ΑΝΤΙ-MAGE-A3 CD8 Τ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Φανή Καλαλά,[1] Φαίη Σούκου,[1] Εύα Γραμουστιάνου,[1] Θεοδώρα Κερενίδη,[2] Γεωργία Καλαφάτη,[3] Κ. Γουργουλιάνης,[2] Α.Ε. Γερμενής,[1] Β. Καρανίκας[1]

[1]Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, [2]Πνευμονολογική Κλινική, [3]Θωρακοχειρουργική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ο βαθμός επιτυχίας της ανοσοθεραπείας των όγκων έχει δειχθεί ότι εξαρτάται από την αυτόματη κυτταρολυτική απάντηση των ασθενών στα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια, η οποία όμως δεν ελέγχεται πάντοτε στις ανάλογες κλινικές δοκιμές. Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με στόχο την αναζήτηση CD8 Τ-κυτταρικών κλώνων έναντι πεπτιδίων του MAGE-A3 στο αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και η σύγκρισή τους με αντίστοιχους κλώνους που ενδεχομένως ανιχνεύονται σε υγιή άτομα.Το συγκεκριμένο αντιγόνο, η δυνατότητα χρήσης του οποίου στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα ελάχιστα έχει διερευνηθεί, μελετήθηκε, επειδή εκφράζεται μόνο από καρκινικά κύτταρα ως αποτέλεσμα μιας γενικευμένης απομεθυλιωτικής διαδικασίας [1].

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

- 5 υγιή άτομα (HLA-A2 ή και HLA-A24)
- 4 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (HLA-A2 ή και HLA-A24)
- 2 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ((HLA-A2 ή και HLA-A24)

ΠΕΠΤΙΔΙΑ (Abgent) – HLA-ΤΕΤΡΑΜΕΡΗ (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels)

MAGE3.A2.PE, FLWGPRALV - MAGE3.A24.PE, TFPDLESEF

ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ – HLA-ΤΕΤΡΑΜΕΡΗ

BMLF1.A2-APC,GLCTLVAML - EBNA3C.A24-APC, RYSIFFDYM

ΜΙΚΤΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (Mixed Lymphocyte-Peptide Culture, MLPC)

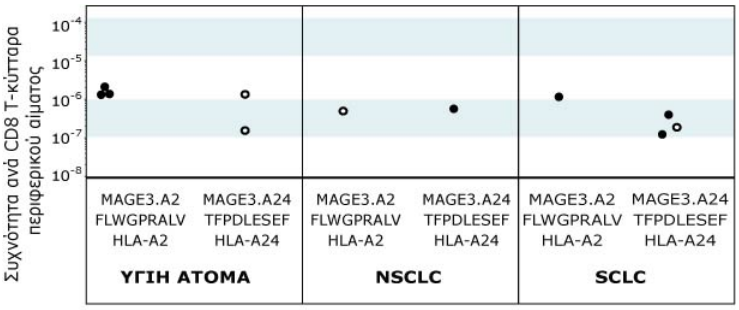
Χρησιμοποιήθηκαν μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) σε συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL σε θρεπτικό υλικό Iscove's, εμπλουτισμένο με 1% ανθρώπινο ορό (Human Serum, HS). Έγιναν χωριστές διεγέρσεις (60 min σε θερμοκρασία δωματίου) με τα υπό έλεγχο πεπτίδια και με τα πεπτίδια ελέγχου (μη σημασμένα) , οι οποίες στη συνέχεια πλύθηκαν, αναμείχθηκαν και το μίγμα κατανεμήθηκε σε φρεάτια πλάκας μικροκαλλιεργειών (ανά φρεάτιο 2 $x10^5$ κύτταρα/ 0,2 mL Iscove's με 10% HS, IL-2, IL-4 και IL-7). Την έβδομη μέρα έγινε επαναδιέγερση με τα ίδια πεπτίδια και την 14η μέρα έγινε χρώση με τα τετραμερή.

ΣΗΜΑΝΣΗ ΜΕ HLA-ΤΕΤΡΑΜΕΡΗ

Κάθε τετραμερές αξιολογήθηκε μετά από σήμανση Τ-κυτταρολυτικών κλώνων της συγκεκριμένης ειδικότητας, τιτλοποιήθηκε και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε στην ιδανική συγκέντρωση, συνήθως 5 nM των βαριών αλυσίδων των HLA [2].

