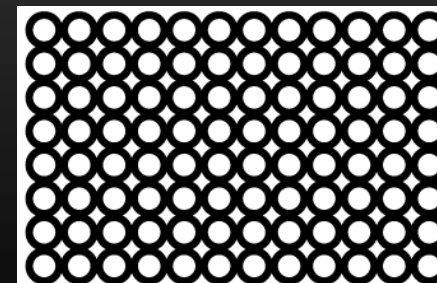
+IL-2, IL-4, IL-7



ΜΕΡΑ 7

Επαναδιέγερση με πεπτίδια

Χρήση EBV B-κυττάρων ως APC



ΜΕΡΑ 14 - Σήμανση με HLA-τετραμερή

09/12

MLPC + Τετραμερές

Επώαση 37°C, 30min



+ CD8-FITC

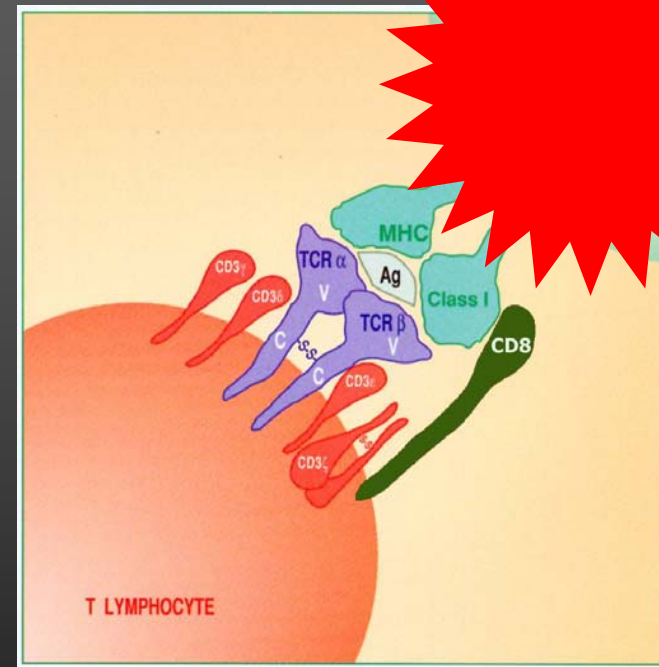
Επώαση 37°C, 30min



Ανάλυση κυττάρων σε κυτταρόμετρο



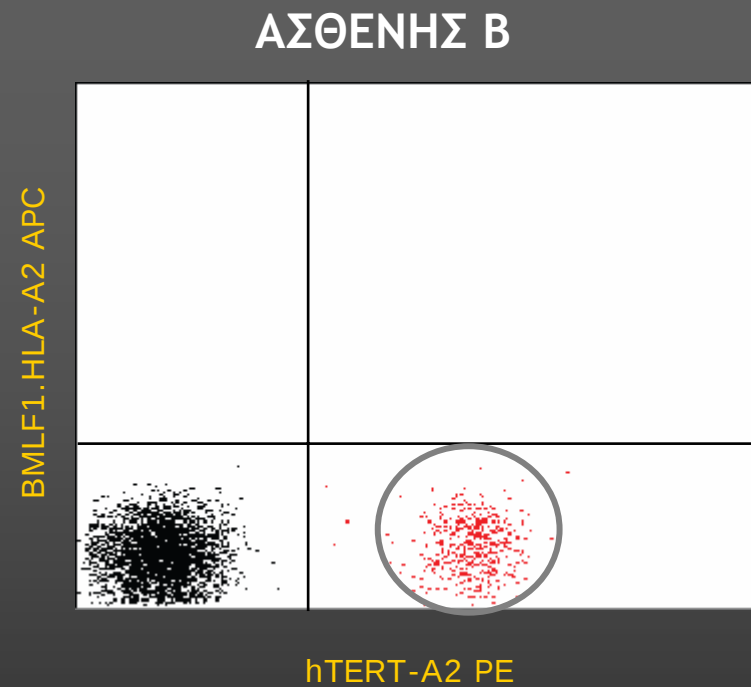
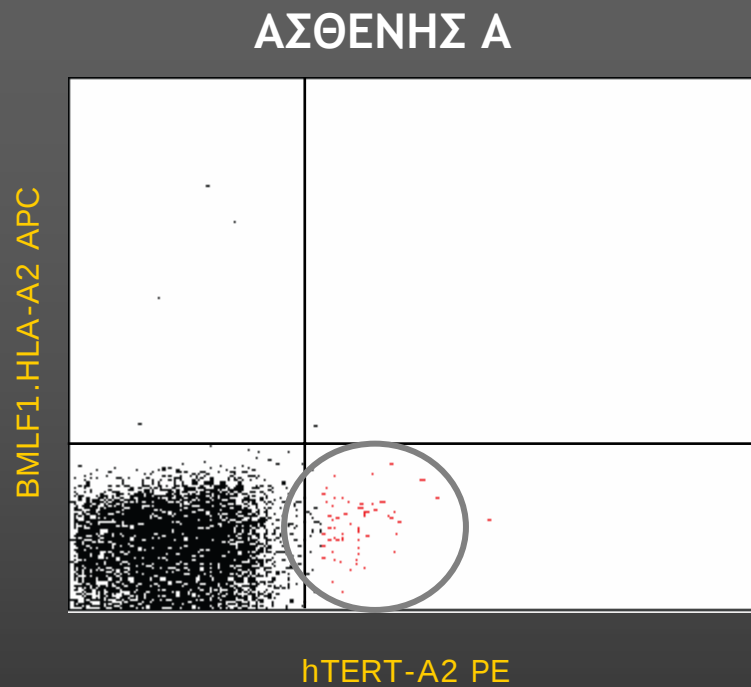
Επαναδιέγερση, ανάλυση και ψύξη



