

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

**Μεταγραφική έκφραση
της ανάστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης
και της 2,3-διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης
στον καρκίνο του πνεύμονα**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΟΔΩΡΑ ΚΕΡΕΝΙΔΗ

Πνευμονολόγος

ΛΑΡΙΣΑ 2008

Τριμελής Επιτροπή

Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ (επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Χ. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Α. ΤΣΕΖΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Ιατρικής

Επταμελής Επιτροπή

Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ (επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Α. ΓΕΡΜΕΝΗΣ

Καθηγητής Ανοσολογίας

Π-Α. ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

Χ. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Α. ΤΣΕΖΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Ιατρικής

Ζ. ΔΑΝΙΗΛ

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

Μ. ΣΠΕΛΕΤΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	4
Συντομογραφίες	15
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	16
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1 ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ hTERT ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	20
1.1 ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ	21
1.1.1 ΤΑAs στον Καρκίνο του Πνεύμονα	25
1.2 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ	26
1.2.1 Ο ρόλος της τελομεράσης στον καρκίνο	30
1.3 Η ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	33
1.3.1 Κλινικές εφαρμογές της τελομεράσης	33
1.3.2 hTERT και ανοσιακή απόκριση	39
1.3.3 Θεραπευτικές προοπτικές της τελομεράσης	42
1.3.4 Συνέκφραση της τελομεράσης με άλλα ΤΑAs	44
2 ΙΔΟ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΟΣΟΔΙΑΦΥΓΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ	47
2.1 2,3 Διοξυγονάση της Ινδολεαμίνης	50
2.1.1 Δομή	51
2.1.2 ΙΔΟ ως ανοσολογικός μεσολαβητής	54
2.1.3 ΙΔΟ και ανοσιακή διαφυγή του καρκίνου	58
2.1.4 ΙΔΟ και καρκίνος του πνεύμονα	63
2.1.5 Θεραπευτικές παρεμβάσεις	65
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
3 ΥΛΙΚΟ	69
4 ΜΕΘΟΔΟΙ	71
4.1 Πειραματικός σχεδιασμός	71
4.2 Κυτταρικές μέθοδοι	71
4.2.1 Συλλογή και επεξεργασία ιστού ασθενών	71
4.2.2 Καλλιέργεια καρκινικών σειρών	72
4.2.3 Διαδικασία ψύξης κυττάρων	72
4.3 Μοριακές μέθοδοι	72
4.3.1 Εκχύλιση RNA	72
4.3.2 Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση RNA	73
4.3.3 Σύνθεση μορίων cDNA	73
4.3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	75
4.3.5 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης	76
4.3.6 Βελτιστοποίηση αντιδράσεων PCR	76
4.3.7 Ημιποσοτική PCR (Semi-quantitative PCR)	77
4.3.8 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR)	78
4.4 Σχετική μεταγραφική έκφραση	78
4.5 Στατιστική ανάλυση	79
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
5.1 Έκφραση της hTERT	80
5.1.1 Έκφραση σε καρκινικές σειρές	80
5.1.2 Έκφραση στα δείγματα των ασθενών	81
5.2 Έκφραση της IDO	87
5.2.1 Έκφραση σε καρκινικές σειρές	87
5.2.2 Έκφραση στα δείγματα των ασθενών	87
5.3 Συνέκφραση της hTERT και της IDO	91
6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	94
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	103
ABSTRACT	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

<u>Όνοματεπώνυμο:</u>	Κερενίδη Θεοδώρα
<u>Ημερομηνία γεννήσεως:</u>	16 – 02 – 1971
<u>Τόπος γεννήσεως:</u>	Λάρισα
<u>Οικογενειακή κατάσταση:</u>	Άγαμη
<u>Διεύθυνση κατοικίας:</u>	Μαγνήτων 32, ΒΟΛΟΣ 38333. Τηλ.: 2421042582 / 6973832751
<u>Διεύθυνση εργασίας:</u>	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας – 411 10 Λάρισα Τηλ.: 2410-682896
<u>e-mail</u>	noraker@gmail.com
<u>Μέση εκπαίδευση:</u>	Ενιαίο Πολυκλαδικό Λύκειο Βόλου 1988 Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα (19 ^{7/9})
<u>Ξένες Γλώσσες:</u>	Αγγλικά, Ρώσικα

ΤΙΤΛΟΙ ΚΑΙ ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

1. Πτυχίο Ιατρικής Σχολής του Κρατικού Ιατρικού Ινστιτούτου Λβοβ, Ουκρανίας 1995. Υπότροφη καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών. Βαθμός Πτυχίου: Άριστα (9,70)
2. Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας «ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ-ΦΥΜΑΤΙΟΛΟΓΙΑΣ» 23/05/2003.

Ι. ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

26/08/1996 - 29/12/1997: Υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι Στομίου, Κ.Υ Γόννων, Νοσοκομείου Λάρισας.

30/12/1997 – 22/01/2003: Ειδικευόμενη 8^η Πνευμονολογικής Κλινικής Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Η ΣΩΤΗΡΙΑ».

12/05/2003 - 6/10/2005: Επιστημονικός Συνεργάτης της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

7/10/2005 – **σήμερα**: Επικουρική Επιμελήτρια Β Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

II. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

A. ΕΚΠΑΙΔΕΥΟΜΕΝΗ

1. Πρόγραμμα εκπαίδευσης στην ειδικότητα της Πληροφορικής, Κ.Ε.Κ ΕΥΚΛΕΙΔΗΣ, Ν.Ν.Θ.Α « Η ΣΩΤΗΡΙΑ» 1999.
2. «Αποκατάσταση ασθενών με νόσους του αναπνευστικού συστήματος: Πνευμονική αποκατάσταση, Αντιμετώπιση άσθματος, Χρόνια νοσήματα » Κ.Ε.Κ Ν.Ν.Θ.Α «Η ΣΩΤΗΡΙΑ» 2000.
3. Ειδικά μαθήματα φυσιολογίας με παράλληλη εκπαίδευση του Νοσοκομείου «ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ» υπό την διεύθυνση του κ. Μ. Βασιλείου, 2002.
4. 3^ο Διατομεακό Μεταπτυχιακό Σεμινάριο «Επίκαιρα Θέματα: Αναπνευστική Ανεπάρκεια» 1998 Αθήνα.
5. Clinical Seminar on: " Diagnostic and Therapeutic Applications of Bronchoscopy", 2nd Mediterranean Congress on Thoracic Diseases, 4-7/03/1998 Athens.
6. 14^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Τι νεώτερο στην Πνευμονολογία 1996-1998» 11-12/04/1998 Αθήνα.
7. Μετεκπαιδευτική ημερίδα Πνευμονολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα: «Νοσήματα Πνευμόνων Μικροβιακής αιτιολογίας, μη λοιμώδη. Σαρκοειδωση» 6/02/1999 Αθήνα.
8. Μαθήματα Εφαρμοσμένης Ψυχιατρικής στην Κλινική Πράξη 2^ο Διεθνές Συνέδριο Ορμόνες Εγκέφαλος και Νευροψυχοφαρμακολογία 15-19/07/2000 Ρόδος.
9. Ημερίδα «Λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού» ΝΝΘΑ «ΣΩΤΗΡΙΑ» 26/05/2001 Αθήνα.
10. 17^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Σύγχρονη επίλυση συχνών διαγνωστικών προβλημάτων» Βρογχολογική Εταιρία 16-17/06/2001 Αθήνα.
11. 1^ο Διεθνές Σεμινάριο «Πνευμονάς & Περιβάλλον 2002», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία 15-17/03/2002 Αθήνα.
12. 18^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Τι νεώτερο στην Πνευμονολογία 2000-2002» Βρογχολογική Εταιρία 25-26/05/2002 Αθήνα.
13. «Νοσήματα του υπεζωκότα» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 25-26/02/2004 Λάρισα.

14. «Καρκίνος του πνεύμονα: Σύγχρονες απόψεις για την διάγνωση και την θεραπεία του». Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία-Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 20/03/2004 Βόλος.
15. «Αεριοαλλεργιογόνα» 27/03/2004 Βόλος.
16. 1^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Χημειοθεραπεία Καρκίνου Πνεύμονα » Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία–Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης-ERS, 28-30/05/2004 Λουτράκι.
17. New perspectives: Chest tumours Integration of research and treatment. ESMO advance course, 17-19/06/2004 Rodos Greece.
18. Βασική Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση και Αυτόματος Εξωτερικός απινιδωτής. Κλινικό φροντιστήριο στα πλαίσια του 13^{ου} Πανελληνίου Πνευμονολογικού Συνεδρίου, 2-5/12/2004 Πάτρα.
19. 2^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Χημειοθεραπεία Καρκίνου Πνεύμονα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία–Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης-ERS, 13-14/05/2005 Ναύπλιο.
20. ERS School Seminar: «Lung Cancer: new aspects in the treatment of Lung Cancer» 1/12/2005 Thessaloniki, Greece.
21. 3^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία, 1/11/2006 Κρήτη.
22. 4^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία–ERS, 10-13/05/2007 Κως .
23. NSCLC–Preceptorship Meeting, Hospital Grosshansdorf, 4–5/4/2008 Hamburg, Germany.
24. Postgraduate seminar on Lung cancer, 1-4/5/2008 Santorini.

B. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΡΙΑ

1. Συμμετείχε ως εκπαιδύτρια στο πρόγραμμα εκπαίδευσης ιατρών της 8ης πνευμονολογικής κλινικής (1998-2002) με διάφορα θέματα πνευμονολογίας καθώς και στο πρόγραμμα εκπαίδευσης, ιατρών της πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2003-σήμερα) με θέματα που αφορούσαν τον καρκίνο του πνεύμονα.

2. 17^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Σύγχρονη επίλυση συχνών διαγνωστικών προβλημάτων» Βρογχολογική Εταιρία, 16-17/06/2001 Αθήνα, με θέμα: Διάχυτη παρεγχυματική πάθηση και Ογκόμορφες βλάβες πνεύμονα πολλαπλές.
3. 18^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Τι νεώτερο στην Πνευμονολογία 2000-2002» Βρογχολογική Εταιρία ,25-26/05 Αθήνα, με θέμα: Βρογχοκυψελлиδικό Καρκίνωμα – MALT Λέμφωμα.
4. Εκπαιδευτικό σεμινάριο « Συνήθη αναπνευστικά προβλήματα στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας ».Ελληνική Εταιρία Έρευνας & Εκπαίδευσης στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας, 12-14/11/2004 Καρπενήσι, με θέμα: Νεοπλάσματα αναπνευστικού.
5. Εκπαιδευτικό σεμινάριο «Μαθήματα Πνευμονολογίας» Γενικό Νοσοκομείο Βόλου 22/2/2005 με θέμα: Συζήτηση ασθενών με νεοπλάσματα πνεύμονα.
6. Επιμορφωτικά Προγράμματα Νοσηλευτικής, ΤΕΙ Λάρισας 17/3/2005, με θέμα: Νεοπλάσματα πνεύμονα.
7. Διδασκαλία στους φοιτητές του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του μαθήματος πνευμονολογίας για το χειμερινό εξάμηνο του Ακ. Έτους 2006-2007 και 2007-2008.
8. Πρόγραμμα εκπαιδευτικών δραστηριοτήτων του Εργαστηρίου Ακτινολογίας- Ιατρικής Απεικόνισης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ακ. Έτος 2006-2007, με θέμα: Καρκίνος του Πνεύμονα
9. Πρόγραμμα εκπαιδευτικών δραστηριοτήτων του Εργαστηρίου Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ακ. Έτος 2005-2006, με θέματα: 1. Lung Cancer, 2. Telomerase and hTERT in Lung Cancer.
10. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας «Πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας», με θέμα: Παρενέργειες της χημειοθεραπείας- Αντιμετώπιση του πόνου ασθενών με καρκίνο. 30/11/2007.
11. Επιστημονική υπεύθυνη μεταπτυχιακής εργασίας στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα του Ιατρικού Τμήματος του Π.Θ. «Πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας» 2008 με θέμα: Πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση του Καρκίνου.
12. 2^ο Εκπαιδευτικό φροντιστήριο «Εκπαίδευση στην Πνευμονολογία: Συνδυάζοντας την τεκμηριωμένη θεωρία με την κλινική πράξη» της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρίας 30/5-1/6/2008, Λουτράκι με θέμα: Προσέγγιση του ασθενούς με καρκίνο του πνεύμονα: Θεραπευτικά διλήμματα.

ΙΙΙ. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

A. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Μέλος ερευνητικής ομάδας στα ερευνητικά προγράμματα:

1. **ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ ΙΙ** (4.2.1.ε1)- *Μελέτη της ανοσιακής απάντησης έναντι ευρέως εκφραζομένων αντιγόνων των όγκων, στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, με στόχο την χρήση τους στην ανοσοθεραπεία.* Επιστημονικός Υπεύθυνος: Α. Γερμενής.

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

2. **IRTA LUNG IIF** (021795)- *Evaluation of Immune Responses Against Highly Expressed Tumors Antigens in Non- Small Cell Lung Carcinoma: Prospects for Immunotherapy.* Επιστημονικός Υπεύθυνος: Α. Γερμενής.

Marie Curie Incoming International Fellowship.

3. **IMMUNOEPIGENETICS IRG** (046459)- *Anti tumor CD8 immunity influenced by epigenetic alterations* Επιστημονικός Υπεύθυνος: Α. Γερμενής.

Marie Curie International Reintegration Grant.

4. **ENTER 04** (EP09/8.3.3)- *Selection of Immunostimulating Overexpressed Tumor Antigens/Epitopes in Lung Cancer Adenocarcinoma.* Επιστημονικός Υπεύθυνος: Α. Γερμενής.

E.U.-European Social Fund (75%), Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

5. **ΕΠΑν 05** (NON/EU445)- *Immunoepigenetics of Adenocarcinoma: Impact on Successful Cancer Immunotherapy.* Επιστημονικός Υπεύθυνος: Α. Γερμενής.

E.U.-European Social Fund (75%), Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

B. ΒΡΑΒΕΙΑ

1. 1^ο βραβείο του επάθλου «Σωτήρης Παπασταμάτης» Ιατρική Εταιρεία Αθηνών για την εργασία: Επιγενετικά επαγωγίμη έκφραση του χαρακτηριστικού των ρυθμιστικών T-κυττάρων γονιδίου Foxp3 σε σειρές ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων και σε δείγματα όγκων. Καρανίκας Β, Σπελέτας Μ, Ζαμανάκου Μ, Καλαλά Φ, Λουλές Γ, **Κερενίδη Θ**, Γουργουλιάνης ΚΙ, Γερμενής Α. 33^ο Πανελλήνιο Ιατρικό συνέδριο 2-5/05/2007 Αθήνα.

2. 2^ο βραβείο καλύτερης επιστημονικής ανακοίνωσης με τίτλο: Προσδιορισμός του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Δαλαβέρης Ε, **Κερενίδη Θ**, Κατσαμπέκη Α, Τανού Κ, Κυρόπουλος Θ, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης ΚΙ, Κωστίκας Κ. 16^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.
3. Έπαινος για την καλύτερη επιστημονική ανακοίνωση στον καρκίνο του πνεύμονα με τίτλο: Έκφραση του χαρακτηριστικού των ρυθμιστικών Τ-κυττάρων γονιδίου Foxp3 στον καρκίνο του πνεύμονα. Καρανίκας Β, Ζαμανάκου Μ, Σπελέτας Μ, Λουλές Γ, Καλαλά Φ, **Κερενίδη Θ**, Νάκου Μ, Dahabreh J, Γουργουλιάνης ΚΙ, Γερμενής ΑΕ. 16^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.
4. 1^ο βραβείο: Νέοι ορίζοντες στην έρευνα κατά του καρκίνου: Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for Immunotherapy. Καρανίκας Β, Τσόχας Σ, Μπούκας Κ, **Κερενίδη Θ**, Νάκου Μ, Dahabreh J, Πουλαράκης Τ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Γερμενής Α. 4^ο Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας (IGBF), 3/02/2008 Αθήνα.

Γ. ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ:

1. Γ. Παυλάκου, Α. Τσαρουχά, **Θ. Κερενίδη**. Διάχυτη παρεγχυματική πάθηση και Ογκόμορφες βλάβες πνεύμονα πολλαπλές *ΠΝΕΥΜΩΝ* 14 (2β) : 76-77, 2001.
2. Α. Ράπτη , Α. Τσαρουχά , **Θ. Κερενίδη** , Ζ. Παναγόπουλος. Βρογχοκυψελлиδικό Καρκίνωμα – MALT Λέμφωμα . *ΠΝΕΥΜΩΝ* 15 (2β) :194-195, 2002.
3. Συμμετοχή στη συγγραφή του βιβλίου: Κλινική αξιολόγηση ακτινολογικών εικόνων στην πνευμονολογία. Κ.Ι. Γουργουλιάνης, 2005.
4. Γραπτό Συμπόσιο στην Πνευμονολογία, Καρκίνος Πνεύμονα, Ιατρική 89(1);80-93, 2006.
5. Lung Cancer, Current Diagnosis and treatment, The Solitary pylmonary nodule. 8: 75-83, Patras 2007.

Δ. ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΗ ΟΜΙΛΗΤΡΙΑ

1. Ημερίδα « Καρκίνος του πνεύμονα: Σύγχρονες απόψεις για την διάγνωση και την θεραπεία του ». Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία-Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 20/ 03 /2004 Βόλος, με θέμα: *Θεραπεία μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα*.

2. Ημερίδα «Αέρια ρύπανση στην περιοχή μας και επιπτώσεις στην υγεία» Ιατρικός Σύλλογος Μαγνησίας-Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 22/05/2004 Βόλος, με θέμα: *Αέρια ρύπανση και καρκίνος του πνεύμονα.*
3. 2^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Χημειοθεραπεία Καρκίνου Πνεύμονα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία-Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης-ERS 13-14/05/2005 Ναύπλιο, με θέμα: *Αντιμετώπιση Εμπύρετης Ουδετεροπενίας.*
4. «Ημέρες Πνευμονολογίας 2006» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 22-24/09/2006 Λάρισα, με θέμα: *Βιολογία της IDO.*
5. «5th International Congress on Lung Cancer» Hellenic Society Against Lung Cancer 24-27/01/07 Patras, Greece, με θέμα: *The solitary pulmonary nodule.*
6. 4^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία-ERS 10-13/05/2007 Κως, με θέμα: *Πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία ΜΜΚΠ-Μελλοντικοί στόχοι.*
7. Εκδήλωση της Roche «Με οδηγό την Αγγειογένεση στην αντιμετώπιση του Μη-Μικροκυτταρικού Καρκίνου του Πνεύμονα» 13-15/07/2007 Σούνιο, με θέμα: *Κυτταρικά μονοπάτια με «προορισμό» την αγγειογένεση. Ο ρόλος του VEGF στο ΜΜΚΠ.*
8. «Ημέρες Πνευμονολογίας 2007» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 21-22/09/2007 Βόλος, με θέμα: Συχνά προβλήματα στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.
9. 2^ο Συνέδριο Επιστημόνων Φροντίδας Χρόνιων Πασχόντων, 8-11/11/2007 Λάρισα, με θέμα: Αιματολογικές Παρενέργειες της Χημειοθεραπείας.
10. Postgraduate seminar on Lung cancer, 1-4/5/2008 Santorini, με θέμα: Novel vaccines-Immunotherapy.
11. 2^η Πανελλήνια διημερίδα Πνευμονολογίας, 6-8/6/2008 Σέρρες με θέμα: Νεότερα δεδομένα στην θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Ε. ΣΤΡΟΓΓΥΛΑ ΤΡΑΠΕΖΙΑ

1. Πρόεδρος σε στρογγυλό τραπέζι στις «Ημέρες Πνευμονολογίας 2006» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 22-24/09/2006 Λάρισα, με θέμα: Καρκίνος Πνεύμονα.
2. Πρόεδρος σε στρογγυλό τραπέζι στο 2^ο Συνέδριο Επιστημόνων Φροντίδας Χρόνιων Πασχόντων, 8-11/11/2007 Λάρισα, με θέμα: Παρενέργειες της Χημειοθεραπείας και Ακτινοθεραπείας.