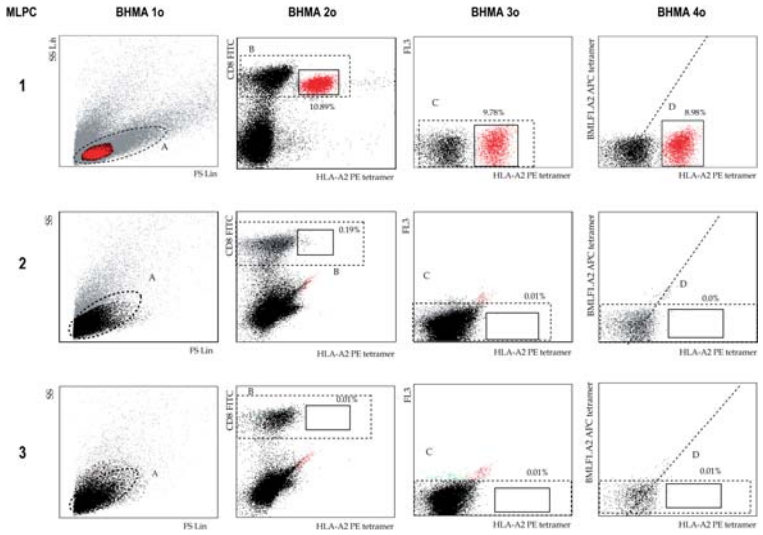
Η σήμανση με τα τετραμερή γινόταν μετά από επώαση των MLPC (30 min, 37°C), με τα HLA-A2 και HLA-A24 τετραμερή. Ακολουθούσε προσθήκη αντι-CD8 FITC-αντισώματος (Immunotech, Beckman-Coulter), επώαση (30 min, 37°C), πλύση, μονιμοποίηση με 0,5% φορμαλδεΰδη και κυτταρομετρική ανάλυση σε FC500 (Beckman-Coulter).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Ειδική CD8 Τ-κυτταρική απάντηση, έναντι ενός τουλάχιστον από τα πεπτίδια του MAGE-A3, ανιχνεύθηκε, τόσο στους υγιείς μάρτυρες, όσο και στους ασθενείς της μελέτης, σε συχνότητα 2–4 ειδικά CTLs ανά 10^7 CD8 κύτταρα. Σε ορισμένους ασθενείς, η συχνότητα των ειδικών CTLs ήταν αυξημένη σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



BHMA 1ο. Αναγνώριση ζώντων λεμφοκυττάρων σύμφωνα με το σκεδαστικό τους πρότυπο.

BHMA 2ο. Κλασικός τρόπος ανάλυσης $CD8^+$/τετραμερή$^+$ κυττάρων.

BHMA 3ο. Διαχωρισμός αυτοφθοριζόντων κυττάρων – Αποκλεισμός αλληλεπίπτωσης φασμάτων PE/ECD. Το κανάλι FL3 (670 nm) παραμένει κενό, αφού στην ανάλυση δεν χρησιμοποιείται φθοριόχρωμα με ανάλογο φάσμα εκπομπής. Κατά συνέπεια, τα σήματα που εντοπίζονται σ' αυτό αντιπροσωπεύουν κύτταρα με έντονο αυτοφθορισμό (MLPC 2 και 3), τα οποία στο Βήμα 2ο εμπίπτουν στο κανάλι της PE και οδηγούν σε ψευδώς αυξημένο ποσοστό θετικών αποτελεσμάτων.

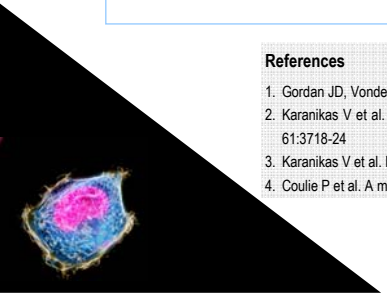
BHMA 4ο. Διαχωρισμός της μη ειδικής σύνδεσης των τετραμερών. Τα τετραμερή συνδέονται μη ειδικά και με άλλους υποδοχείς εκτός των TcR (π.χ. KIR). Τα αντίστοιχα κύτταρα εντοπίζονται πάνω στη διαγώνιο του στικτογράμματος.

Το ελάχιστο ποσοστό CD8 κυττάρων, που μπορούν να σημανθούν με τετραμερή είναι ~0,1%. Η παραπάνω στρατηγική κυτταρομετρικής ανάλυσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, όταν το ποσοστό των $CD8^+$/τετραμερή$^+$ κυττάρων είναι γύρω από αυτό το ποσοστό ανίχνευσης [3].

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙ-MAGE-A3 CD8 ΚΛΩΝΩΝ

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η συχνότητα των ειδικών κλώνων, που στρέφονται έναντι κάθε πεπτιδίου αντιγόνου των όγκων, αναμένεται να είναι ~$4x10^{-7}$ των περιφερικών CD8 κυττάρων. Κατά συνέπεια, σε κάθε πλάκα μικροκαλλιέργειας των 96 φρεατίων, που περιλαμβάνει συνολικά ~$5x10^6$ CD8 κύτταρα, αναμένεται ο εντοπισμός τουλάχιστον δύο ειδικών CD8 κλώνων, οι οποίοι μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά από καλλιέργεια 2 εβδομάδων, όπως περιγράφεται παραπάνω (αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου). Αν μετά από την κυτταροκαλλιέργεια εντοπιστούν περισσότεροι κλώνοι, δηλαδή περισσότερα των δύο $CD8^+$/τετραμερή$^+$ φρεάτια κατά την κυτταρομετρική ανάλυση, η συχνότητα των ειδικών κλώνων υπολογίζεται με βάση την κατανομή των σπανίων φαινομένων κατά Poisson, όπως έχει προσαρμοστεί για την κλωνικότητα κατά Bernouli [4].

Επιτεύχθηκε ποσοτική εκτίμηση της αυτόματης CD8 Τ-κυτταρικής απάντησης έναντι πεπτιδίων της MAGE-A3 σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η παραπέρα μελέτη αυτής της απάντησης θα μπορέσει να εκτιμήσει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν πεπτίδια του MAGE-A3 στην ανοσοθεραπεία της νόσου.



References

1. Gordan JD, Vonderheide R.H. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy* 2002, 4:317-27
2. Karanikas V et al. High frequency of CTL directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Canc Res* 2001, 61:3718-24
3. Karanikas V et al. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J Immunol* 2003, 171:4898-904
4. Coulie P et al. A monoclonal CTL response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *PNAS* 2001, 98:10290

This project is co-funded by the European Union-European Social Fund (25%)
and the National Resources-EPEAEK II (25%)