

ΑΝΤΙ-ΣΑΡΒΙΒΙΝΗ CD8 T-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

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

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

Ο βαθμός επιτυχίας της ανοσοθεραπείας των όγκων έχει δείξει ότι εξαρτάται από την αυτόματη κυτταρολυτική απάντηση των ασθενών στα χρησιμοποιούμενα πεπτιδία, η οποία όμως δεν ελέγχεται πάντοτε στις ανάλογες κλινικές δοκιμές. Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με στόχο την αναζήτηση CD8 T-κυτταρικών κλώνων έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης (survivin) στο αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και η σύγκρισή τους με αντίστοιχους κλώνους που ενδοχόμενως ανιχνεύονται σε υγιή άτομα. Το συγκεκριμένο αντιγόνο μελετήθηκε, επειδή πρόκειται για ευρέως εκφραζόμενη αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, σχετιζόμενη με δυσμενή πρόγνωση, απαραίτητη για την επιβίωση και την ανάπτυξη των όγκων. Ως εκ τούτου, η έκφρασή της αναμένεται να μη καταστέλλεται από μηχανισμούς διαφυγής του όγκου από την ανοσοεπιτήρηση. Τα συγκεκριμένα πεπτιδία της πρωτεΐνης επιλέχθηκαν, επειδή έναντι αυτών έχουν ήδη απομονωθεί CD8 T-κυτταρικοί κλώνοι σε ασθενείς με άλλους τύπους καρκίνου [1].

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

- 7 υγιή άτομα (HLA-A2 ή και HLA-A24)
- 7 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 (Agent) – HLA-TETΡΑΜΕΡΗ (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels)

Survivin.A2-PE, LTLGFLK – Survivin.A24-PE, AYACNTSTL

ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ – HLA-TETΡΑΜΕΡΗ

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

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

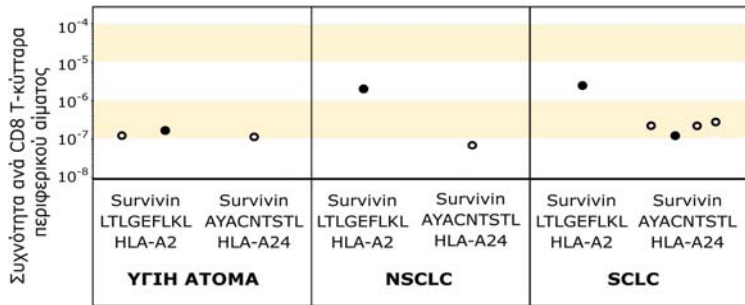
Χρησιμοποιήθηκαν μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) σε συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL σε θρεπτικό υλικό Iscove's, εμπλουτισμένο με 1% ανθρώπινο ορό (Human Serum, HS). Έγιναν χωριστές διεγέρσεις (60 min σε θερμοκρασία δωματίου) με τα υπό έλεγχο πεπτιδία και με τα πεπτιδία ελέγχου (μη σημασιμμένα),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

ΣΗΜΑΝΣΗ ΜΕ HLA-TETΡΑΜΕΡΗ

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

Η σήμανση με τα τετραμερή γίνεται 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, μονομοιοποίηση με 0,5% φορμαλδεΐδη και κυτταρομετρική ανάλυση σε FC500 (Beckman-Coulter).

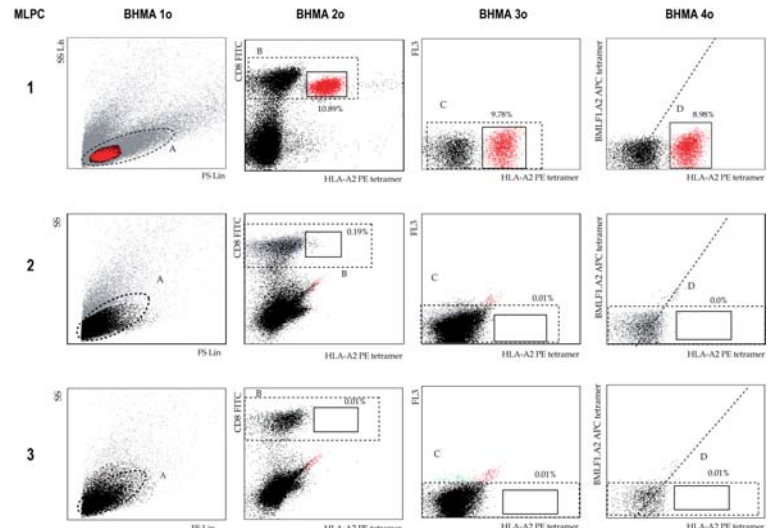
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



• Ο κλώνος δεν προσδιορίστηκε, λόγω του μικρού αριθμού των αρχικά χρησιμοποιηθέντων κυττάρων

Ειδικοί CD8 T-κυτταρικοί κλώνοι έναντι ενός τουλάχιστον πεπτιδίου της σαρβιβίνης προσδιορίστηκαν σε ένα υγιές άτομο και σε 3 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, σε συχνότητα 0,1-3 ανά 10^6 CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος.

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



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

BHMA 2o. Κλασικός τρόπος ανάλυσης CD8⁺/τετραμερή⁺ κυττάρων.

BHMA 3o. Διαχωρισμός αυτοφθορίζοντων κυττάρων – Αποκλεισμός αλληλεπίπτωσης φασμάτων PE/ECD. Το κανάλι FL3 (670 nm) παραμένει κενό, αφού στην ανάλυση δεν χρησιμοποιείται φθοροχρωμα 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 4o. 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 σηματοδοτούν 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-ΣΑΡΒΙΒΙΝΗ CD8 ΚΛΩΝΩΝ

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η συχνότητα των ειδικών κλώνων, που στρέφονται έναντι κάθε πεπτιδίου αντιγόνου των όγκων, αναμένεται να είναι $\sim 4 \times 10^{-7}$ των περιφερικών CD8 κυττάρων. Κατά συνέπεια, σε κάθε πλάκα μικροκαλλιέργειας των 96 φρεατίων, που περιλαμβάνει συνολικά $\sim 5 \times 10^6$ 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 Bernoulli [4].

Για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, επιτεύχθηκε ποσοτική εκτίμηση της αυτόματης CD8 T-κυτταρικής απάντησης έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

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-EPEAK II (25%)