3. Σχολιαστής σε στρογγυλό τραπέζι στο Postgraduate seminar on Lung cancer, 1-4/5/2008 Santorini, με θέμα: Novel therapeutics-the future.

Z. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Gogou E, **Kerenidi Th**, Chamos V, Zintzaras E, Gourgoulialis KI. Mesothelioma Mortality in Greece from 1983 to 2003. *Int J Clin Pract* 2007, Jun 15.
2. Karanikas V, Zamanakou M, **Kerenidi T**, Dahabreh J, Hevas A, Nakou M, Gourgoulialis KI, Germanis AE. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2007, 6:1258-62.
3. Karanikas V, Tsohas S, Boukas K, **Kerenidi T**, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gourgoulialis KI, Germanis AE. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2007, 7:345-52.
4. Katsabeki-Katsafli A, **Kerenidi T**, Kostikas K, Dalaveris E, Kiropoulos TS, Gogou E, Papaioannou AI, Gourgoulialis KI. Vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2008, 60:271-6.
5. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, **Kerenidi T**, Gourgoulialis KI, Germanis AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Translational Med* 2008, 6:19.
6. Karanikas V, Soukou F, Kalala F, **Kerenidi T**, Gourgoulialis KI, Germanis AE. Low frequency of cytolytic CD8+ T cell precursors specific for survivin and survivin-2B in cancer patients: A caveat for immunotherapy? *Clin Immunol* (accepted for publication).
7. Dalaveris E, **Kerenidi T**, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Lada M, Tanou K, Gourgoulialis KI, Kostikas K. VEGF, TNF- α and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* (submitted).
8. Bartziokas K, Daenas C, Zygoulis P, Triantaris A, Daniil Z, **Kerenidi T**, Makris D, Gourgoulialis KI. Vibration response imaging for the evaluation of community acquired pneumonia. *Eur Respir J* (submitted)

H. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Rapti A, Perros I, Tsigou E, Katsouda E, **Kerenidi N**, Sakelaropoulos A, Anagnostopoulou O. Information for Lung Cancer patient entering a randomized clinical trial for chemotherapy. 3rd International Congress on Lung Cancer, 31/10-4/11/1998 Rodos.
2. **Kerenidi N**, Rapti A, Panagopoulos Z, Tsaroucha A, Arapis J, Anagnostopoulou O. Relationship between Lung Cancer and COPD. E.R.S. annual congress, 9-13/10/1999 Madrid, Spain.
3. Rapti A, Sakelaropoulos A, Perros I, Arapis J, Tsigou E, Katsouda E, **Kerenidi N**, Anagnostopoulou O. Informed versus randomized consent to clinical trials for Lung Cancer. E.R.S. annual congress, 9-13/10/1999 Madrid, Spain.
4. Angelis P, Kollia S, **Kerenidi Th.**, Konstantinidi O, Alikakou B, Goritsas C, Diakalis CH, Ferti A. Unusual Clinical Manifestations of Tuberculosis in non HIV Immunosuppressed Patients. 3rd Mediterranean Congress on Thoracic Diseases, 1-4/11/2000 Crete.
5. Goritsas C, **Kerenidi Th**, Batsakis Chr, Hasapis Chr, Zervas El, Angelis P, Ferti Ang. Arterial oxygenation abnormalities in cirrhotics. Prevalence and predictive factors in Hepatopulmonary Syndrome. 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver 18-21/04/2002 Madrid.
6. Rapti Ag, Malamis D, Anastasakou Eu, **Kerenidi Th**, Giozos G, Malagari Aik, Anagnostopoulou O. Interleukin-18 and TNF in Sarcoidosis. 12th ERS Annual Congress 14-18/09/2002 Stockholm.
7. Malamis D, Rapti Ag, Tsaroucha A, **Kerenidi Th**, Kastrinakis N, Konstandoulakis P, Anagnostopoulou O. Evaluation of PCR for the rapid diagnosis of TBC pleuritis. Detection of two different DNA sequences. 12th ERS Annual Congress 14-18/09/2002 Stockholm.
8. **Kerenidi Th.**, Goritsas C, Batsakis Chr, Hasapis Chr, Varouha M, Angelis P, Ferti Ang. Hepatopulmonary Syndrome. Diagnostic approach. 12th ERS Annual Congress 14-18/09/2002 Stockholm.
9. Rapti A, **Kerenidi T**, Tsaroucha E, Tsagouli S, Giozos G, Panagopoulos Z, Arapis G, Anagnostopoulou OA. randomized study of preventive activity of amifostine against docetaxel induced neurotoxicity in advanced non- small cell lung cancer. ESMO Summer Educational Conference, 19-22/6/2003 Edinburgh, Scotland, UK.

10. Pratti A, **Kerenidi Th**, Papageorgiou E, Gatselos G, Naoum A, Vasdeki A, Zachopoulos Th, Kyriakou D. Antithrombin III, D-Dimmer Levels and Inflammation markers in Lung Cancer Patients. 30th World Congress of the International Society of Hematology, 28/9-2/10/2005 Istanbul, Turkey
11. Gogou E, **Kerenidi Th**, Chamos V, Zintzaras E, Gourgoulisanis KI. Mesothelioma Mortality in Greece from 1983 to 2003. 16th ERS Annual Congress 2-6/09/2006 Munich, Germany
12. **Kerenidi Th**, Zigoulis P, Karetsi E, Gerogianni I, Papadopoulos D, Gourgoulisanis KI. Recurrent spontaneous pneumothorax in uterine leiomyoma of uncertain malignant potential. 16th ERS Annual Congress 2-6/09/2006 Munich, Germany.
13. Katsabeki A, **Kerenidi T**, Kostikas K, Kiropoulos T, Dalaveris E, Gourgoulisanis K. Vascular endothelial growth factor and oxidative stress in patients with primary lung cancer. 17th ERS Annual Congress 15-19/09/2007 Stockholm.
14. Dalaveris E, **Kerenidi T**, Kostikas K, Kiropoulos T, Katsabeki A, Gourgoulisanis K. Pretreatment levels of TNF- α in serum and exhaled breath condensate in patients with lung cancer. 17th ERS Annual Congress 15-19/09/2007 Stockholm.
15. Koutsokera A, Daniil Z, Papaloannou AI, Kiropoulos T, Katsabeki A, **Kerenidi T**, Gourgoulisanis KI. Oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis: the role of systemic corticosteroids. 17th ERS Annual Congress 15-19/09/2007 Stockholm.
16. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, **Kerenidi T**, Gourgoulisanis KI, Germanis AE. Foxp3 expression in human cancer cells. 8th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, 14-17/02/2008 Berlin.
17. Karanikas V, Soukou F, Kalala F, **Kerenidi T**, Gourgoulisanis KI, Germanis AE. Low-frequency CD8+ T cell precursors specific for survivin and survivin-2B in cancer patients: A caveat for immunotherapy? 8th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, 14-17/02/2008 Berlin.
18. Karanikas V, Tsochas S, Boukas K, **Kerenidi T**, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gourgoulisanis KI, Germanis AE. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for Immunotherapy. International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO 2008), 5-8/03/2008 Amsterdam.

19. Karanikas V, Soukou F, Kalala F, **Kerenidi T**, Gourgoulianis KI, Germenis AE. Low-frequency CD8+ T cell precursors specific for survivin and survivin-2B in cancer patients: A caveat for immunotherapy? International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO 2008), 5-8/03/2008 Amsterdam.
20. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Barda A, **Kerenidi T**, Gourgoulianis KI, Germenis AE. Foxp3 expression in human cancer cells. International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO 2008), 5-8/03/2008 Amsterdam.
21. Karanikas V, Soukou F, Zamanakou M, Kalala F, Grammoustianou ES, **Kerenidi T**, Gourgoulianis KI, Germenis AE. Quantitative and qualitative assessment of anti-tumour specific T cells in patients with lung cancer and cancer free individuals. International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO 2008), 5-8/03/2008 Amsterdam.
22. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, **Kerenidi T**, Gourgoulianis KI, Germenis AE. Foxp3 expression in human cancer cells. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, 12-16/04/2008 San Diego USA
23. Katsampeki-Katsafli A, **Kerenidi T**, Kostikas K, Kiropoulos T, Dalaveris E, Gourgoulianis KI. High pre-treatment serum levels of VEGF and oxidative stress in lung cancer patients and their clinical implications. 1st European Lung Cancer Conference, 23-26/04/2008 Geneva.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ:

- ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
- ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
- EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY (ERS)
- NATIONAL LUNG CANCER PARTNERSHIP
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER.
- Μέλος της Ομάδας Εργασίας Καρκίνου του Πνεύμονα της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας.
- Μέλος της Ομάδας Εργασίας Thoracic Oncology της ERS.

Συντομογραφίες

1MT	(1-methyl-tryptophan): 1-Μεθυλ-τρυπτοφάνη
APC	(antigen presenting cell): αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
CTLA4	(cytotoxic T- lymphocyte antigen 4): Αντιγόνο 4 των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων
CTLs	(cytotoxic T- lymphocytes): Κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα
DC	(Dendritic cell): Δενδριτικό κύτταρο
HLA	(Human leukocyte antigen): Ανθρώπινο αντιγόνο λευκοκυττάρου αίματος
hTERT	(human telomerase reverse transcriptase): Ανθρώπινη ανάστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης
IDO	(Indoleamine 2,3- dioxygenase): 2,3-Διοξυγονάση της ινδολεαμίνης
IFN-γ	(Interferon -γ): γ- Ιντερφερόνη
ΚΠ	Καρκίνος πνεύμονα
MHC	(Major histocompatibility complex): Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
ΜΚΠ	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
ΜΜΚΠ	Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
MSCs	(Myeloid suppressor cells): Μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα
NK	(Natural killer cell): Φυσικό κυτταροκτόνο κύτταρο
PBMCs	(Peripheral blood mononuclear cells): Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
pN	Παθολογοανατομικός χαρακτηρισμός της διήθησης των λεμφαδένων
pstage	Παθολογοανατομικός χαρακτηρισμός του σταδίου της νόσου
pT	Παθολογοανατομικός χαρακτηρισμός του όγκου
qRT-PCR	(quantitative real time - polymerase chain reaction): Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου
PCR	(polymerase chain reaction): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Ta	(Telomerase activity): Ενεργότητα της τελομεράσης
TA	(Tumor antigen): Αντιγόνο του όγκου
TAA	(Tumor-associated antigen): Συνδεδεμένο με τον όγκο αντιγόνο
TERC	(telomerase RNA component): RNA υπομονάδα της τελομεράσης
TILs	(Tumor infiltrating lymphocytes): Λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο
Treg	(T regulatory lymphocytes): Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα
TSA	(Tumor specific antigens): Ειδικά των όγκων αντιγόνα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν διάφορα σχετιζόμενα με τον όγκο αντιγόνα, ικανά να διεγείρουν ειδικές ανοσιακές αποκρίσεις, προκειμένου ο οργανισμός να αντιταχθεί στη δημιουργία και ανάπτυξη του όγκου. Στον καρκίνο του πνεύμονα παρότι θεωρείται ένας από τους λιγότερο ανοσογονικούς καρκίνους γίνεται μεγάλη προσπάθεια αναγνώρισης TAAs, γεγονός που αποκτάει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή εμβολίων στο πλαίσιο ανοσοθεραπείας. Το θέμα έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τη βιβλιογραφία και έχουν αναγνωριστεί μια πληθώρα TAAs στον καρκίνο του πνεύμονα, μεταξύ των οποίων και η hTERT. Αποτελεί ένα υπερεκφραζόμενο αντιγόνο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, προάγοντας με αυτόν τον τρόπο την καρκινογένεση.

Από την άλλη πλευρά, η διαρκώς αυξανόμενη γνώση αναφορικά με τους μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής που διαθέτει, αλλά και αναπτύσσει ο ξενιστής στην πορεία της ογκογένεσης, προσανατολίζει την ερευνητική προσπάθεια προς αυτήν την κατεύθυνση. Φαίνεται ότι το ανοσιακό σύστημα στερείται της ικανότητάς του να αναπτύσσει ικανή ανοσιακή απόκριση και εγκαθιστά ανοσιακή ανοχή. Οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό είναι πολλοί και πολύπλοκοι, ενώ οι μεταβολικοί περιορισμοί είναι ένας από αυτούς. Η ενεργοποίηση του ενζύμου IDO, αποικοδομώντας την τρυπτοφάνη στερεί από τα T κύτταρα ένα από τα πιο βασικά αμινοξέα, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Η IDO συνδέθηκε αρχικά με τη φλεγμονή, την περιφερική ανοχή και την ανοχή της μητέρας προς το έμβρυο, πρόσφατα όμως αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται και στην ανοσοδιαφυγή του καρκίνου.

Στο πλαίσιο των προσπαθειών καταπολέμησης του καρκίνου μέσω διέγερσης του ανοσιακού συστήματος, μέχρι σήμερα έχουν δοκιμαστεί ή δοκιμάζονται σε κλινικές μελέτες δεκάδες καρκινικά αντιγόνα, με φτωχά, όμως, αποτελέσματα. Η μελέτη των TAAs, αλλά και των ανοσοκατασταλτικών μορίων είναι ιδιαίτερα σημαντική στον καρκίνο του πνεύμονα, όπου η ανοσοθεραπεία προβάλλει ως εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση, συμβάλλοντας στη βελτιστοποίηση του σχεδιασμού των ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η ανίχνευση σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα της μεταγραφικής έκφρασης της hTERT, ενός TAA που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση, καθώς και η ανίχνευση της μεταγραφικής έκφρασης της IDO που αποτελεί ένα ανοσοκατασταλτικό μόριο, το οποίο έχει μελετηθεί ελάχιστα στον καρκίνο του πνεύμονα. Η έκφρασή τους μελετήθηκε τόσο σε καρκινικό ιστό όσο και σε παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό, ενώ έγινε προσπάθεια συσχέτισης της

έκφρασης τους με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους και με την επιβίωση των ασθενών.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας και σε υλικό ασθενών της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του χρηματοδοτούμενου από την Ευρωπαϊκή Ένωση ερευνητικού προγράμματος IRTALUNG.

Θα πρέπει τυπικά να ακολουθήσουν οι ευχαριστίες οι οποίες όμως για μένα είναι ουσιαστικές. Στον επιβλέποντα τη διδακτορική μου διατριβή, σεβαστό μου Καθηγητή Πνευμονολογίας και Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου, τόσο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όσο και για την πολύτιμη βοήθεια του, την καθοδήγηση του και τις συμβουλές του καθ' όλη την πορεία της μελέτης. Πρωταρχικώς όμως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί ήταν η αιτία να βρεθώ στον χώρο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας. Η άπογη συνεργασία μας και η ατέρμονη υποστήριξη του, αποτέλεσαν την προϋπόθεση για την ανάπτυξη της οποιαδήποτε κλινικής και ερευνητικής μου προσπάθειας και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, ο λόγος για να συνεχίσω να αγωνίζομαι. Τις θερμές ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους εκφράζω επίσης, στα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τους Αναπληρωτές Καθηγητές κκ. Χ. Παπανδρέου και Α. Τσέζου.

Η διδακτορική μου διατριβή έγινε η αφορμή να γνωρίσω και να συνεργαστώ με τον Καθηγητή Ανοσολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Αναστάσιο Γερμενή, τον οποίο και ευχαριστώ από καρδιάς για τον καθοριστικό ρόλο του στη διεξαγωγή της μελέτης αυτής. Με μύησε στο θαυμαστό κόσμο της ανοσολογίας, με στήριξε σε κάθε δύσκολη στιγμή και η στάση του ως επιστήμονα και ως ανθρώπου, αποτελούν για μένα παράδειγμα ζωής.

Ανεκτίμητη υπήρξε η βοήθεια, η στήριξη και η καθοδήγηση που μου προσέφερε μεθοδικά και ακούραστα ο συνεργάτης του Εργαστηρίου, EU Marie-Curie Fellow Βάιος Καρανίκας όλο αυτό το διάστημα και τον ευχαριστώ βαθύτατα. Ειλικρινές ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας και ιδιαίτερος στον Στέφανο Τσόχα και στην Μαρία Ζαμανάκου για τη συνεργασία τους και τη βοήθειά τους σε όλα τα στάδια διεξαγωγής της μελέτης.

Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω, επίσης, και στους συναδέλφους που συνεργάστηκαν σε αυτή τη μελέτη: τον κ. Α. Χέβα από το θωρακοχειρουργικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, τον κ. J. Dahabreh από το

θωρακοχειρουργικό τμήμα του Ιατρικού Κέντρου Αθηνών καθώς και την κ. Μ. Νάκου από το Παθολογοανατομικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Δεν θα μπορούσα να μην αναγνωρίσω τη συνδρομή στη διαμόρφωση της ιατρικής μου υπόστασης, των δύο δασκάλων μου από τα χρόνια της ειδικότητας, καταθέτοντας δημόσια τις ευχαριστίες μου. Ο επιμελητής μου στην Παθολογική κλινική του «Σωτηρία» κ. Κ. Γκορίτσας, μου ενέπνευσε την αγάπη και την έγνοια για τον ασθενή, ενώ η επιμελήτρια μου στην 8^η Πνευμονολογική κλινική κ. Α. Ράπτη, αποτέλεσε αφορμή και υπόδειγμα για την περαιτέρω ενασχόλησή μου με τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

Πάνω από όλα, όλοι οι ασθενείς μου και το συγγενικό τους περιβάλλον αξίζουν ένα τεράστιο ευχαριστώ για τη συνεργασία τους, την εμπιστοσύνη και αγάπη που διέκρινε στα μάτια τους και την κατανόηση που έδειξαν, όταν η ιατρική αδυνατούσε να τους προσφέρει ουσιαστική βοήθεια και η ψυχολογική υποστήριξη ήταν η μόνη ανακούφισή τους. Αν μπόρεσα να βοηθήσω έστω και στο ελάχιστο αυτούς τους ανθρώπους, είναι η μεγαλύτερη ικανοποίησή μου.