Για κάθε πείραμα γίνονται ~1000 αναλύσεις (1 μήνα)

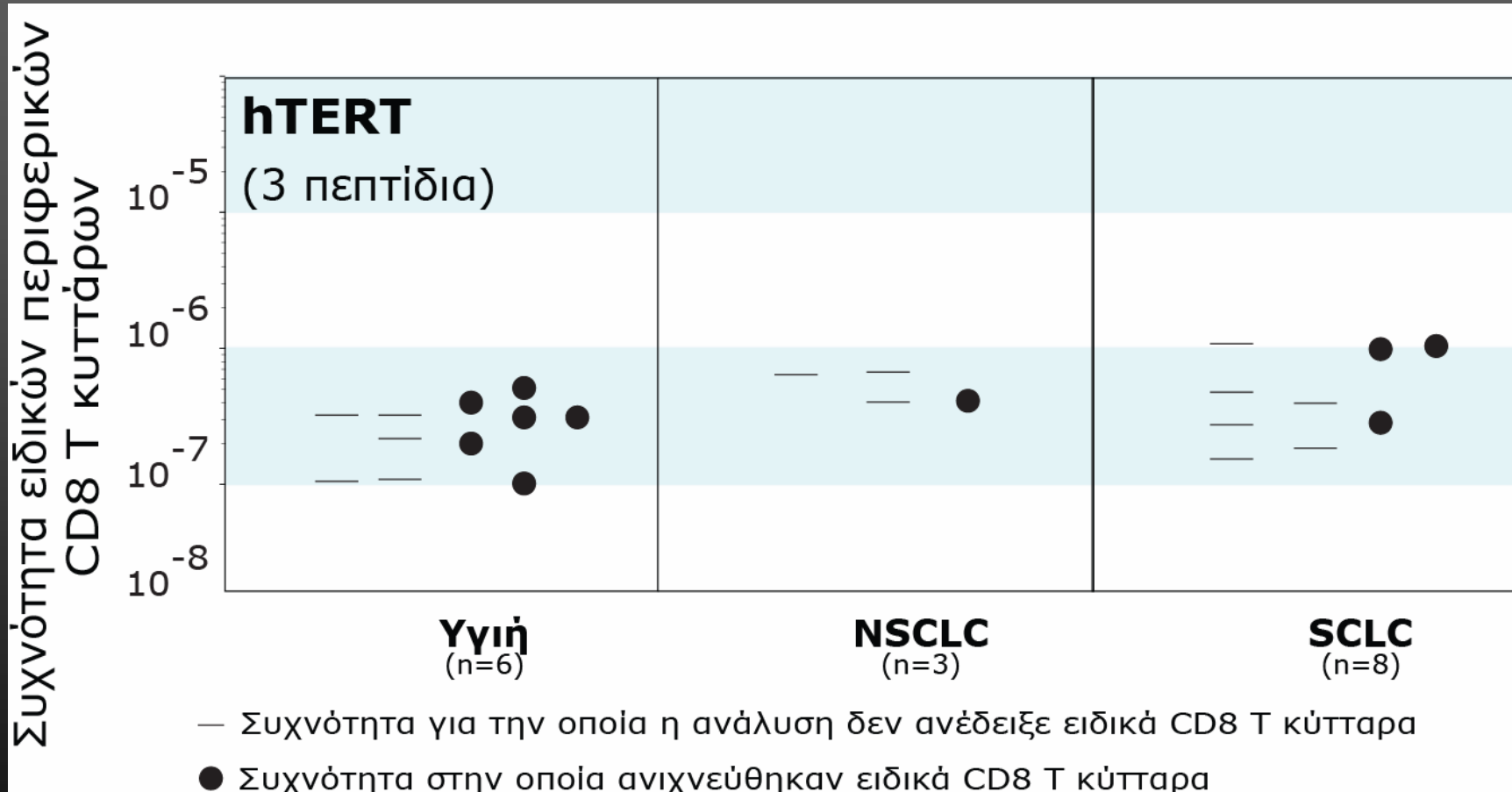
Αποτελέσματα - Περιπτώσεις ασθενών

10/12



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

Κατανομή **σπανίων φαινομένων** κατά Poisson
προσαρμοσμένη για την κλωνικότητα κατά Bernouli



1-3 / 10⁷ CD8

3-11 / 10⁷ CD8

ευχαριστώ!