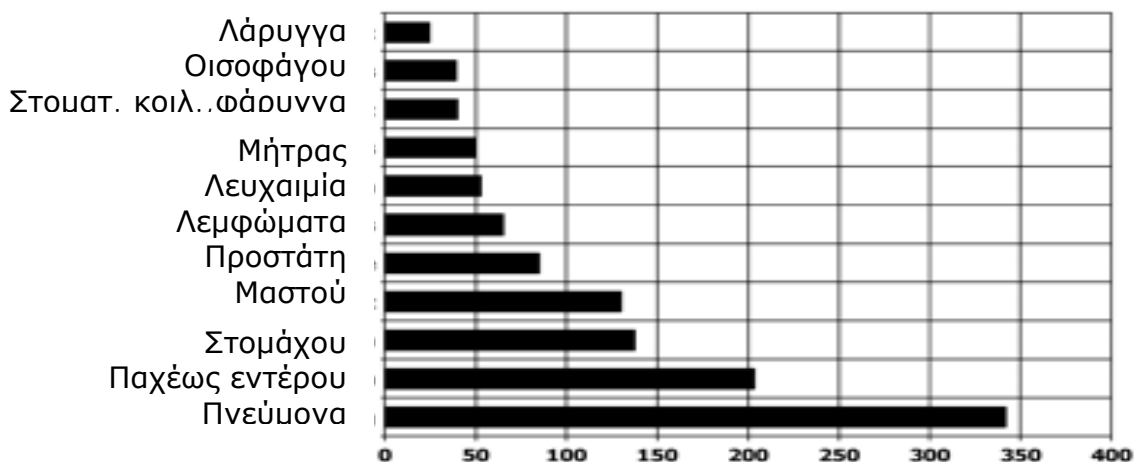
Τελειώνοντας, αισθάνομαι την ανάγκη να αναφέρω την απaráμιλλη υποστήριξη του συντρόφου της ζωής μου. Το ευχαριστώ είναι πολύ λίγο, και ξέρω ότι δεν του αρέσει να το ακούει. Η ύπαρξή του όμως, με κάνει να θέλω να προσπαθώ πάντα, για κάτι καλύτερο.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΗΤΕΡΤ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα, αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, ενώ βρίσκεται στην πρώτη θέση από άποψη συχνότητας μεταξύ των ανδρών και στην τρίτη θέση μεταξύ των γυναικών, στο δυτικό κόσμο [1]. Παγκοσμίως, το 2002 παρουσιάστηκαν 1.352.100 νέες περιπτώσεις ΚΠ [2], ενώ στην Ευρώπη το 2004 αναφέρθηκαν 341.800 θάνατοι από ΚΠ (20% των θανάτων από καρκίνο) (Εικόνα 1) και 381.500 νέες περιπτώσεις (13.2% των νέων περιπτώσεων καρκίνου) [3].

Το 90% του ΚΠ αποδίδεται στο κάπνισμα και ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης του σε έναν καπνιστή είναι 10 – 30 φορές μεγαλύτερος από ότι σε έναν μη καπνιστή. Άλλοι σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες στον ΚΠ είναι το παθητικό κάπνισμα, η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, η περιβαλλοντική ρύπανση κ.ά. [4].



Εικόνα 1. Αριθμός θανάτων σε χιλιάδες από διάφορους τύπους καρκίνου στην Ευρώπη το 2004. Ο καρκίνος του πνεύμονα βρίσκεται στην πρώτη θέση με 341.800 θανάτους [3].

Ο ΚΠ διακρίνεται σε μη μικροκυτταρικό, που αφορά το 75-80% και περιλαμβάνει τους ιστολογικούς τύπους: αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες, μεγαλοκυτταρικό και σε μικροκυτταρικό ΚΠ, (15-20%), με διαφορετικούς παθολογοανατομικούς χαρακτήρες και βιολογική συμπεριφορά [5]. Η διάγνωση απαιτεί κυτταρολογική/ιστολογική επιβεβαίωση, η οποία όμως, τίθεται συνήθως αργά, κατά τη διάρκεια της φυσικής εξέλιξης της νόσου. Η ενδελεχής σταδιοποίηση του ΚΠ, η οποία περιλαμβάνει και νέες απεικονιστικές και επεμβατικές μεθόδους (PET, EBUS κ.ά.), ορίζει την περαιτέρω θεραπευτική αντιμετώπιση.

Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, ανάλογα με το στάδιο της νόσου, περιλαμβάνει τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου, τη

χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, καθώς και το συνδυασμό τους. Τα αποτελέσματα, όμως, της μέχρι σήμερα θεραπευτικής αντιμετώπισης, απέχουν πολύ από το να χαρακτηριστούν ικανοποιητικά, καθώς η 5ετής επιβίωση ανέρχεται μόλις στο 10-15%. Ριζική θεραπεία μπορεί να επιτευχθεί μόνο στο 25% των ασθενών, που υποβάλλονται σε χειρουργική εξαίρεση του όγκου και από αυτούς μόνο το 50% παραμένουν ελεύθεροι νόσου για 5 χρόνια. Δυστυχώς, η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζεται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, με φτωχή πρόγνωση.

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται μεγάλη προσπάθεια μελέτης σε μοριακό επίπεδο, της έκφρασης διαφόρων παραγόντων (ογκογονίδια, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, αγγειογενετικοί παράγοντες κ.ά.) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γένεση και ανάπτυξη του όγκου. Η αξιολόγηση της διαγνωστικής και προγνωστικής τους αξίας, μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες με κλινικό όφελος. Ενώ, η ταυτοποίηση του μοριακού συνδυασμού του όγκου, μπορεί να αναδείξει πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, με σκοπό την εξατομικευμένη προσέγγιση των ασθενών, ελπίζοντας σε ουσιαστικότερη θεραπευτική παρέμβαση [6].

Εντατική έρευνα προσανατολίζεται στην κατανόηση της σχέσης ανοσιακού συστήματος και καρκίνου, αποσκοπώντας στην αναγνώριση των πολύπλοκων μονοπατιών της ογκογένεσης, σε μια προσπάθεια ανάδειξης κάποιας αποτελεσματικής ανοσοθεραπευτικής παρέμβασης. Στο πλαίσιο της προσπάθειας αυτής μεταξύ των άλλων, η αναγνώριση μιας πληθώρας TAs, ικανών να οδηγήσουν σε μεσολαβούμενη T-κυτταρική απόκριση, έχει δώσει μεγάλη ώθηση στο σχεδιασμό ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων [7]. Τα μέχρι σήμερα όμως αποτελέσματα των κλινικών μελετών είναι πενιχρά, καθώς η ανταπόκριση περιορίζεται σε ελάχιστες περιπτώσεις ασθενών, συνήθως μικρής διάρκειας [8]. Έχει διαπιστωθεί ότι τα TAs που παρουσιάζονται μέσω των HLA I και II μορίων στα T-λεμφοκύτταρα, μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση και κλωνική επέκτασή τους και στον επανεντοπισμό τους στην περιοχή του όγκου (TILs). Η ανοσιακή απόκριση όμως, φαίνεται να μην είναι αποτελεσματική, για πολλούς λόγους, οι οποίοι αναλύονται στη συνέχεια.

1.1 ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Η άποψη ότι ο οργανισμός μπορεί να παίξει ενεργό ρόλο στην καταπολέμηση των όγκων, ξεκινά από τις αρχές του περασμένου αιώνα, αλλά μόνο τις τελευταίες δεκαετίες, κατέστη εφικτό να επιβεβαιωθεί. Αυτό έγινε, αρχικά κατανοώντας τη δράση των CTLs (δεκαετία '70), έπειτα απομονώνοντας CTLs από ανθρώπινους όγκους -κατά κύριο λόγο μελάνωμα- (δεκαετία '80), για να έρθει μόλις η περασμένη δεκαετία, όποτε και έγινε εφικτή η αναγνώριση συγκεκριμένων αντιγόνων των όγκων [9, 10]. Η ταυτοποίηση των TAs, προέκυψε κατά την προσπάθεια να αναγνωριστούν οι στόχοι

των ανοσιακών αποκρίσεων, που είχαν ήδη αναγνωρισθεί έναντι των όγκων. Ένα από τα πρώτα γονίδια που συνδέθηκε με την παρουσία καρκίνου και απομονώθηκε, είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας των *MAGE-A* γονιδίων (*MAGE-A1*) [11].

Στην τελευταία δεκαετία έχουν αναγνωρισθεί μια πληθώρα TAs, που μπορούν να αποτελέσουν στόχο της χυμικής ή και της κυτταρικής ανοσαπάντησης [12]. Η φύση της ανοσιακής απόκρισης, εξαρτάται εκτός των άλλων και από τα χαρακτηριστικά των αντιγόνων και είναι αποτέλεσμα της αλληλοεπίδρασης του όγκου με τον ξενιστή [13, 14]. Η τεράστια προσπάθεια ταυτοποίησης TAs, οφείλεται στο γεγονός, ότι μπορούν να αποτελέσουν υποψήφια μόρια, για τη δημιουργία αντικαρκινικών εμβολίων, στοχεύοντας στη διέγερση των ανοσιακών αποκρίσεων.

Τα αντιγόνα των όγκων διακρίνονται σε:

- Ειδικά των όγκων αντιγόνα, που μπορεί να είναι προϊόντα μεταλλαγμένων ογκογονιδίων ή τμήματα ανώμαλων καρκινικών πρωτεϊνών κ.ά.
- Υπερεκφραζόμενα ίδια αντιγόνα, τα οποία είναι αντιγόνα των φυσιολογικών ιστών, που παρουσιάζουν όμως αυξημένη έκφραση, στους νεοπλασματικούς ιστούς.

Η αναγνώριση ενός αντιγόνου των όγκων μπορεί να επιτευχθεί μέσω ανίχνευσης κλώνων ειδικών CTLs, στα TILs ή στο περιφερικό αίμα. Σε άλλες περιπτώσεις, αρχικά αναγνωρίστηκε το γονίδιο και η πρωτεΐνη και κατόπιν ανιχνεύθηκαν ανοσιακές αποκρίσεις έναντι πεπτιδίων της πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση πάντως, προκειμένου να αξιολογηθεί η ανοσολογική σημασία ενός αντιγόνου, πρέπει να εκτιμηθεί και η ύπαρξη ή μη, ανοσοβιολογικών αποκρίσεων εναντίον του [15].

Τα TAs που αναγνωρίζονται από τα T κύτταρα, κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες (Πίνακας 1) ανάλογα με την έκφραση των γονιδίων που τα κωδικοποιούν [16]:

A) **Μεταλλαγμένα αντιγόνα** (mutated antigens, tumor specific unique antigens), που δημιουργήθηκαν από κάποια μοναδική μετάλλαξη, ενός φυσιολογικού γονιδίου. Καθώς εμφανίζονται και χαρακτηρίζουν αποκλειστικά και μόνο, τα εξαλλαγμένα κύτταρα του συγκεκριμένου όγκου, είναι απόλυτα ειδικά για το κάθε είδος καρκίνου. Έτσι, τα μεταλλαγμένα αντιγόνα, μπορεί να διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσιακή απόκριση κατά του όγκου των μεμονωμένων ασθενών, δεν αποτελούν όμως ελκυστικό στόχο ανοσοθεραπευτικής προσέγγισης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα εξής: CDK4, 13-catenin, CASP-8, p53, k-ras, a-actin, malic acid κ.ά.

B) **Αντιγόνα διαφοροποίησης** (*Differentiation Antigens*). Η έκφραση των αντιγόνων διαφοροποίησης, χαρακτηρίζει συγκεκριμένα στάδια της φυσιολογικής διεργασίας διαφοροποίησης διαφόρων ιστών. Στους όγκους, εκφράζονται τα αντιγόνα διαφοροποίησης, που χαρακτηρίζουν τους ιστούς από τους οποίους προέρχονται.

Κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι: tyrosinase, gp75, gp100, Melan-A/MART-1, TRP-2, CEA, PSA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η τυροσινάση, που εκφράζεται στα φυσιολογικά μελανοκύτταρα και στην πλειονότητα των μελανωμάτων, καθώς και το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), μια ογκοεμβρυϊκή πρωτεΐνη, που εκφράζεται στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο και στις περισσότερες κακοήθειες του εντέρου.

Γ) **Ειδικά κοινά των όγκων αντιγόνα ή Αντιγόνα καρκίνου-όρχεως.** (*tumor specific shared antigens, Cancer-testis antigens*). Τα αντιγόνα αυτά εκφράζονται κατά την εμβρυϊκή ζωή και στη συνέχεια εξαφανίζονται από όλα τα φυσιολογικά κύτταρα, πλην των γεννητικών κυττάρων του όρχεως (testicular germ cells) και του πλακούντα (placental trophoblasts). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά, ανευρίσκονται σε πληθώρα όγκων, όπως κεφαλής-τραχήλου, πνεύμονα, νεφρού, μαστού, μελανώματα και σαρκώματα. Με δεδομένο ότι οι όρχεις, δεν έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάσουν, μέσω μορίων MHC I/II, τα αντιγόνα αυτά στο ανοσοιακό μας σύστημα, τα καθιστά ιδιαίτερα σημαντικά στην αντιμετώπιση του καρκίνου, λόγω της απουσίας έκφρασής τους από τους υγιείς ιστούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου αντιγόνου, αποτελεί η ομάδα των MAGE πρωτεϊνών, που εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων στο μελάνωμα, σε καρκίνο μαστού, πνεύμονα, ορθού, ωοθήκης κ.ά. [17]. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν επίσης τα αντιγόνα: GAGE, BAGE, RAGE και NY-ESO-1.

Δ) **Υπερεκφραζόμενα αντιγόνα** (*Overexpressed Antigens*), τα οποία εκφράζονται και σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά η έκφρασή τους στον καρκινικό ιστό είναι αξιοσημείωτα υψηλότερη. Παράδειγμα αντιγόνου αυτής της κατηγορίας είναι η σαρβιβίνη (survivin). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γονίδιο της σαρβιβίνης εκφράζεται σε πολλούς εμβρυϊκούς ιστούς, καθώς και σε ιστούς ενήλικου ατόμου που παρουσιάζουν έντονο πολλαπλασιασμό (όπως θύμος αδένας, όρχεις, ενδοθήλιο κτλ.) Έχει επιβεβαιωθεί από πλήθος μελετών, ότι η σαρβιβίνη υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους νεοπλασιών (λεμφώματα, σαρκώματα, μελανώματα, καρκίνος μαστού, οισοφάγου, εγκεφάλου, μήτρας, κ.ά.) [18]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η υπερέκφραση της αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται διάφορα αντιγόνα όπως: hTERT, survivin, PRAME, Her2/Neu, MUC1, WT1 κ.ά.

Ο κατάλογος των αντιγόνων που ταυτοποιούνται σε διάφορους όγκους (μελάνωμα, μαστού, γαστρεντερικού, πνεύμονα), συνεχώς αυξάνεται, ενώ κάποια από αυτά (*Her2/Neu*), έχουν ήδη καθιερώσει τη θέση τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου. Πολλά TAAs, έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορων ειδών στρατηγικές ανοσοθεραπείας, τα αποτελέσματα όμως των κλινικών μελετών μέχρι στιγμής, παραμένουν φτωχά. Για την αποτυχία αυτή, έχει ενοχοποιηθεί πληθώρα παραγόντων,

μεταξύ των οποίων, η ανεπιτυχής επιλογή αντιγόνων, διάφοροι μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής, ακόμη

Πίνακας 1: Οι κατηγορίες των αντιγόνων των όγκων που αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα. Τα γονίδια των μεταλλαγμένων αντιγόνων και των αντιγόνων διαφοροποίησης, εκφράζονται σε συγκεκριμένους καρκίνους οι οποίοι και αναφέρονται. Όσον αφορά τα αντιγόνα καρκίνου-όρχεως και τα υπερεκφραζόμενα αντιγόνα, στον πίνακα αναφέρεται η φυσιολογική έκφραση των γονιδίων τους, ενώ στις περιπτώσεις καρκίνου, αυτά εκφράζονται σε διάφορους τύπους, όπως μαστού, πνεύμονα, γαστρεντερικού, ωθηκών, μελάνωμα κ.ά.

Γονίδιο	Έκφραση
Μεταλλαγμένα αντιγόνα	
<i>CDK4</i>	Μελάνωμα
<i>β-catenin</i>	Μελάνωμα
<i>CASP-8</i>	Πλακώδες Ca κεφαλής-τραχήλου
<i>NFYC</i>	Πλακώδες Ca πνεύμονα
<i>k-ras</i>	Ca παγκρέατος
<i>KIAA0205</i>	Ca ουροδόχου κύστεως
<i>COA-1</i>	Ca παχέως εντέρου
<i>MUM-1</i>	Μελάνωμα
<i>BCR-ABL</i>	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία
<i>B-RAF</i>	Μελάνωμα
<i>HLA-A2</i>	Ca νεφρού
Αντιγόνα διαφοροποίησης	
<i>tyrosinase</i>	Μελάνωμα
<i>gp100 / Pmel17</i>	Μελάνωμα
<i>Melan-A/MART</i>	Μελάνωμα
<i>TRP-1 / gp75</i>	Μελάνωμα
<i>TRP-2</i>	Μελάνωμα
<i>CEA</i>	Ca εντέρου
<i>PSA</i>	Ca προστάτη
<i>mammaglobin-A</i>	Ca μαστού
Αντιγόνα καρκίνου-όρχεως	
<i>MAGE</i>	Στα γεννητικά κύτταρα του όρχεως και στον πλακούντα
<i>GAGE</i>	
<i>BAGE</i>	
<i>RAGE</i>	
<i>SAGE</i>	
<i>LAGE-1</i>	
<i>NY-ESO-1</i>	
Υπερεκφραζόμενα αντιγόνα	
<i>hTERT</i>	Όρχις, θύμος, μυελός των οστών, λεμφαδένες
<i>survivin</i>	Σε όλα τα κύτταρα (χαμηλά επίπεδα)
<i>PRAME</i>	Όρχις, ωθήκες, ενδομήτριο, επινεφρίδιο
<i>Her2/Neu</i>	Σε όλα τα κύτταρα (χαμηλά επίπεδα)
<i>MUC1</i>	Αδενικό επιθήλιο
<i>WT1</i>	Όρχις, μυελός των οστών, ωθήκες, σπλήνας

<i>AIM-2</i>	Σε όλα τα κύτταρα (χαμηλά επίπεδα)
<i>PSMA</i>	Προστάτης, ΚΝΣ, ήπαρ
<i>CPSF</i>	Σε όλα τα κύτταρα (χαμηλά επίπεδα)

και η δυσκολία εκτίμησης της ανοσιακής απόκρισης, αλλά και της συσχέτισής της με την κλινική ανταπόκριση [19].

Παρά την εκτεταμένη έρευνα εξακολουθεί να υπάρχει η ανάγκη, για τη μελέτη ευρέως εκφραζομένων αντιγόνων των όγκων, τα οποία να χαρακτηρίζουν την πλειοψηφία των νεοπλασμάτων, να μην εκφράζονται στα φυσιολογικά κύτταρα και να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων.

1.1.1 ΤΑAs στον Καρκίνο του Πνεύμονα

Η ταυτοποίηση αντισωμάτων έναντι ΤΑAs και ειδικών CTLs-κυτταρικών αποκρίσεων, υποδεικνύει ότι το ανοσιακό σύστημα, μπορεί να ξεχωρίσει τα καρκινικά από τα υγιή κύτταρα του πνεύμονα. Έχουν αναγνωρισθεί αρκετά αντιγόνα τα οποία εκφράζονται και από τον καρκίνο του πνεύμονα, όμως η φαινοτυπική ετερογένεια των διαφόρων ιστολογικών τύπων του, έχει ως αποτέλεσμα μία μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά την έκφραση τους.

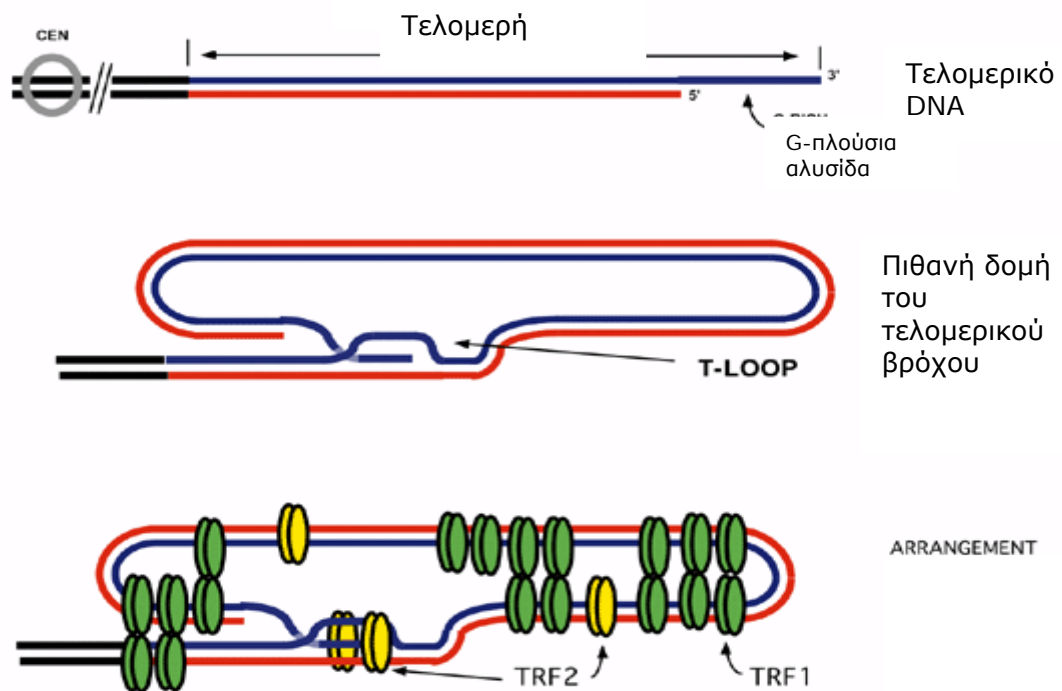
Τα αντιγόνα που εκφράζονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι: α) τα αντιγόνα της οικογένειας των γαγγλιοσιδών (*GM2*, *GD2*, *GD3*, *Fuc-GM1*), τα οποία εκφράζονται κυρίως στο ΜΚΠ και κατατάσσονται στα αντιγόνα διαφοροποίησης, β) τα αντιγόνα της οικογένειας των *MAGE*, καθώς και τα *GAGE*, *BAGE* και *NY-ESO-1*, τα οποία εκφράζονται κυρίως στο ΜΜΚΠ και ανήκουν στην κατηγορία των αντιγόνων καρκίνου-όρχεως, γ) διάφορα μεταλλαγμένα αντιγόνα όπως: p53, k-ras, a-actin-4, malic acid, *EGFRVIII* κ.ά., δ) αρκετά υπερεκφραζόμενα αντιγόνα, με κύριους εκπροσώπους τα: σαρβιβίνη, Her2/Neu, MUC1, WT1, CEA, hTERT κ.ά. [20, 21, 22].

Τα περισσότερα αντιγόνα που έχουν ταυτοποιηθεί στον ΚΠ, έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας φάσης I/II, τα μέχρι σήμερα όμως αποτελέσματα, παραμένουν απογοητευτικά [23]. Παρά το γεγονός, ότι σε κάποιες μελέτες αναγνωρίστηκε ανοσολογική ανταπόκριση μετά τη χορήγηση της ανοσοθεραπείας και σε κάποιες άλλες κλινική ανταπόκριση, καθώς και σε ελάχιστες περιπτώσεις συσχέτιση μεταξύ τους, σε καμία όμως μελέτη η ανοσολογική ανταπόκριση δεν μεταφράστηκε σε κλινικό όφελος [22]. Απαραίτητη είναι η περαιτέρω μελέτη των ΤΑAs στον ΚΠ, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο κατευθυνόμενων ανοσιακών αποκρίσεων, ενώ αναδεικνύεται η ανάγκη καλύτερης κατανόησης των ανοσιακών αυτών αποκρίσεων και των μηχανισμών διαφυγής που επιστρατεύονται, με απώτερο σκοπό την κλινική εφαρμογή τους, στο πλαίσιο ανοσοθεραπείας.

1.2 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ

Η διατήρηση της γενετικής σταθερότητας διασφαλίζεται μέσω της παρουσίας ειδικών δομών που εντοπίζονται στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων και ονομάζονται τελομερή. Τα τελομερή, αποτελούνται από πολλαπλές επαναλήψεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας TTAGGG και ένα πλήθος πρωτεϊνών (Εικόνα 2) που αλληλεπιδρούν με αυτές, σχηματίζοντας μια χαρακτηριστική δομή που ονομάζεται τελομερικός βρόχος (t-loop) [24, 25]. Βρίσκονται στα άκρα όλων των γραμμικών ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων (Εικόνα 3) και το μήκος τους φτάνει τα 15-20 kb. Σχηματίζουν ένα προστατευτικό κάλυμμα (cap), το οποίο προφυλάσσει τα φυσιολογικά άκρα, από τυχαία σπασίματα του DNA και παρεμποδίζει τη μη φυσιολογική και ανεπιθύμητη σύντηξη ή και τη νουκλεολυτική διάσπαση, διατηρώντας την ακεραιότητα τους [26].

Σημαντικός είναι ο ρόλος τους, στον έλεγχο της διαδικασίας της κυτταρικής αύξησης. Καθώς οι DNA πολυμεράσες, αποτυγχάνουν να πολυμερίσουν πλήρως τα άκρα του ευθύγραμμου DNA, σε κάθε κυτταρική διαίρεση χάνεται ένας μεγάλος αριθμός βάσεων τελομερικού DNA. Αποτέλεσμα των συνεχών κυτταρικών διαιρέσεων, είναι η προοδευτική απώλεια τμημάτων των τελομερών, που λειτουργεί ως 'μιτωτικό ρολόι'.

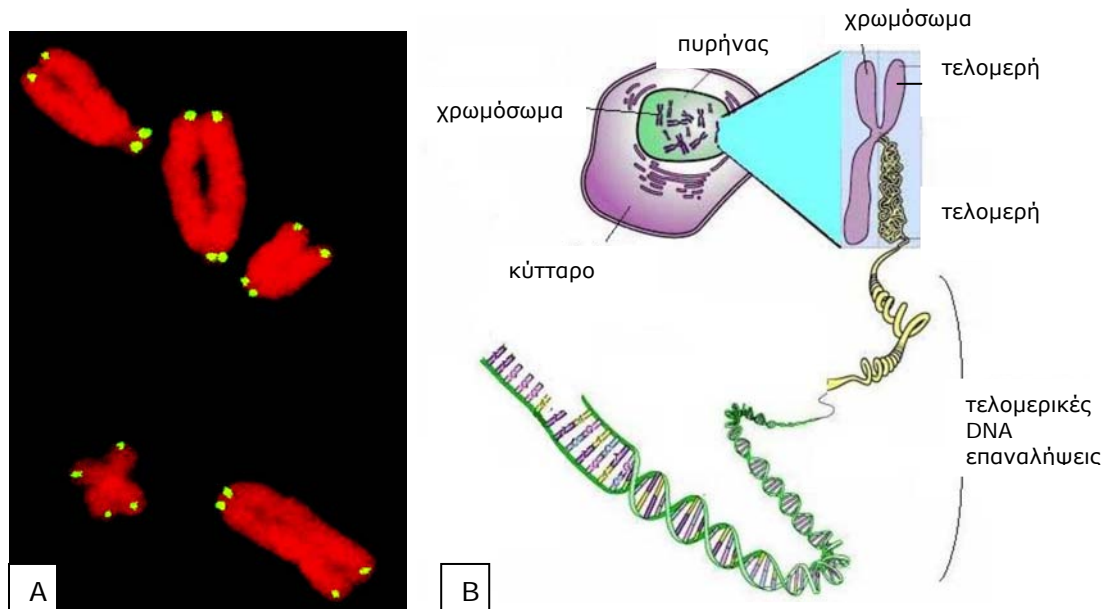


Εικόνα 2: Χαρακτηριστική δομή του τελομερικού DNA. Η αλληλοεπίδραση με τις πρωτεΐνες TRF1, TRF2 (telomere-binding protein 1 και 2), σταθεροποιεί τη δομή του, σχηματίζοντας τον τελομερικό βρόχο (t-loop) [27].

Τελικά παράγεται μία τροποποιημένη δομή χρωματίνης, η οποία είτε αναγνωρίζεται ως μη φυσιολογική και ενεργοποιούνται μηχανισμοί του κυττάρου, που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του, ή και προάγουν την απόπτωσή του είτε ξεφεύγει από αυτό το σημείο ελέγχου, για να επιστρατευτούν μηχανισμοί επιδιόρθωσης [28].

Η τελομεράση που ανακαλύφθηκε αρχικά στο πρωτόζωο τετραϋμένα [29], είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων, απαραίτητο για τη σύζευξη των αλληλουχιών στα τελομερή, διατηρώντας το μήκος τους και κατά συνέπεια τη σταθερότητα των κυττάρων. Αποτελείται από υποομάδες (Εικόνα 4): α) την TERC, ένα μόριο RNA αποτελούμενο από 451 νουκλεοτίδια [30], β) την hTERT, μία πρωτεϊνική υπομονάδα με καταλυτική δράση [31], γ) διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την τελομεράση [32, 33]. Η τελομεράση είναι μια εξειδικευμένη αντίστροφη μεταγραφάση, που με μήτρα την αλληλουχία του μορίου RNA, συνθέτει επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA, στο 3' άκρο του υπάρχοντος τελομερικού DNA (Εικόνα 5). Πρακτικά, δημιουργεί αντίγραφο του πλαισίου των 6 νουκλεοτιδίων TTAGGG. Εκτός της τελομεράσης, που αποτελεί τον κύριο μηχανισμό διατήρησης του μήκους των τελομερών, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που αναφέρονται ως εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών, για τους οποίους όμως, πολλά παραμένουν άγνωστα μέχρι σήμερα [34, 35]. Το γονίδιο της *TERC* εντοπίζεται

στη θέση 3q26.3, έχει έκταση περίπου 4kb και βρίσκεται σε ένα μόνο αντίγραφο [36], ενώ το γονίδιο της *hTERT* εντοπίζεται στην περιοχή p15.33 του χρωμοσώματος 5 και έχει έκταση 37.2kb [37].

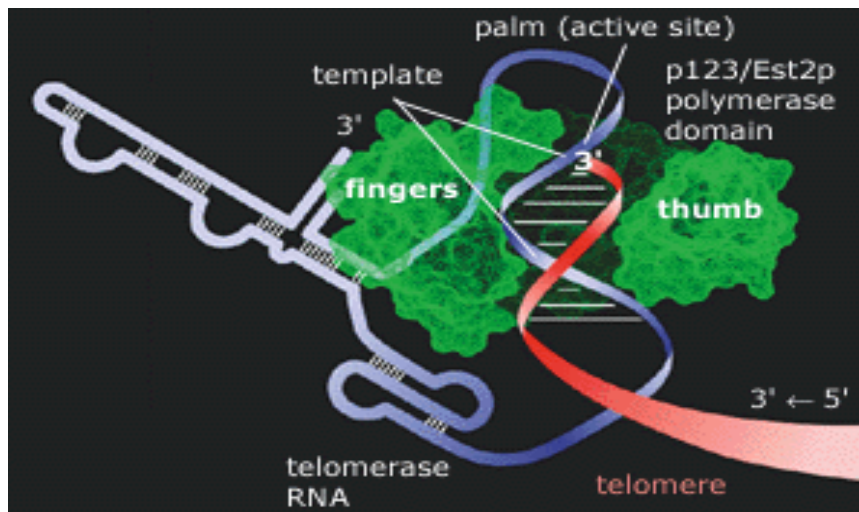


Εικόνα 3: Τα τελομερή βρίσκονται στα άκρα όλων των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων (A) και αποτελούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (B) [38].

Η *hTERT* αποτελείται από 15 ιντρόνια και 16 εξόνια (Εικόνα 6) ενώ το μέγεθος των εξονίων ποικίλλει σε μήκος από 62 μέχρι 1354 bp. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 127 kDa, που αποτελείται από 1132 αμινοξέα [39]. Μελέτες σε μοριακό επίπεδο, ανέδειξαν μια ποικιλία προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της *hTERT*, τόσο σε φυσιολογικά, όσο και σε καρκινικά κύτταρα [40].

Η ρύθμιση της τελομεράσης επιτυγχάνεται μέσω μίας πολύπλοκης, πολυπαραγοντικής διαδικασίας και περιλαμβάνει, την έκφραση του γονιδίου της τελομεράσης, μετα-μεταφραστικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (post-translational protein-protein interactions) και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών [41]. Πολλά πρωτοογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως *c-Myc*, *Bcl-2*, *p21^{WAF1}*, *Rb*, *p53*, *PKC*, *Akt/PKB*, συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα, στο μηχανισμό ρύθμισης της Ta [42]. Έχει βρεθεί επίσης θετική συσχέτιση, μεταξύ της ποσοτικής έκφρασης του mRNA του γονιδίου *hTERT* και της Ta, που υποδηλώνει ότι η Ta ρυθμίζεται, και σε επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου της *hTERT* [43]. Ο χαρακτηρισμός του υποκινητή (promoter) του γονιδίου *hTERT*, βοήθησε στην αναγνώριση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, με θετική ή αρνητική ρυθμιστική δράση [44]. Ενίσχυση του γονιδίου (gene amplifica-

tion) της hTERT (αύξηση των αντιγράφων, ανευπλοειδία, πολλαπλασιασμός της χρωμοσωμιακής περιοχής 5p), παρατηρείται περίπου στο ένα τρίτο των όγκων και έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αύξηση της Ta [45].

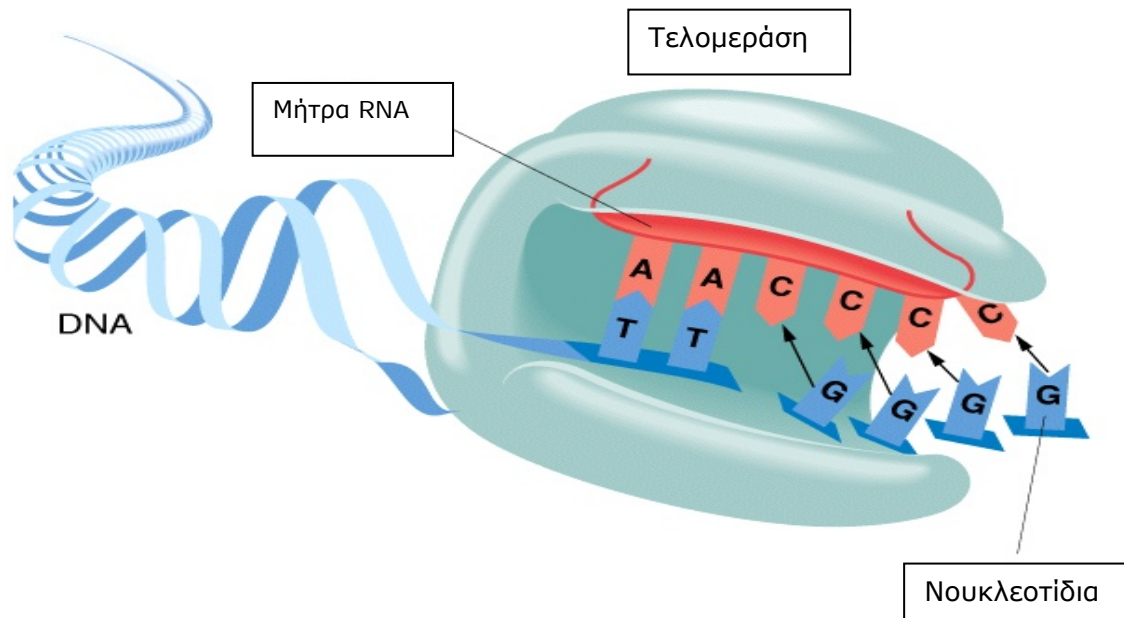


Εικόνα 4: Το σύμπλοκο της τελομεράσης αποτελείται από την TERC (μπλε/άσπρο) και την hTERT (πράσινο) ενώ διακρίνονται και τα τελομερή (κόκκινο) [46].

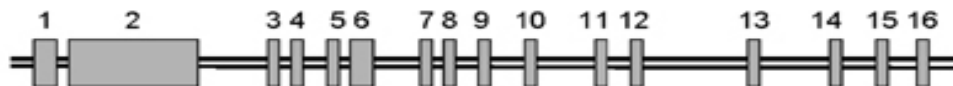
Η ενεργότητα της τελομεράσης, δεν ανιχνεύεται στους φυσιολογικούς ιστούς, πέρα από τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στα σωματικά στελεχιαία κύτταρα, η τελομεράση, δεν αναπληρώνει τη φθορά των τελομερών από τις διαιρέσεις, παρά μόνο σε αυστηρά καθορισμένη φάση αύξησης των προγονικών κυττάρων και σταματά με την τελική τους διαφοροποίηση. Αυτό οφείλεται σε διάφορους τρόπους απενεργοποίησης της hTERT, όπως είναι η μειωμένη μεταγραφή της, η εναλλακτική σύνδεσή της κ.ά. Εξαιρέση αποτελούν οι έντονα πολλαπλασιαζόμενοι ιστοί όπως αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, γαμετικά κύτταρα, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες και κύτταρα των κρυπτών του εντέρου [47].

Τα τελομερή και η τελομεράση, αποτελούν έναν από τους καθοριστικούς μηχανισμούς ελέγχου του πολλαπλασιασμού των σωματικών κυττάρων [48]. Όταν το μήκος των τελομερών, κατά τη διαίρεση των κυττάρων μειώνεται σημαντικά, φτάνει σε ένα κρίσιμο σημείο, πέρα από το οποίο σταματάει ο πολλαπλασιασμός τους και ωθούνται σε μια φάση αδράνειας, που καλείται αναπαραγωγική γήρανση (replicative senescence). Η διαταραχή της δομής των τελομερών, φαίνεται να είναι εξίσου σημαντική, με την ελάττωση του μήκους τους [49]. Ο ρυθμιστικός αυτός μηχανισμός εμπλέκεται στη διαδικασία γήρανσης του οργανισμού, πιθανώς όμως να αποσκοπεί και στην προστασία του από την καρκινογένεση [50]. Η απουσία της Ta στα σωματικά κύτταρα, προκαλεί τη φθορά των τελομερών, προάγοντας την απόπτωση ή τον κυτταρικό θάνατο, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες συσσώρευσης πολλαπλών στιγμιαίων μεταλλάξεων, που συνιστούν απαραίτητη προϋπόθεση της καρκινικής

εξαλλαγής. Στον αντίποδα βέβαια αυτής της υπόθεσης, υπάρχει και το γεγονός, ότι τα φθαρμένα τελομερή, οδηγούν σε γενικευμένη γονιδιωματική αστάθεια, που προωθεί την ογκογένεση.



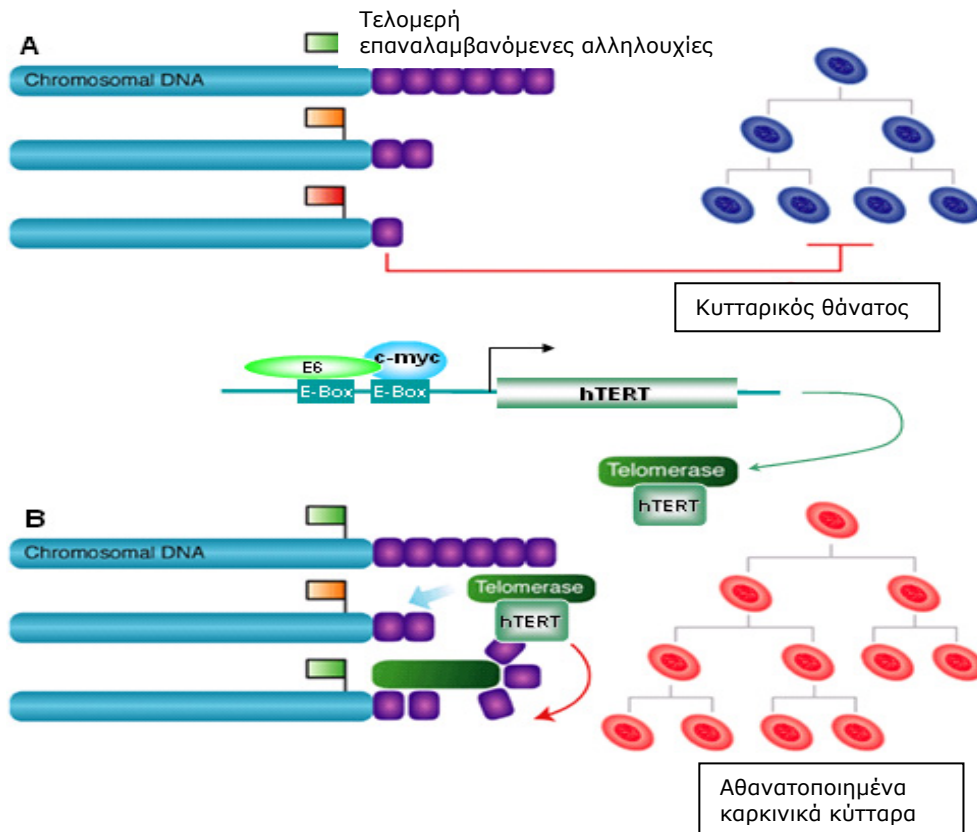
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της τελομεράσης [38].



Εικόνα 6: Δομή του mRNA της hTERT. Αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια [39].

1.2.1 Ο ρόλος της τελομεράσης στον καρκίνο

Στα σωματικά κύτταρα, το μήκος των τελομερών τους μετά από έναν αριθμό διαιρέσεων, μειώνεται μέχρι ένα κρίσιμο σημείο, που έχει ως αποτέλεσμα να οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο. Τα καρκινικά όμως κύτταρα, με τη βοήθεια της τελομεράσης, μπορούν να διατηρήσουν σταθερά τελομερή, αποκτώντας την ικανότητα συνεχούς πολλαπλασιασμού (Εικόνα 7), συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην αθανатоποίηση των κυττάρων [51].

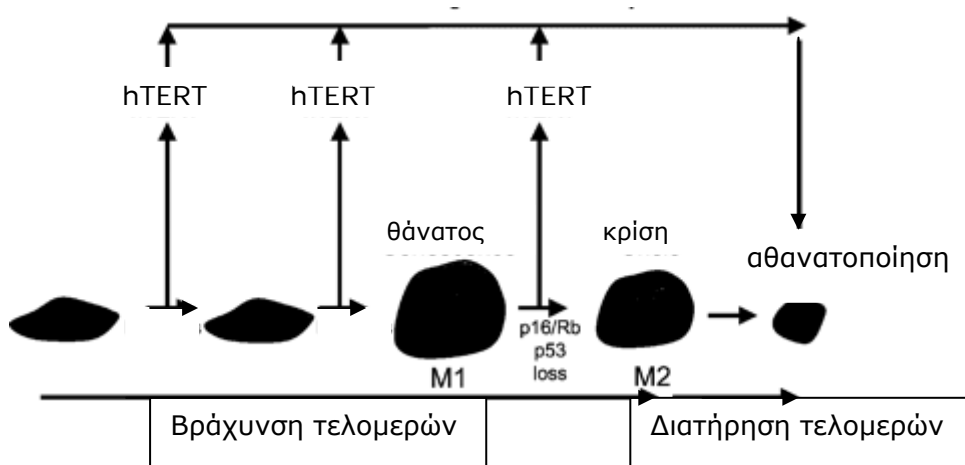


Εικόνα 7: Ρύθμιση του μήκους των τελομερών στα σωματικά και καρκινικά κύτταρα [52].

Υπάρχουν επαρκή στοιχεία που δείχνουν, ότι τα βραχεία τελομερή, οδηγούν τα κύτταρα σε αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (M1 στάδιο). Σε προκαρκινικές καταστάσεις, συμβαίνουν γενετικές μεταβολές, όπως μεταλλάξεις σχετιζόμενες με την απώλεια του ελέγχου ανάπτυξης ή της σταθερότητας του γονιδιώματος, οι οποίες επιτρέπουν την αποφυγή του σταδίου M1. Το μήκος των τελομερών συνεχώς μειώνεται, απουσία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στο σημείο μεταγωγής (check-points), κυρίως μέσω του *p53* και του *pRB*, οδηγώντας τα κύτταρα μετά από 20-30 διπλασιασμούς σε κρίση (M2 στάδιο). Σε κάποια σπάνια κύτταρα, η επανενεργοποίηση ή η υπερέκφραση της τελομεράσης, τους προσδίδει την ικανότητα να διαφύγουν την κρίση, να διατηρούν σταθερά τελομερή και να μπορούν να πολλαπλασιάζονται ατέρμονα (Εικόνα 8) [53]. Η πλειοψηφία των κυττάρων (85-90%) που διαφεύγουν τη M2 κρίση, είναι θετικά για τελομεράση και αποκτούν την ικανότητα να εκφράσουν πλήρως το καρκινικό δυναμικό τους, για περαιτέρω ανάπτυξη και μεταστάσεις, ενώ παραμένει ένα μικρό ποσοστό κυττάρων χωρίς *Ta*, διατηρώντας το μήκος των τελομερών τους μέσω μηχανισμών εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερών, με σημαντικές όμως λειτουργικές διαφορές [54].

Η έκφραση της hTERT, τόσο πριν το M1 στάδιο, όσο και μεταξύ M1 και M2 σταδίου, καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα αθάνατα, αναδεικνύει τη σημασία των τελομερών και στα δύο στάδια της αναπαραγωγικής γήρανσης. Πρόσφατες μελέτες,

αναδεικνύουν και άλλους σημαντικούς ρόλους της έκφρασης της hTERT στην ογκογένεση, πέρα από τη διατήρηση του μήκους των τελομερών. Φαίνεται να επηρεάζει και πολλά άλλα γονίδια, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη μεταγωγή σήματος και στο μεταβολισμό των κυττάρων, συμβάλλοντας περαιτέρω στην καρκινογένεση [55, 56, 57]. Παράλληλα, φαίνεται ότι η έκφραση της hTERT, ελέγχεται από μηχανισμό παλίνδρομης ανατροφοδότησης [58].



Εικόνα 8: Η τελομεράση επιτρέπει τα κύτταρα να διαφύγουν το M1 στάδιο (θάνατος) και το M2 (κρίση) και τα καθιστά αθάνατα [53].

Η TERC ανιχνεύεται στην πλειοψηφία των κυττάρων των θηλαστικών, ενώ η hTERT περιορίζεται στα κύτταρα όπου ανιχνεύεται η Ta, γεγονός που υποδεικνύει ότι η καταλυτική δράση της hTERT, είναι η απαραίτητη προϋπόθεση, προκειμένου η τελομεράση να διαδραματίσει το λειτουργικό της ρόλο στον καρκίνο [59].

Ο σημαντικός ρόλος των τελομερών και της τελομεράσης στην ανάπτυξη του καρκίνου, ενισχύεται και από τις ακόλουθες παρατηρήσεις: 1) στις προκαρκινικές καταστάσεις διαπιστώνονται ανωμαλίες των τελομερών [60], 2) τα καρκινικά κύτταρα έχουν μικρότερο μήκος τελομερών, σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα [61], 3) στην πλειονότητα των όγκων, ανιχνεύεται η Ta και η hTERT [62, 63, 64] και 4) η Ta αυξάνεται με το βαθμό κακοήθειας και το στάδιο της νόσου [65, 66]. Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της Ta, είναι κυρίως η PCR-TRAP assay (PCR-Telomerase repeat amplification protocol), ενώ για την hTERT, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημεία και ο προσδιορισμός της μεταγραφικής της έκφρασης (mRNA), με in situ υβριδισμό (hybridization) και με RT-PCR, ενώ η ποσοτικοποίησή της επιτυγχάνεται με qRT-PCR. Πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια, ανέδειξαν τη διαγνωστική και προγνωστική αξία της τελομεράσης σε διάφορους καρκίνους, μεταξύ

των οποίων και ο καρκίνος του πνεύμονα, καθώς επίσης και τις θεραπευτικές προοπτικές της.

1.3 Η ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Το βρογχικό επιθήλιο, παρουσιάζει μια διαδοχή μορφολογικών αλλαγών, μέχρι να καταλήξει σε πλήρη κακοήθη εξαλλαγή και δυνατότητα διήθησης και μετάστασης. Η Ta ανιχνεύεται από τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης, αναδεικνύοντας τη συμβολή της στη σταδιακή αυτή διαδικασία, ενώ έχει βρεθεί αυξημένη, ακόμη και στο φυσιολογικό βρογχικό επιθήλιο καπνιστών [67, 68]. Στις περισσότερες μελέτες που αφορούσαν προκαρκινικές καταστάσεις, τόσο του πλακώδους καρκίνου (υπερπλασία, μεταπλασία, δυσπλασία, καρκίνωμα *in situ*) [69, 70, 71, 72,], όσο και του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα (άτυπη αδενωμάτωσης υπερπλασία) [73, 74], η τελομεράση ανευρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα, σε μικρότερη συχνότητα βέβαια απ' ότι στον ΚΠ. Διαπιστώθηκε επίσης η υψηλότερη έκφραση της Ta και της hTERT, σε κάθε επόμενη βαθμίδα κακοήθους εξαλλαγής [75, 76].

Το μήκος των τελομερών στον ΚΠ δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα, φαίνεται όμως ότι ακόμα και στις μελέτες όπου ανευρέθηκαν αλλαγές του μήκους τους, αυτές δε συσχετίστηκαν με την Ta [77, 78], παραταύτα, αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα [79].

1.3.1 Κλινικές εφαρμογές της τελομεράσης

Η Ta έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών, στην προσπάθεια αξιολόγησης της διαγνωστικής και προγνωστικής της αξίας στον ΚΠ. Οι φυσιολογικοί ιστοί δεν παρουσιάζουν Ta, βρέθηκε όμως αυξημένη στο 80-85 % του ΚΠ, τόσο στο ΜΜΚΠ (από 60,3 μέχρι 100%), όσο και στο ΜΚΠ, όπου ανιχνεύτηκε σε ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά (84-100%) [80, 81, 82].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των υποομάδων της τελομεράσης, οι οποίες ανιχνεύτηκαν σε υψηλά ποσοστά στο ΚΠ (80-90%) [83, 84, 85]. Η hTERC ανιχνεύτηκε σε ποσοστό μέχρι 98% [86, 87], η πιο εκτεταμένα όμως μελετημένη υποομάδα της, που φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την Ta, είναι η hTERT [88, 89]. Έχουν ανιχνευθεί, τέσσερα διαφορετικά προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της hTERT στον ΚΠ, που μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της Ta. [90, 91]. Στους παρακείμενους μη προσβεβλημένους ιστούς του όγκου, συνήθως δεν εκφράζεται η Ta ή hTERT [92, 93] ή ανιχνεύονται αλλά σε πολύ μικρό ποσοστό, που κυμαίνεται από 4,4% - 12% [80, 94]. Η συχνότητα ανίχνευσής τους είναι μικρή (7%) και στους καλοήθεις όγκους του πνεύμονα, όπως είναι τα καρκινοειδή [95].

Η Τα έχει μελετηθεί, πέρα από τις κυτταρικές σειρές καρκίνου πνεύμονα και τους καρκινικούς ιστούς (χειρουργικά αφαιρεθέντες, μέσω διαθωρακικής / ενδοβρογχικής βιοψίας), και σε διάφορα βιολογικά υλικά όπως: υλικά βρογχοσκόπησης (ψήκτρα, βρογχική έκπλυση, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα), πτύελα, πλευριτικό υγρό και αίμα με ιδιαίτερα υψηλή διαγνωστική αξία (Πίνακας 2).

Οι Sen et al. ανίχνευαν την Τα στα πτύελα, στη βρογχική έκπλυση (washing) (Εικόνα 9) και σε βιοπτικό υλικό, με ευαισθησία 81,6%, 68,4%, 86,8%, ειδικότητα 100%, 100%, 100% και διαγνωστική ακρίβεια 86,5%, 76,9%, 88,1% αντίστοιχα [96]. Η διαγνωστική αξία της Τα, αναδεικνύεται σημαντική και σε άλλες μελέτες με παρόμοια αποτελέσματα [97, 98, 99], αν αναλογιστούμε ότι η ευαισθησία της κυτταρολογικής των πτυέλων στη διάγνωση του ΚΠ είναι ~40% και της βρογχικής έκπλυσης ~60%. Η ανεύρεση της Τα στα πτύελα, την ανάγει σε έναν πιθανό μη επεμβατικό δείκτη, πρώιμης διάγνωσης του ΚΠ. Σε μια άλλη μελέτη των Hirashima et al. σε περίπτωση ενδοβρογχικής βλάβης, η ανίχνευση της Τα στο υλικό της βιοψίας, παρουσίασε ευαισθησία 54,1% στο ΜΜΚΠ και 84% στο ΜΚΠ, ενώ συνολικά στον ΚΠ ανήρθε στο 62,8% [78]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η συσχέτιση της έκφρασης της hTERT με ανοσοϊστοχημεία, μεταξύ του υλικού βιοψίας βρόγχου προ χειρουργείου, με την έκφρασή της στο συνολικό όγκο που αφαιρέθηκε χειρουργικά [100]. Το υλικό της ψήκτρας (brushing) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη μελέτη της Τα [70, 71]. Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), η Τα ανιχνεύεται σε υψηλό ποσοστό ασθενών με ΚΠ. Η ευαισθησία της ανέρχεται στο 70-84,2%, όταν η ευαισθησία της κυτταρολογικής είναι 43-64%. Ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, αυξάνει την ευαισθησία τους στο 74-86,5% [101, 102, 103]. Στο ίδιο υλικό έχει προσδιοριστεί και η μεταγραφική έκφραση της hTERT [104].

Η συνύπαρξη πλευριτικής συλλογής στον ΚΠ, κυρίως οφείλεται στην ίδια τη νόσο, παρόλα αυτά, η ταυτοποίηση της κακοήθους φύσης της αποτελεί συχνά διαγνωστική πρόκληση, καθώς καθορίζει την περαιτέρω θεραπευτική προσέγγιση. Εφόσον, οι κυτταρολογικές του πλευριτικού υγρού είναι θετικές μόνο στο 45-70% των

ψήκτρα	[70], [71]	
βρογχική έκπλυση,	[70], [96], [98], [105], [121]	
βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα	Αναφορές [101], [102], [103]	[104]
	Ta	hTERT
πτύελα βρογχική βιοψία	[96], [97], [98], [99]	[69], [100]
λεμφαδένες	[69], [114]	[115]

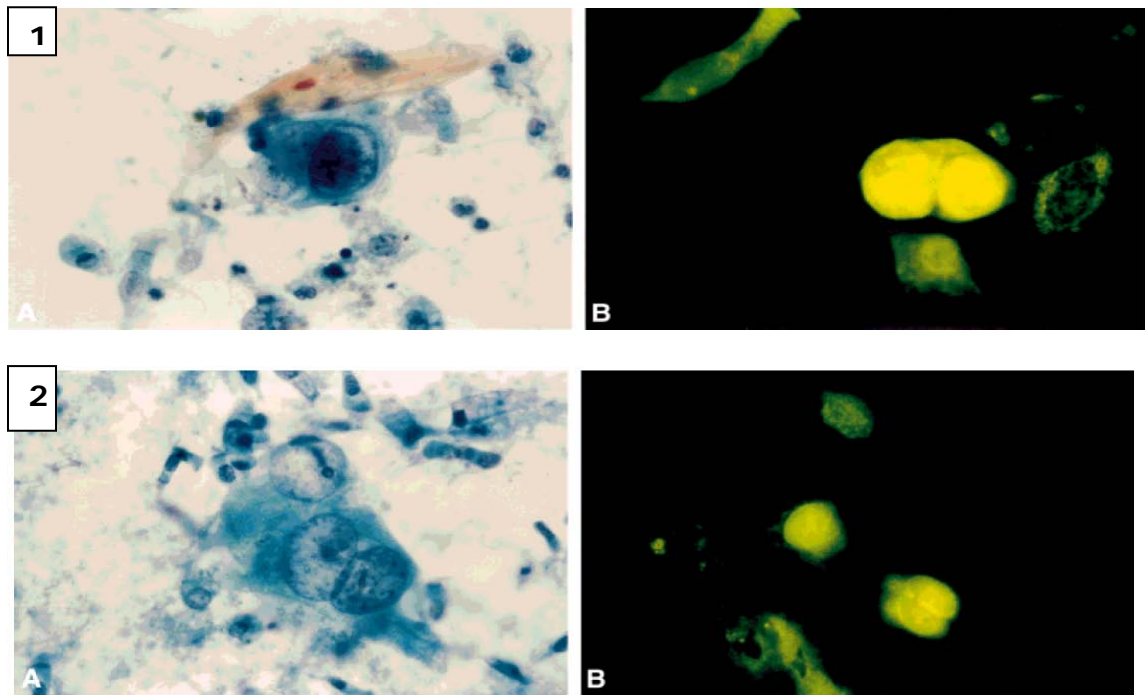
πλευριτικό υγρό	[80], [105], [107], [108], [109], [110]	[111], [112]
περιφερικό αίμα	[116]	[117], [118], [119], [131]

Πίνακας 2: Μελέτες στις οποίες μετρήθηκαν η Ta και η hTERT στα διάφορα βιολογικά υλικά σε ασθενείς με ΚΠ.

περιπτώσεων, ο συνδυασμός τους με τη μέτρηση βιολογικών δεικτών μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω διαγνωστική προσπάθεια. Η ανίχνευση της Ta [106, 107, 108, 109, 110] και του mRNA της hTERT [111, 112] στο πλευριτικό υγρό, έχοντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ίσως θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν προς αυτή την κατεύθυνση.

Η ανίχνευση μικρομεταστάσεων στους λεμφαδένες, με τη βοήθεια μοριακών δεικτών, μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στη σταδιοποίηση της νόσου, ορίζοντας την πιο ενδεδειγμένη θεραπευτική αντιμετώπιση, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχει στην αξιολόγηση της πρόγνωσης της. Στο πλαίσιο αυτό, έχουν μελετηθεί διάφοροι μοριακοί δείκτες, μεταξύ των οποίων και η τελομεράση. Είναι γνωστό ότι η Ta ανιχνεύεται στα λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα, παρότι η έκφραση της στους διηθημένους λεμφαδένες να είναι υψηλότερη, σε σύγκριση με αυτή στους μη διηθημένους, να δίνει μεγάλο ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (54%) [69, 113, 114]. Οι Wallace et al. μελέτησαν την έκφραση της hTERT, στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες ασθενών με ΚΠ, λαμβάνοντας υλικό με EUS-FNA (endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration) [115]. Η hTERT ανιχνεύτηκε στο 63% των διηθημένων λεμφαδένων και στο ένα τρίτο των περιπτώσεων, των ψευδώς αρνητικών λεμφαδένων με την EUS-FNA, όπως διαπιστώθηκε μετά το χειρουργείο. Η μελέτη της τελομεράσης στους λεμφαδένες, χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης, προκειμένου να συμμετάσχει στη μοριακή σταδιοποίηση του ΚΠ.

Η τελομεράση θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόλογο και αξιόπιστο δείκτη, ο οποίος προστιθέμενος στη διαγνωστική φαρέτρα, να συμβάλει στην καλύτερη προσέγγιση των ασθενών με ΚΠ, καθώς από τις μελέτες προκύπτει, ότι ο συνδυασμός της κυτταρολογικής εξέτασης και της ανίχνευσης της Ta στα διάφορα υλικά, αυξάνει τη διαγνωστική τους αξία.



Εικόνα 9: **A.** Επίστρωση βρογχικής έκπλυσης (χρώση κατά Παπανικολάου x 800) **B.** Αντίστοιχη *in situ* TRAP assay όπου φαίνονται τα καρκινικά κύτταρα με έντονη πυρηνική αντιδραστικότητα, στο πλακώδες ΚΠ (**1**) και στο αδενοκαρκίνωμα (**2**) [96].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη της τελομεράσης στο περιφερικό αίμα, με σκοπό την αξιολόγηση της διαγνωστικής της αξίας. Η Ta ανιχνεύτηκε στο 73% των ασθενών με ΚΠ και σε κανέναν υγιή μάρτυρα [116], ενώ σε μια άλλη μελέτη, παρόλο που η hTERT εκφράστηκε στο αίμα μόνο ενός μικρού ποσοστού ασθενών (12%), σημαντική ήταν η απουσία της σε όλους τους μάρτυρες [117]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, με τη βοήθεια ποσοτικού προσδιορισμού του mRNA της hTERT, αναφέρθηκε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (89% και 72,7% αντίστοιχα) και σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός αντιγράφων mRNA-hTERT στον ορό ασθενών με ΚΠ, έναντι των υγιών μαρτύρων, ενώ βρέθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της hTERT στον ορό και στον καρκινικό ιστό [118]. Οι Sozzi et al. χρησιμοποίησαν το γονίδιο της *hTERT*, για την ποσοτικοποίηση του κυκλοφορούντος DNA, στο πλάσμα ασθενών με ΚΠ και κατέδειξαν ότι η μέση συγκέντρωσή του ήταν ~8 φορές μεγαλύτερη, σε σύγκριση με αυτή των μαρτύρων [119]. Η ανίχνευση της τελομεράσης στο περιφερικό αίμα, μπορεί να αποτελέσει έναν μη επεμβατικό δείκτη πρώιμης διάγνωσης του ΚΠ, που χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης, προκειμένου να αξιοποιηθεί σε μελέτες μαζικού ελέγχου (screening).

Επίσης, τόσο η Ta, όσο και η hTERT, συσχετίστηκαν σε πρόσφατες μελέτες με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους [120, 121, 122], με αντικρουόμενα πολλές φορές αποτελέσματα. Όλες σχεδόν οι μελέτες συμφωνούν, ότι δεν σχετίζονται με την ηλικία,

το φύλο, και το κάπνισμα. Σε κάποιες μελέτες (Πίνακας 3), βρέθηκε συσχέτιση της Ta με τον όγκο (T), τη διήθηση των λεμφαδένων (N), και το στάδιο της νόσου, όπου φάνηκε ότι η Ta αυξάνει σε πιο προχωρημένη νόσο, ενώ φαίνεται να αυξάνει επίσης,

Ασθενείς	T	N	Στάδιο	Διαφοροποίηση	Τύπος	Αναφορές
----------	---	---	--------	---------------	-------	----------

όσο μειώνεται ο βαθμός διαφοροποίησης. Όσον αφορά τον ιστολογικό τύπο, στο ΜΚΠ παρατηρείται μεγαλύτερη Ta έναντι του ΜΜΚΠ και μεταξύ του ΜΜΚΠ, στο πλακώδες. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζει και η hTERT, κατά την συσχέτισή της με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους (Πίνακας 4), με μόνη διαφορά, το γεγονός ότι δεν βρέθηκε σε καμία μελέτη, συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης.

Τα τελομερή και η τελομεράση, φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο, και στην ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα [123]. Μελέτες τόσο *in vitro* [124, 125], όσο και *in vivo* [65, 126] κατέδειξαν ότι η δράση των κυτταροστατικών παραγόντων (σισπλατίνη, ετοποσίδη, κ.ά.), μειώνει την έκφραση της Ta ή της hTERT στα καρκινικά κύτταρα. Η ανίχνευσή τους σε προθεραπευθέντες όγκους, μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία, καθώς η χαμηλή έκφραση της Ta [127] και η υψηλή έκφραση της hTERT [128], συσχετίστηκαν με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Έχει επίσης βρεθεί, ότι η ελάτπωση της Ta μετά από ακτινοβολία 20 Gy, συσχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών στην ακτινοθεραπεία [129]. Στον ΚΠ έχουν γίνει πολύ λίγες μελέτες, για την αξιολόγηση της προβλεπτικής αξίας της τελομεράσης. Σε κυτταρικές σειρές ΜΜΚΠ, η ετοποσίδη μείωσε την έκφραση της Ta και της hTERT [130], η ανίχνευση όμως της έκφρασης της hTERT, στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΚΠ προ χημειοθεραπείας, δεν φάνηκε να έχει προβλεπτική αξία, καθώς δεν συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στη θεραπεία [131].

Η αναγνώριση προγνωστικών δεικτών στον καρκίνο είναι υψίστης σημασίας, καθώς επιτρέπει να ξεχωρίσουμε τις ομάδες των ασθενών, που λόγω της κακής τους πρόγνωσης, χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής και πιο επιθετικής αντιμετώπισης. Στην κατεύθυνση αυτή, αρκετές μελέτες αξιολόγησαν την προγνωστική αξία της Ta και της

Πίνακας 3: Συσχέτιση της Ta με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους σε κλινικές μελέτες που αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. (-): δεν βρέθηκε συσχέτιση, (+): βρέθηκε συσχέτιση. 1. Διαφορά με το στάδιο βρέθηκε μόνο στο ΜΚΠ (περιορισμένο vs εκτεταμένο). 2. Βρέθηκε υψηλότερη Ta στο ΜΚΠ έναντι του ΜΜΚΠ, δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των ιστολογικών τύπων του ΜΜΚΠ.

56 ΜΜΚΠ	-	-	-	-	-	[94]
103 ΜΜΚΠ	-		+	+	-	[92]

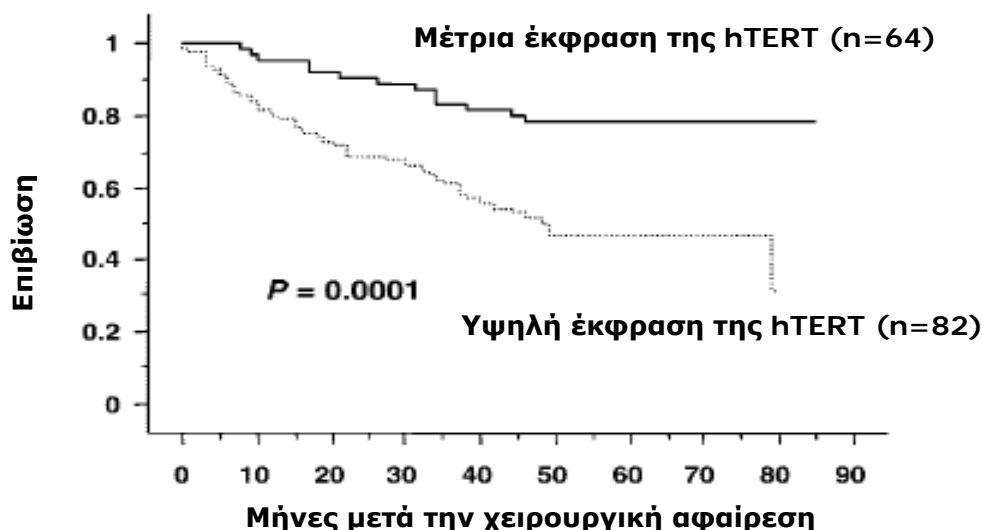
115 ΜΜΚΠ				+	+	[83]
62 ΜΜΚΠ	-	+	+	+	-	[121]
78 ΜΜΚΠ	+	-	+	-	-	[85]
42 ΜΜΚΠ	-	-	+		-	[96]
99 ΜΜΚΠ	+	+	+		-	[120]
61 ΜΜΚΠ 25 ΜΚΠ			+ ¹		+ ²	[81]
98 ΜΜΚΠ	-	-	-	+	-	[133]
40 ΜΜΚΠ	-	-	-	+	-	[176]
67 ΜΜΚΠ	+	+	-	-	+	[179]

hTERT, στους ασθενείς με ΚΠ. Ενώ σε κάποιες μελέτες δεν βρέθηκε να έχουν προγνωστική αξία [78, 84, 89, 94, 120, 122], στις περισσότερες διαπιστώθηκε η αρνητική συσχέτισή τους με την επιβίωση. Φαίνεται ότι η αύξηση τόσο της Ta [83, 92, 94, 132, 133] όσο και της hTERT [93, 121, 132, 134, 135, 136, 137], αποτελούν δείκτη κακής πρόγνωσης, καθώς οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα, είχαν μικρότερη επιβίωση (Εικόνα 10). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία πρόσφατη μελέτη των Camps et al. όπου η hTERT μετρήθηκε με RT-PCR στον ορό ασθενών με ΚΠ και αποτέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, για το χρόνο μέχρι την πρόοδο νόσου (time to progression) και τη συνολική επιβίωση (overall survival) [131]. Η τελομεράση θα μπορούσε να αναδειχθεί σε έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, συμβάλλοντας στην πιο ενδεδειγμένη προσέγγιση των ασθενών με ΚΠ.

Πίνακας 4: Συσχέτιση της hTERT με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους σε κλινικές μελέτες που αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. (-): δεν βρέθηκε συσχέτιση, (+): βρέθηκε συσχέτιση. 1. Θετική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου. 2. Βρέθηκε συσχέτιση με την ύπαρξη μεταστάσεων.

Ασθενείς	T	N	Στάδιο	Διαφοροποίηση	Τύπος	Αναφορές
56 ΜΜΚΠ	-	-	-	-	-	[94]
62 ΜΜΚΠ	-	+	-	-	-	[121]

146 ΜΜΚΠ	+	-	+	-	-	[93]
115 ΜΜΚΠ	-	+	-	-	-	[122]
92 ΜΜΚΠ	-	-	-	-	-	[84]
104 ΜΜΚΠ 18 ΜΚΠ	-	-	+	-	+	[89]
98 ΜΜΚΠ 5 ΜΚΠ	+ ¹	-	+ ²	-	-	[118]
130 ΜΜΚΠ	-	-	-	-	+	[135]



Εικόνα 10: Η 5ετής επιβίωση των ασθενών, με υψηλά και μέτρια επίπεδα έκφρασης του mRNA της hTERT, ήταν 46.9% και 77.9% αντίστοιχα [93].

1.3.2 hTERT και ανοσιακή απόκριση

Τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους όγκους, πληθώρα TAAs, τα οποία αναγνωρίζονται από το ανοσιακό σύστημα και έχουν την ικανότητα να επάγουν ειδικές CTLs αποκρίσεις. Η hTERT αποτελεί ένα ευρέως εκφραζόμενο TAA [138] που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς εκφράζεται στο 85-90% των καρκίνων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση. Πεπτίδια του επεξεργασμένου αντιγόνου της hTERT, παρουσιάζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, συνδεδεμένα με τάξης I/II MHC-μόρια και μπορούν να επάγουν T

μεσολαβούμενες ανοσολογικές αποκρίσεις και κυρίως την ενεργοποίηση ειδικών CTLs, που προκαλούν λύση των αντίστοιχων καρκινικών κυττάρων. Η ανίχνευση πεπτιδίων της hTERT, που παρουσιάζονται από διάφορα HLA αλληλόμορφα, αποτελεί ένα πεδίο εντατικής έρευνας, καθώς τα πεπτίδια αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή εμβολίων κατά του καρκίνου [139].

Στη μελέτη των Vonderheide et al., το p540 (ILAKFLHWL), ήταν το πρώτο πεπτίδιο της hTERT που αναγνωρίστηκε *in vitro*, περιορισμένο με HLA-A2, ικανό να επάγει ειδικά CTLs με ισχυρή κυτταρολυτική δράση, έναντι ενός ευρέος φάσματος καρκινικών κυτταρικών σειρών [140]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μεταγενέστερη μελέτη *in vivo*, σε διαγονιδιακά ποντίκια [141]. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι στις μελέτες δεν παρουσιάστηκαν στοιχεία αυτοανοσίας, καθώς τα hTERT-ειδικά CTLs, δεν φάνηκε να λύουν *in vitro*, τα φυσιολογικά κύτταρα που εκφράζουν τελομεράση (αιμοποιητικά κύτταρα, ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα) [140, 141, 142].

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά ανοσογονικά πεπτίδια της hTERT (Πίνακας 5) [143]. Οι διαφορετικοί επίτοποι του γονιδίου της hTERT, συνδέονται με διαφορετικά HLA αλληλόμορφα, επάγοντας ειδικές CD8⁺ αλλά και CD4⁺ κυτταρικές απαντήσεις. Διαφαίνεται ότι οι διάφοροι όγκοι, μπορούν να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν συγκεκριμένα πεπτίδια της hTERT, σε συγκεκριμένα HLA μόρια [144]. Σε κάποιες μελέτες σε κυτταρικές σειρές, φάνηκε όμως, ότι τα ειδικά CTLs έναντι του p540 πεπτιδίου της hTERT, δεν μπόρεσαν να αναγνωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζανε hTERT [145, 146]. Ενοχοποιήθηκαν διάφοροι μηχανισμοί, που μπορεί να συμβάλουν στην ανικανότητα των ειδικών CTLs, να προκαλέσουν λύση των καρκινικών κυττάρων, ένας από τους οποίους ήταν το πρωτεόσωμα [147]. Συνεπώς, η επιλογή των πεπτιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή εμβολίων, χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και ίσως είναι προτιμότερη η χρήση πολλαπλών πεπτιδίων της hTERT.

Τα DCs, αποτελώντας τα κυριότερα APCs, έχουν εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί ως «οχήματα» στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, για την ενίσχυση των ανοσιακών αποκρίσεων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Nair et al., όπου χρησιμοποιήθηκαν DCs διαμολυσμένα με hTERT-RNA, για τη διέγερση hTERT ειδικών CTLs, τα οποία ήταν ικανά να σκοτώσουν κύτταρα καρκίνου του νεφρού και του προστάτη, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, σε ποντικούς [148].

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των προκλινικών μελετών, ώθησαν στο σχεδιασμό κλινικών μελετών φάσης I, για την αξιολόγηση της hTERT ως TAA. Στην πρώτη μελέτη που δημοσιεύτηκε, ανιχνεύτηκαν ειδικά CTLs έναντι διαφόρων TAAs (μεταξύ των οποίων και της hTERT), στους έξι από τους δέκα ασθενείς με μεταστατικό

καρκίνο νεφρού, μετά τον εμβολιασμό τους με DCs διαμολυσμένα με RNA [149]. Όσον

hTERT πεπτίδια	αλληλουχία	Περιορισμένο στοιχείο	T-κύτταρα
----------------	------------	-----------------------	-----------

αφορά την κλινική ανταπόκριση, αναφέρεται ότι οι 7 ασθενείς ζούσαν, μετά από παρακολούθηση 19,8 μηνών. Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν και σε μία ακόμη μελέτη, όπου ανιχνεύτηκαν ειδικές CD8⁺ και CD4⁺ T κυτταρικές απαντήσεις, σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο προστάτη [150]. Σε μία άλλη μελέτη, ο εμβολιασμός με το p540 πεπτίδιο της hTERT, ενεργοποίησε ειδική CTL ανοσιακή απόκριση, στους τέσσερις από τους επτά ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο μαστού ή προστάτη και οδήγησε σε μερική υποχώρηση του όγκου, σε έναν ασθενή [151].

Στη μελέτη των Brunsvig et al. χορηγήθηκε σε 24 ασθενείς με ΜΜΚΠ, εμβόλιο που περιλάμβανε ένα συνδυασμό πεπτιδίων της hTERT (GV1001:p611–626 και HR2822:p540–548) [152]. Ειδική ανοσιακή απάντηση έναντι του GV1001, αναγνωρίστηκε συνολικά σε 13 ασθενείς και έναντι του HR2822 σε 2 ασθενείς, χωρίς να αναφερθούν ιδιαίτερες παρενέργειες. Στις 12 εβδομάδες της μελέτης, στο 72% των ασθενών παρατηρήθηκε πρόοδος νόσου και στο 28% σταθερή νόσος. Ένας ασθενής παρουσίασε πλήρη ανταπόκριση, ενώ η διάμεση επιβίωση ήταν 8.5 μήνες. Σε μία ακόμη πρόσφατη μελέτη, ο εμβολιασμός 21 ασθενών με ΜΜΚΠ, ανέδειξε την ικανότητα του πεπτιδίου p572 της hTERT, να ενεργοποιεί ειδικές CD8⁺ ανοσιακές αποκρίσεις, στην πλειοψηφία των ασθενών (στο 76.2% μετά το δεύτερο εμβολιασμό και στο 90.9% μετά τον έκτο εμβολιασμό) [153]. Οι παρενέργειες περιορίστηκαν σε τοπικές δερματικές αντιδράσεις, ενώ η ανοσολογική απόκριση συσχετίστηκε με μεγαλύτερη επιβίωση.

Παράλληλα, η παρουσία κυκλοφορούντων αντισωμάτων έναντι της hTERT, στον ορό ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο και η συσχέτισή τους με το στάδιο της νόσου, αναδεικνύει την hTERT, ως πιθανό στόχο, όχι μόνο της κυτταρικής, αλλά και της χυμικής επίκτητης ανοσιακής απόκρισης [154].

Πίνακας 5: Επίτοποι της hTERT που αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα [143]

		Restriction element	
p540 ^[140, 141]	ILAKFLHWL	HLA-A2	CD8 ⁺
p572 ^[139, 155]	RLFFYRKSV	HLA-A2	CD8 ⁺
p865 ^[141]	RLVDDFLLV	HLA-A2	CD8 ⁺
p988 ^[139, 156]	DLQVNSLQTV	HLA-A2	CD8 ⁺
p324 ^[157]	VYAETKHFL	HLA-A24	CD8 ⁺
p461 ^[157]	VYHFVRACL	HLA-A24	CD8 ⁺
p973 ^[142]	KLFGVLRK	HLA-A3	CD8 ⁺
p672 ^[158, 159]	RPGLLGASVLGLDDI	HLA-DR1,-7,-15	CD4 ⁺
p766 ^[159]	LTDLQPYMRQFVAHL	HLA-DR4,-11,-15	CD4 ⁺

1.3.3 Θεραπευτικές προοπτικές της τελομεράσης

Η εκτεταμένη έρευνα των τελευταίων χρόνων, διαφωτίζοντας το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα τελομερή και η τελομεράση στον καρκίνο και αναγνωρίζοντας το γεγονός ότι η Ta ανιχνεύεται στη πλειοψηφία των όγκων (85%), οδήγησε στην αναγωγή τους, σε ελκυστικούς στόχους θεραπευτικής παρέμβασης. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες διακρίνονται στις ακόλουθες βασικές κατηγορίες: 1) αναστολείς της τελομεράσης, 2) γονιδιακή θεραπεία και 3) ανοσοθεραπεία.

Αναστολείς της τελομεράσης: Στο πλαίσιο θεραπείας του καρκίνου, έχουν μελετηθεί διάφοροι αναστολείς, που έχουν ως στόχο είτε τη δομή των τελομερών είτε το ένζυμο της τελομεράσης. Οι αναστολείς της τελομεράσης που έχουν αξιολογηθεί, στοχεύουν τόσο το ολοένζυμο της τελομεράσης, όσο και τις υποομάδες της, hTERT ή hTERC, καθώς επίσης και τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της τελομεράσης, σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο [160]. Οι διάφορες κατηγορίες αναστολέων, έχουν μελετηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, κυρίως *in vitro*. Σε πρόσφατες μελέτες, αξιολογήθηκε η χρήση μερικών από τις κατηγορίες αυτές των αναστολέων και στον ΚΠ.

Χρησιμοποιήθηκαν ουσίες όπως BRACO 19, quinoline triazines, 2-6 pyridine di-carboxamides, TMPyP4 και τελομεστατίνη (telomestatin), που σταθεροποιούν το G-«κουαρτέτο», που σχηματίζεται στην πλούσια σε G μονόκλωνη ουρά των τελομερών, προκαλώντας μείωση της έκφρασης της τελομεράσης (down-regulation) και τελομερική αστάθεια (telomere instability) [161].

Μια ενδιαφέρουσα κατηγορία, αποτελούν οι αναστολείς του mRNA της hTERT ή της hTERC με τη βοήθεια αντισημαινόντων μορίων (antisense molecules) όπως: DNA, πεπτιδία νουκλεϊκών οξέων (peptide nucleic acid - PNAs), μικρά παρεμβαλλόμενα RNA

(siRNA) και ριβόζυμα (ribozymes), που φαίνεται να αναστέλουν την Ta σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα [82, 160]. Μείωση της ενεργότητας της τελομεράσης, μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης είτε με την πρόσδεση διαφόρων μορίων (TMP, FJ5002, BIBR1532) στο ενεργό κέντρο του είτε και με τη χορήγηση αντιβιοτικών (MEN10716) [161]. Μια ακόμη κατηγορία αναστολέων, που έχουν δοκιμαστεί σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα, είναι τα μεταλλαγμένα πολυπεπίδια της hTERT (DN-hTERT). Οι μεταλλαγμένες hTERT πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτές τις ισομορφές, δεν παρουσιάζουν καταλυτική δράση, παραμένουν όμως ικανές να απομονώσουν την hTERC, αναστέλλοντας την Ta και μειώνοντας το μήκος των τελομερών [162]. Τέλος, τα κεραμίδια (ceramides) αναστέλλουν την hTERT σε μεταγραφικό επίπεδο [163], ενώ η σαλβισίνη (salvicine), έναν καινούργιο κυτταροτοξικό φάρμακο, μπορεί να μειώσει την Ta και το μήκος των τελομερών, στις A549 κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα [164].

Ο συνδυασμός παραγόντων που στοχεύουν τα τελομερή και την τελομεράση, με χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αποτελεί επίσης ένα ενδιαφέρον και πολλά υποσχόμενο ερευνητικό πεδίο, καθώς φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων, στην κυτταροτοξική δράση της χημειοθεραπείας [165, 166]. Η σύγχρονη χορήγηση τους, αυξάνει την απόπτωση κυτταρικών σειρών καρκίνου του πνεύμονα [162], ανοίγοντας το δρόμο σε μία νέα θεραπευτική προσέγγιση ασθενών με ΚΠ.

Γονιδιακή θεραπεία: Το γεγονός ότι το γονίδιο της hTERT, δεν εκφράζεται στα φυσιολογικά κύτταρα, παρά μόνο στα καρκινικά κύτταρα, και μάλιστα στην πλειοψηφία τους (85-90%), ανάγει τον υποκινητή της, σε ιδανικό μέσο κατευθυνόμενης έκφρασης θεραπευτικών γονιδίων. Έχουν αναπτυχθεί τρεις στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας, με τη βοήθεια φορέων (ανασυνδυασμένων αδενοϊών, πλασμιδίων) για την εισαγωγή γονιδίων, που υπόκεινται στον έλεγχο του υποκινητή της hTERT: 1) αποπτωτικών γονιδίων (Bax, FADD, TRAIL, κασπάσες 6-8), 2) ογκολυτικών ιών (CRAD, CG5757) και 3) γονιδίων «αυτοκτονίας», που κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία μεταβολίζουν μη τοξικές ουσίες (πρόδρομες μορφές του φαρμάκου), σε ενεργούς τοξικούς μεταβολίτες [160, 161]. Οι μέχρι τώρα πρόδρομες μελέτες, αναδεικνύουν τη γονιδιακή θεραπεία με οδηγό τον υποκινητή της hTERT, ως ασφαλή και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση, σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο ΚΠ [167, 168, 169, 170]. Παραμένουν όμως πολλά αναπάντητα ερωτήματα, που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, προκειμένου τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα της γονιδιακής θεραπείας, να αξιολογηθούν σε μελλοντικές κλινικές μελέτες.

Ανοσοθεραπεία: Καθώς η hTERT προάγει ανοσιακές αποκρίσεις, οι οποίες αναλύθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, μία διαφορετική θεραπευτική στρατηγική

αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια, στο πλαίσιο της ανοσοθεραπείας, στοχεύοντας την αναγνώριση και καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, που εκφράζουν τελομεράση, από το ανοσιακό σύστημα. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πεπτίδια της hTERT, για τη δημιουργία εμβολίων, καθώς επίσης και ανασυνδυασμένα γονιδιακά εμβόλια, με τη βοήθεια ιϊκών φορέων ή πλασμιδίων, που εμπεριέχουν hTERT-mRNA ή hTERT-cDNA. Τα εμβόλια αυτά δοκιμάστηκαν σε μελέτες φάσης I/II, σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, αξιολογώντας την ασφάλεια τους, την ανοσογονικότητά τους και το κλινικό τους όφελος [143, 171]. Τα αποτελέσματα δύο πρόσφατων κλινικών μελετών φάσης I/II, σε ασθενείς με ΜΜΚΠ [152, 153], δίνουν το έναυσμα για το σχεδιασμό τυχαιοποιημένων μελετών, για την περαιτέρω αξιολόγηση της hTERT-κατευθυνόμενης ανοσοθεραπείας στον ΚΠ.

Οι γνώσεις που συσσωρεύτηκαν τα τελευταία χρόνια, από μελέτες *in vitro* και *in vivo*, μπορούν να αξιοποιηθούν κατάλληλα και να βοηθήσουν στο σχεδιασμό κλινικών μελετών, για την αξιολόγηση της θεραπευτικής αξίας των διαφόρων στρατηγικών, που στοχεύουν την τελομεράση. Οι θεραπευτικές προοπτικές, μπορούν να επεκταθούν σε ένα μεγάλο εύρος ασθενών με ΚΠ. Η χορήγηση θεραπείας έναντι της τελομεράσης, στους ασθενείς μετά από πλήρη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ως επικουρική θεραπεία (*adjuvant*) ή ως θεραπεία συντήρησης, θα μπορούσε να συμβάλει στην περαιτέρω αύξηση της επιβίωσης τους. Στα προχωρημένα στάδια της νόσου, ο συνδυασμός της με τη χημειοθεραπεία, ενισχύοντας τη δράση της τελευταίας, ή χορηγούμενη ως μονοθεραπεία, όπου η χημειοθεραπεία δεν ενδείκνυται, ίσως να μπορούσε να βελτιώσει την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση της νόσου. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει, η πιθανή χρήση τους στα πλαίσια χημειοπροφύλαξης, στα άτομα υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη ΚΠ, όπως είναι οι βαρείς καπνιστές με παρουσία προκαρκινικών βλαβών [172]. Όλες αυτές οι προοπτικές, αναμένεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να επιβεβαιωθούν σε κλινικές μελέτες στο εγγύς μέλλον.

1.3.4 Συνέκφραση της τελομεράσης με άλλα TAAs

Σε διάφορες μελέτες, η ενεργότητα της τελομεράσης και η έκφραση της hTERT, έχουν συσχετιστεί με την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων, που παίζουν ρόλο στην ογκογένεση. Το p53, αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη του DNA, μέχρι την αποκατάσταση αυτής της βλάβης. Επάγει όμως την απόπτωσή τους, εφόσον η βλάβη δεν επιδέχεται επιδιόρθωση. Η τελομεράση και η p53 αλληλοεπιδρώντας μεταξύ τους, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία γήρανσης και αθανатоποίησης των κυττάρων [173]. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης και η απενεργοποίηση του p53, χαρακτηρίζει τους περισσότερους όγκους και σε μελέτες *in vitro*, έχει καταδειχθεί η συσχέτιση μεταξύ τους [174]. Πιο συγκεκριμένα, στο ΜΜΚΠ βρέθηκε συσχέτιση της Ta

με το μεταλλαγμένο p53 γονίδιο [175, 176] και την έκφραση της p53 πρωτεΐνης [177, 178, 179], καθώς η Ta ήταν υψηλότερη στους όγκους που υπερεκφράζαν το p53. Ανάλογα αποτελέσματα δίνει και η μελέτη των Wu et al. [94], όπου φάνηκε ότι οι όγκοι που δεν εκφράζουν το p53, είχαν μεγαλύτερα επίπεδα mRNA της hTERT.

Το ογκογονίδιο bcl-2 προκαλεί αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων, συμμετέχοντας στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, ενώ έχει βρεθεί *in vitro*, ότι τα επίπεδα έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, συσχετίστηκαν με την Ta [180]. Η bcl-2 είναι συχνά αυξημένη στον ΚΠ (κυρίως στο ΜΚΠ), τα αποτελέσματα όμως των μελετών, όσον αφορά το ρόλο της, είναι αντικρουόμενα, καθώς έχει αναδειχθεί κυρίως θετική αλλά και αρνητική προγνωστική αξία σε ασθενείς με ΚΠ. Το ίδιο αντικρουόμενα είναι και τα αποτελέσματα της συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της bcl-2 και της Ta. Ενώ στο ΜΚΠ έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ τους [95], αυτή δεν διαπιστώθηκε στο ΜΜΚΠ, με εξαίρεση τους καλής διαφοροποίησης όγκους, όπου αντιθέτως, αναδείχθηκε η αρνητική συσχέτισή τους, καθώς ανιχνεύτηκε υψηλότερη Ta, στους bcl-2 αρνητικούς όγκους [179].

Ένας από τους μεταγραφικούς παράγοντες, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, είναι το πυρηνικό ογκογονίδιο c-Myc, το οποίο συχνά υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Συμμετέχει στη ρύθμιση της Ta, καθώς συνδέεται με τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του [181, 182, 183]. Έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της έκφρασης του c-Myc, σε άλλους τύπους καρκίνου όπως του προστάτη [184] και του μαστού [185]. Η συσχέτιση αυτή καταδείχθηκε και στο ΜΜΚΠ σε δύο μελέτες [85, 186], αλλά σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη, η συσχέτιση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,053$) [99].

Η p16 είναι ένας αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKI), που κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο INKα/ARF. Συνδέεται και αναστέλλει το σύμπλεγμα κυκλίνης D, με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK4/6, με αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) και κατ' επέκταση, την παρεμπόδιση της μετάπτωσης των κυττάρων, στην επόμενη φάση του κύκλου (G1/S). Οι μεταλλάξεις της οδού p16/Rb, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και παρατηρούνται συχνά σε διάφορους τύπους καρκίνου [187, 188]. Στον ΚΠ, μεταλλάξεις του p16 σχετίστηκαν με κακή πρόγνωση [189]. Η συνέκφραση της Ta και της p16, εκτιμήθηκε στον ΚΠ στη μελέτη των González-Quevedo et al., όπου και αναδείχθηκε η συσχέτισή τους, στην οποία αποδόθηκε ιδιαίτερη προγνωστική αξία [133]. Οι ασθενείς στους οποίους δεν ανιχνεύτηκε η Ta και παράλληλα εκφράζανε την p16, είχαν καλύτερη πρόγνωση. Για τους θετικούς στην τελομεράση όγκους, η έκφραση της p16 αποτέλεσε ένα σημαντικό ανεξάρτητο

προστατευτικό παράγοντα. Η προστατευτική αυτή δράση, περιορίστηκε στους ασθενείς σταδίου I και II.

Στο ΜΚΠ, η TERC βρέθηκε να εκφράζεται πιο συχνά σε σύγκριση με την έκφραση της p53 και της bcl-2 [87]. Μελετήθηκε επίσης η συνέκφραση διαφόρων γονιδίων στους νευροενδοκρινείς όγκους του πνεύμονα, όπου φάνηκε ότι οι κακοήθεις όγκοι στους οποίους ανιχνεύτηκε η Ta, παρουσίαζαν ανοσοφαινότυπο, συνέπεια της έκφρασης διαφόρων μεταλλαγμένων γονιδίων (υψηλή έκφραση των bcl-2, p53, και c-kit, απουσία έκφρασης του Rb) και υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού [95].

Η συνέκφραση της hTERT, έχει μελετηθεί στον ΚΠ, και με διάφορους άλλους μοριακούς δείκτες όπως: VEGF, IL-10, (interleukin-10), COX-2 (cyclooxygenase-2), RAR-β (retinoic acid receptor-beta), K-ras, EGFR, κ.ά., βρέθηκε όμως θετική συσχέτιση, μόνο με την έκφραση του mRNA της COX-2 [122, 136].

Η ταυτοποίηση του μοριακού συνδυασμού του όγκου, με τη βοήθεια της συνέκφρασης διαφόρων γονιδίων, μπορεί να βοηθήσει στην ανάδειξη πιο αξιόπιστων προγνωστικών προτύπων, πέραν του σταδίου που καθορίζει μέχρι σήμερα την πρόγνωση των ασθενών με ΚΠ. Επίσης μπορεί να αναδείξει πολλαπλούς στόχους θεραπευτικής παρέμβασης, τόσο στο πλαίσιο της μοριακής στοχευμένης θεραπείας (molecular target therapy), όσο και στο πλαίσιο ανοσοθεραπείας, εφόσον τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν TAAs.

2 ΙΔΟ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΟΣΟΔΙΑΦΥΓΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Η σχέση του ανοσιακού συστήματος με τον καρκίνο έχει αποτελέσει, εδώ και έναν αιώνα περίπου, αντικείμενο εντονότατου ενδιαφέροντος και μελέτης. Η κακοήθης εξαλλαγή (malignant transformation) των κυττάρων αποτελεί ένα συχνό γεγονός που, στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων. Αυτό, ως ένα βαθμό, φαίνεται ότι οφείλεται στη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος που είναι ικανό να εντοπίζει και να καταστρέφει, τα εξαλλασσόμενα και ενδεχομένως επικίνδυνα κύτταρα. Η άποψη αυτή που φέρεται ως θεωρία της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου (cancer immunosurveillance), προτάθηκε αρχικά από τον Ehrlich το 1909, και 50 χρόνια αργότερα παρουσιάστηκε από τους Burnett και Thomas, έχει επανέλθει πρόσφατα στο προσκήνιο. Σύμφωνα με αυτήν, τα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν με μεγάλη συχνότητα στον οργανισμό αναγνωρίζονται ως ξένα και εξαλείφονται από τη δράση του ανοσιακού συστήματος [190]. Στις αρχές της δεκαετίας, διατυπώθηκε μια διαφορετική, πιο ολοκληρωμένη θεωρία, εισάγοντας τον όρο ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου (cancer immunoediting) [191]. Η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι η σχέση ανοσιακού συστήματος και καρκίνου ακολουθεί μια εξελικτική πορεία τριών φάσεων (elimination, equilibrium, escape), η οποία οδηγεί στην ογκογένεση [192]. Τελικά, οι όγκοι δημιουργούνται όταν τα καρκινικά κύτταρα, κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης με το ανοσιακό σύστημα, αποκτήσουν έναν ανοσοανθεκτικό φαινότυπο που τους προσδίδει την ικανότητα διαφυγής από την ανοσοεπιτήρηση [193, 194].

Έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί που ευνοούν την ανάπτυξη του όγκου ενάντια στην ανοσιακή απάντηση (Πίνακας 6). Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες: σε μηχανισμούς που μειώνουν ενεργά την ανοσιακή απόκριση κατά του όγκου και σε μηχανισμούς, με τους οποίους τα κύτταρα των όγκων αποφεύγουν την αναγνώριση και καταστροφή που μεσολαβείται από τα T κύτταρα [195].

Ένας από τους γνωστότερους μηχανισμούς διαφυγής που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα των όγκων, είναι η μειωμένη έκφραση ή ακόμη και η ολική απώλεια των μορίων HLA από την επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, ένα φαινόμενο που είναι καλά τεκμηριωμένο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [196]. Αποτέλεσμα της τροποποίησης της έκφρασης των τάξης I MHC-μορίων είναι η ανικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επάγουν κυτταρολυτική ανοσιακή απόκριση. Άλλος ένας μηχανισμός είναι η γονιδιωματική αστάθεια των όγκων, που επιτυγχάνεται με τη μειωμένη έκφραση των TAAs ή και των HLA μορίων, ή ακόμη και επεμβαίνοντας στην επεξεργασία των TAAs ή των μηχανισμών παρουσίαισής τους (π.χ. πρωτεασώματα, TAP-1) [197]. Επιπλέον, η

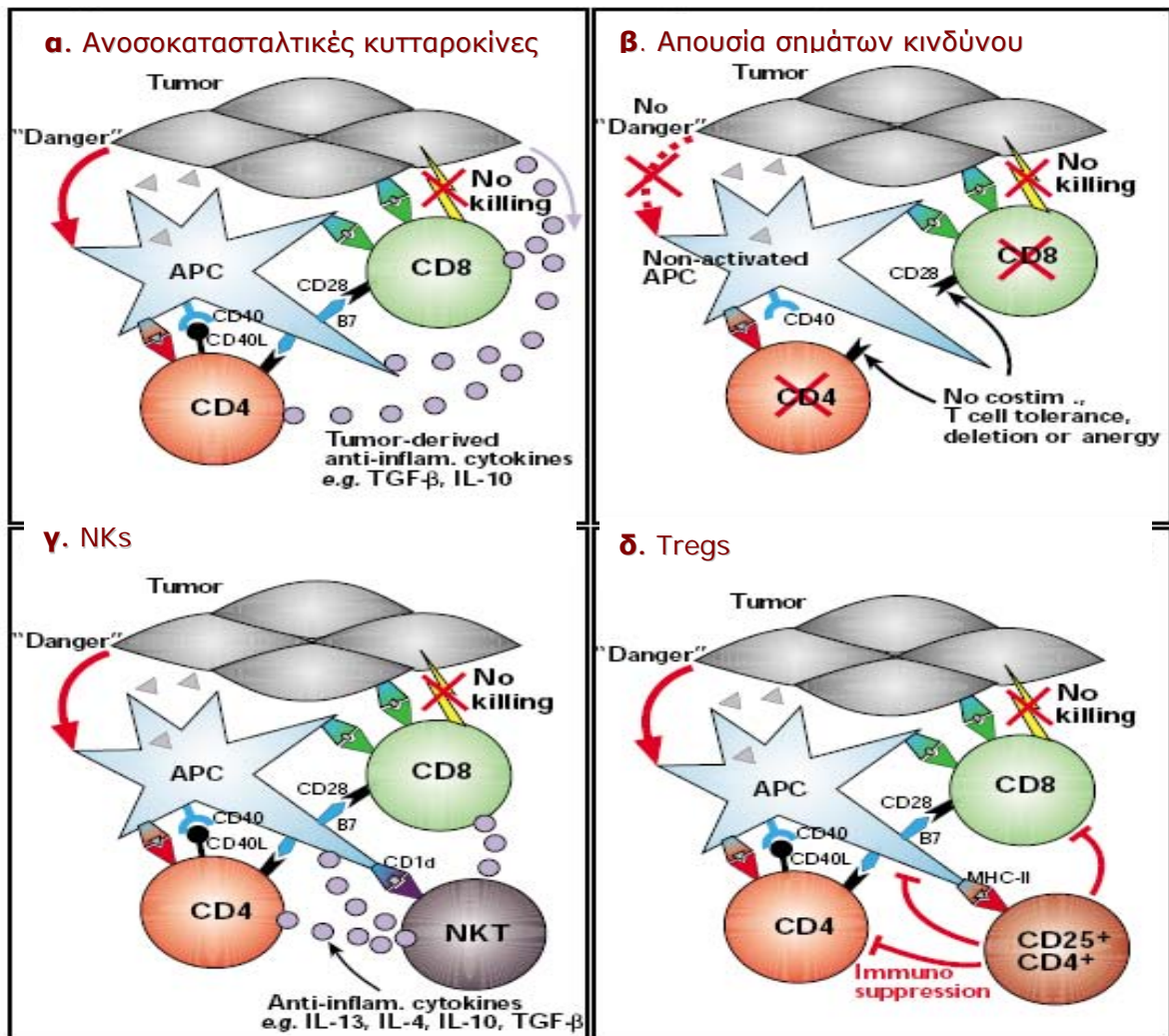
Πίνακας 6: Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής [195]

Μηχανισμοί επαγωγής περιφερικής ανοχής	<ul style="list-style-type: none"> • CD4+ CD25+ T κύτταρα • CD4+NKs
Μηχανισμοί όπου εμπλέκονται ενεργά οι όγκοι	
Μετατροπή του καρκινικού φαινότυπου	<ul style="list-style-type: none"> • Απώλεια HLA ή μειωμένη έκφραση • Απώλεια έκφρασης MICA-B
Παραγωγή παραγόντων που επηρεάζουν τα T κύτταρα	<ul style="list-style-type: none"> • Αναστολή της ωρίμανσης των T κυττάρων • Μείωση έκφρασης συνυποδοχέων • Απελευθέρωση προαποπτωτικών μορίων • Συνεχής έκφραση ενζύμων που περιορίζουν τη δράση των T κυττάρων
Απελευθέρωση παραγόντων που επηρεάζουν την πρόκληση απάντησης από τα T κύτταρα	<ul style="list-style-type: none"> • Αναστολή της ωρίμανσης των DCs

και η έκφραση λεμφοκυτταροτοξικών μορίων (όπως FAS-L) [200, 201] από τα κακοήθη κύτταρα, υποδηλώνουν ότι ο καρκίνος μπορεί να αντιδρά με ενεργό τρόπο ενάντια στην αναγνώριση και δράση του ανοσιακού συστήματος (Εικόνα 11α). Κατά αυτόν τον τρόπο, παρόλο που τα διηθητικά T κύτταρα αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα, η δράση τους μπορεί να ανασταλεί. Ένας βασικός μηχανισμός ανοσοδιαφυγής είναι η αναστολή της ωρίμανσης των APCs λόγω έλλειψης σημάτων κινδύνου από τα καρκινικά κύτταρα. Η ανικανότητα ενεργοποίησης των APCs και κατ' επέκταση, η στέρηση συνδιεγερτικών μορίων από αυτά (B7), αναστέλλουν την T ειδική ανοσιακή απόκριση (Εικόνα 11β), έτσι τα ανώριμα DCs προάγουν την ανοχή παρά την ανοσία [202]. Ακόμη, τα καρκινικά κύτταρα (όπως και τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα) στερούνται συνδιεγερτικών μορίων όπως τα B7-1/CD80 και B7-2/CD86, τα οποία εκφράζονται φυσιολογικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Στην έλλειψη συνδιέγερσης, τα T κύτταρα έχουν τη τάση να μετατρέπονται σε ανενεργά και να επιτρέπουν έτσι την ανάπτυξη του όγκου [203].

Τέλος, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αποτύχει να απορρίψει τον καρκίνο λόγω ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων που προκύπτουν από τη μεσολάβηση άλλων ανοσιακών κυττάρων, όπως τα NKs T κύτταρα, τα ρυθμιστικά T κύτταρα και τα μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα. Τα NKs T κύτταρα φαίνεται να έχουν κατασταλτική δράση. Εκφράζουν ταυτόχρονα τον υποδοχέα των T κυττάρων και υποδοχείς των NKs και είναι γενικά ικανά να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγονικά γλυκολιπίδια που παρουσιάζονται μέσω του CD1d. Αφού συναντήσουν ένα αντιγόνο, τα ενεργοποιημένα NKs εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένης της IFN-γ,

της ιντερλευκίνης-4 και της IL-13. Με τη βοήθεια των κυτταροκινών αυτών, τα NKs μεσολαβούν στην καταστολή της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης μέσω μείωσης της



Εικόνα 11: Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής: α) παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα καρκινικά κύτταρα, β) απουσία σημάτων κινδύνου, γ) καταστολή μέσω των NKs, δ) καταστολή μέσω των Tregs (CD4+CD25+) [202].

δράσης των CD4+ και των CD8+ T λεμφοκυττάρων καθώς και των APCs (Εικόνα 11γ). Τα Tregs (CD4+CD25+) κύτταρα χρησιμοποιούν διαφορετικά και όχι πλήρως γνωστά μονοπάτια, αλλά όλα πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην αντιγονοειδική T κυτταρική ανοχή (Εικόνα 11δ). Φυσιολογικά εμποδίζουν την ανάπτυξη της αυτοανοσίας εναντίον κυττάρων του ίδιου του οργανισμού και στο πλαίσιο της ανοσολογίας του καρκίνου, καταστέλλουν την αντικαρκινική ανοσία. Έχει καταδειχθεί η συμμετοχή των CD25+CD4+ T κυττάρων στον περιορισμό της αντικαρκινικής δράσης στον άνθρωπο, αναστέλλοντας τη δράση ενεργών CD8+ T κυττάρων στο σημείο του όγκου. Σε αρκετές μελέτες παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα αυτού του υποπληθυσμού των T κυττάρων στα PBMCs ή στην περιοχή του όγκου των ασθενών με μελάνωμα και

καρκίνο του εντέρου, πνεύμονα, ωοθηκών, μαστού και παγκρέατος. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως το αυξημένο ποσοστό των CD25+CD4+ T κυττάρων συσχετίζεται αντίστροφα με το στάδιο της νόσου [195]. Τέλος, τα MSCs είναι ένας πληθυσμός μυελικών κυττάρων που έχει περιγραφεί πρόσφατα και περιλαμβάνει τα ανώριμα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρρηνα, τα DCs και τα μυελικά κύτταρα σε πιο πρόωρα στάδια διαφοροποίησης. Τα MSCs κύτταρα αναστέλλουν τα T κύτταρα που ενεργοποιούνται από αντιγόνα, με ένα μηχανισμό που απαιτεί ένζυμα-κλειδιά του μεταβολισμού της L-αργινίνης (L-Arg): τη συνθετάση του νιτρικού οξέος (NOS) και την αργινάση (ARG) [197].

Ο μεταβολισμός βασικών αμινοξέων είναι μια ακόμη στρατηγική που εφαρμόζουν οι όγκοι για να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των T κυττάρων. Τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος που στρατολογούνται από τους όγκους, χρησιμοποιούν το μεταβολισμό των αμινοξέων για να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα κοντινών σε αυτά κυττάρων και να προκαλέσουν μερικές από τις δυσλειτουργίες του ανοσιακού συστήματος που οδηγούν στην ανοσοκαταστολή [204]. Τα λεμφοκύτταρα και κυρίως τα T κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα στην παρουσία και συγκέντρωση συγκεκριμένων αμινοξέων στο μικροπεριβάλλον τους που μπορούν να επηρεάσουν την ανοσολογική τους δράση. Τα βασικότερα αμινοξέα που εμπλέκονται στην ανοσοδιαφυγή είναι: η αργινίνη (L-Arg), που καταβολίζεται από τα ένζυμα ARG1, ARG2 και NOS [205], η κυστεΐνη που καταβολίζεται από το ένζυμο θιοριδοξίνη (thioredoxin) [206] και η τρυπτοφάνη (L-Trp) που διασπάται από τα ένζυμα IDO και TDO [207].

Η ενεργοποίηση του ενζύμου IDO, που αποικοδομεί την τρυπτοφάνη, συνδέθηκε αρχικά με την περιφερική ανοχή και την ανοχή της μητέρας προς το έμβρυο, πρόσφατα όμως αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται και στη διαφυγή του καρκίνου από το ανοσιακό σύστημα [208, 209]. Καθώς φαίνεται, η IDO αποικοδομώντας την τρυπτοφάνη στερεί από τα T κύτταρα ένα από τα πιο βασικά αμινοξέα, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Το ένζυμο αυτό εκφράζεται στους πρωτογενείς όγκους και τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς και από πλασματοκυτταρικά DCs στους επιχώριους λεμφαδένες του όγκου. Σε διαφορετικά καρκινικά μοντέλα, συστηματική χορήγηση συγκεκριμένου αναστολέα της IDO, οδήγησε στη μερική αναστροφή της ανοσοκαταστολής που προκαλείται από τον όγκο [210]. Ο ρόλος της IDO στην ανοσιακή διαφυγή του όγκου θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια.

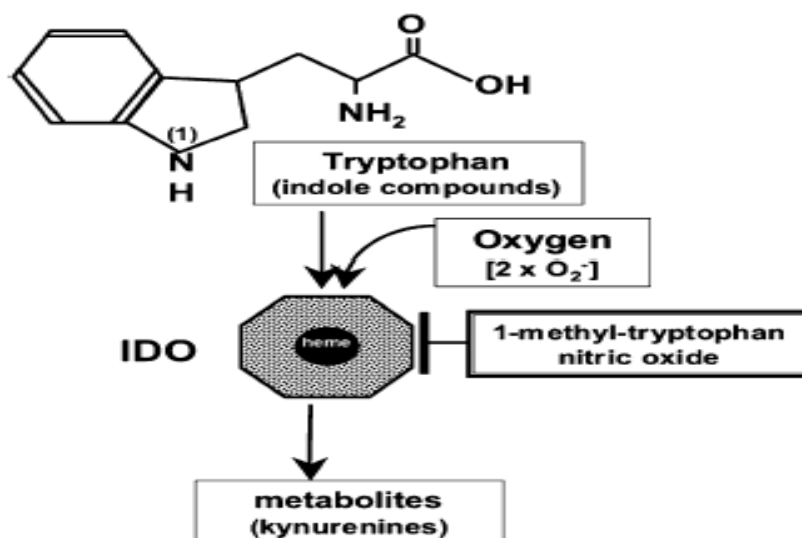
2.1 2,3 Διοξυγονάση της Ινδολεαμίνης

Στους μονοκύτταρους οργανισμούς, η έλλειψη των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών αποτελεί μια κοινή βιολογική στρατηγική για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού

ανταγωνιστικών κυττάρων. Για πολλά χρόνια ήταν αποδεκτό ότι η IDO λειτουργεί ως αντιμικροβιακός αμυντικός μηχανισμός επιτρέποντας στα κύτταρα να απαλείφουν την τρυπτοφάνη από ενδοκυτταρικές δεξαμενές ή τοπικά μικροπεριβάλλοντα. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν IDO καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων *in vitro* με τη μείωση της συγκέντρωσης της τρυπτοφάνης στο θρεπτικό μέσο [211, 212].

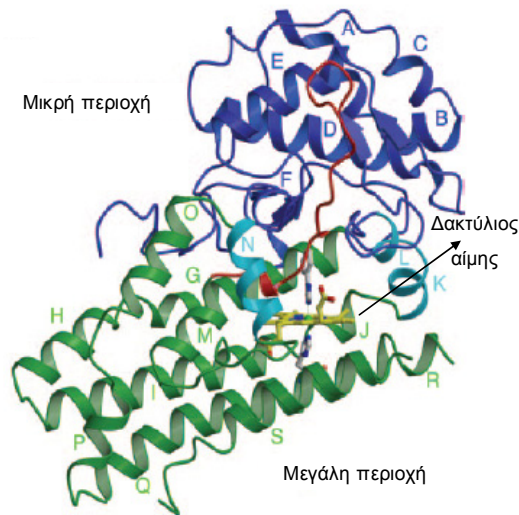
2.1.1 Δομή

Η IDO είναι μία κυτοσολική μονομερής αιμοπρωτεΐνη μεγέθους 430 αμινοξέων, μοριακού βάρους 45.324 KD, που καταλύει το πρώτο βήμα του καταβολισμού της τρυπτοφάνης μέσω του μονοπατιού της κυνουρενίνης (Εικόνα 12)[213]. Στους ανθρώπους, το μονοπάτι αυτό καταβολίζει πάνω από το 90% της τρυπτοφάνης, με πρώτο βήμα την οξειδωτική διάσπαση του 2-3 διπλού δεσμού της τρυπτοφάνης, με συνέπεια την παραγωγή N-φορμυλ-κυνουρενίνης [214]. Οι Littlejohn et al. (2003) [215] ανακάλυψαν ότι για την πρόσδεση της αίμης είναι απαραίτητη μόνο η His346, υποδεικνύοντας αυτό το αμινοξύ ως τον κεντρικό συνδέτη. Επιπλέον, η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση της Asp274 ελάττωσε τη δυνατότητα της IDO να δεσμεύσει την αίμη. Κατά συνέπεια, τόσο η His346 όσο και η Asp274 είναι απαραίτητες για την πρόσδεση της αίμης και συνεπώς για την ενζυματική δραστηριότητα της IDO. Πρόσφατα, έγινε γνωστή και η κρυσταλλική δομή της IDO [216], που έδειξε πως περιλαμβάνει δύο περιοχές με έλικες που σχηματίζουν μία δομή τσέπης, όπου βρίσκεται ο δακτύλιος της αίμης (Εικόνα 13).



Εικόνα 12: Καταβολικό μονοπάτι της τρυπτοφάνης μέσω της IDO [227]

Το ανθρώπινο γονίδιο (*INDO*) έχει έκταση 15 kb και περιλαμβάνει 10 εξόνια (Εικόνα 14). Το 5-άκρο του *INDO* mRNA βρίσκεται 33 νουκλεοτίδια πριν το κωδικόνιο έναρξης (ATG) της μετάφρασης. Ανάλυση Southern blot έδειξε ότι το γονίδιο *INDO* βρί



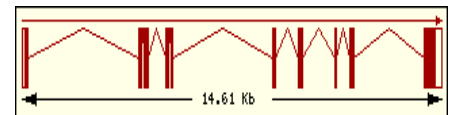
Εικόνα 13: Τρισδιάστατη δομή της 2,3 διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης [216].

σκειται σε ένα μόνο αντίγραφο. Οι Burkin et al. αναλύοντας με PCR και Southern blot μια σειρά από υβρίδια κυττάρων για την παρουσία του ανθρώπινου γονιδίου της IDO, καθόρισαν ότι το γονίδιο βρίσκεται στη περικεντρομερική περιοχή του χρωμοσώματος 8, πιθανώς στη 8p11-q11 [217] ενώ με φθορίζον *in situ* υβριδισμό, περιορίστηκε ο εντοπισμός του στη θέση 8p12-q11 [218].

Στη περιοχή του υποκινητή των γονιδίων της IDO ανθρώπου και ποντικού εντοπίζονται ρυθμιστικά μοτίβα που αποκρίνονται σε κυτταροκίνες της φλεγμονής. Παρόντα σε κάθε υποκινητή είναι δύο στοιχεία που αποκρίνονται σε ενεργοποίηση από ιντερφερόνη (ISRE), μία περιοχή δράσης IFN- γ (GAS) και μοτίβα δομής κουτιού X, Y του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II [207]. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η IDO αρχικώς χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας φλεγμονής, για τον περιορισμό των μικροβιακών λοιμώξεων, και μόνο αργότερα στην εξέλιξη απέκτησε έναν ανοσορρυθμιστικό ρόλο τόσο στη μητρική ανοχή όσο και στην ανοσιακή διαφυγή του καρκίνου. Η ρύθμιση της έκφρασης της IDO σε επίπεδο γονιδίου, πρωτεΐνης και ενεργότητας είναι πολύπλοκη και παραμένει αντικείμενο εντατικής έρευνας.

1 AATTTCTCACTGCCCTGTGATAAACTGTGGTCACTGGCTGTGGCAGCAACTATTATAAG
 61 ATGCTCTGAAAACCTCTTCAGACACTGAGGGGCACCAGAGGAGCAGACTACAAGAATGGCA
 121 CACGCTATGGAAAACCTCTGGACAATCAGTAAAGAGTACCATATTGATGAAGAAGTGGGC
 181 TTTGCTCTGCAAATCCACAGGAAAATCTACCTGATTTTTATAATGACTGGATGTTTCATT
 241 GCTAAACATCTGCCTGATCTCATAGAGTCTGGCCAGCTTCGAGAAAAGAGTTGAGAAGTTA
 301 AACATGCTCAGCATTGATCATCTCACAGACCACAAGTCACAGCGCCTTGCACGTCTAGTT
 361 CTGGGATGCATCACCATGGCATATGTGTGGGGCAAAGGTCATGGAGATGTCGGTAAGGTC
 421 TTGCCAAGAAATATTGCTGTTCCTTACTGCCAACTCTCCAAGAACTGGAAGTGCCTCCT
 481 ATTTTGGTTTATGCAGACTGTGTCTTGGCAAACCTGGAAGAAAAGGATCCTAATAAGTAT
 541 GTAACACTGGGAACATGGACGCTTTTGTCTCATTTCGTGATGGAGACTGCAGTAAAGGA
 601 TTCTTCTGGTCTCTCTATTGGTGGAAAATAGCAGCTGCTTCTGCAATCAAAGTAATTCCT
 661 ACTGTATTCAAGGCAATGCAAAATGCAAGAACGGGACACTTTGCTAAAGGCGCTGTTGGAA
 721 ATAGTCTTCTTGCTTGGAGAAAAGCCCTTCAAGTGTTCACCAAATCCACGGCAAGTATCAT
 781 GTGAACCCAAAAGCATTTTTTCAGTGTCTTTCGCATATATTTGTCTGGCTGGAAAGGCAAC
 841 CCCCAGTATCAGACGGTCTGGTGTATGAAGGGTTCTGGGAAGACCCAAAGGAGTTTGCA
 901 GGGGCGAGTGCAGGCCAAAGCAGCGTCTTTTCAGTGCCTTGACGCTCCTGCTGGGCATCCAG
 961 CAGACTGCTGGTGGAGGACATGCTGCTCAGTTCCTCCAGGACATGAGAAGATATATGCCA
 1021 CCAGCTCACAGGAACCTCCTGTGCTCATTAGAGTCAAATCCCTCAGTCCGTGAGTTTGTG
 1081 CTTTCAAAGGATGATGCTGGCCTGCGGGAAGCTTATGACGCCTGTGTGAAAGCTCTGGTC
 1141 TCCCTGAGGAGCTACCATCTGCAAATCGTGACTAAGTACATCCTGATTCCTGCAAGCCAG
 1201 CAGCCAAAGGAGAATAAGACCTCTGAAGACCCTTCAAACCTGGAAGCCAAAGGAAGTGGAA
 1261 GGCAGTATTAATGAATTTCTGAAAGACTGTAAGAAGTACAAGTGAAGAAATCCCTTTTG
 1321 AAGGAAGGTAAATGTAACCCAAACAAGAGCACATTTTATCATAGCAGAGACATCTGTATGC

Δομή μεταγράφου



Αμετάφραστη περιοχή

Εξόνια- αλλαγή χρώματος κειμένου

GGCACCATGAGCAGCGGGGCCAACA
MSSGANN
 CAGAAAACAGTAAAGCCCATCCCCC
 QKTVKPIPP

Μετάφραση

Κωδικόνια- αλλαγή χρώματος φόντου

```

403 -K--E--G--*-. . . . .
1381 ATTCCTGTCATTACCCATTGTAACAGAGCCACAAACTAATACTATGCAATGTTTTACCAA
1441 TAATGCAATACAAAAGACCTCAAAAATACCTGTGCATTTCTTGTAGGAAAACAACAAAAGG
1501 TAATTATGTGTAATTATACTAGAAAGTTTTGTAATCTGTATCTTATCATTGGAATAAAATG
1561 ACATTC

```

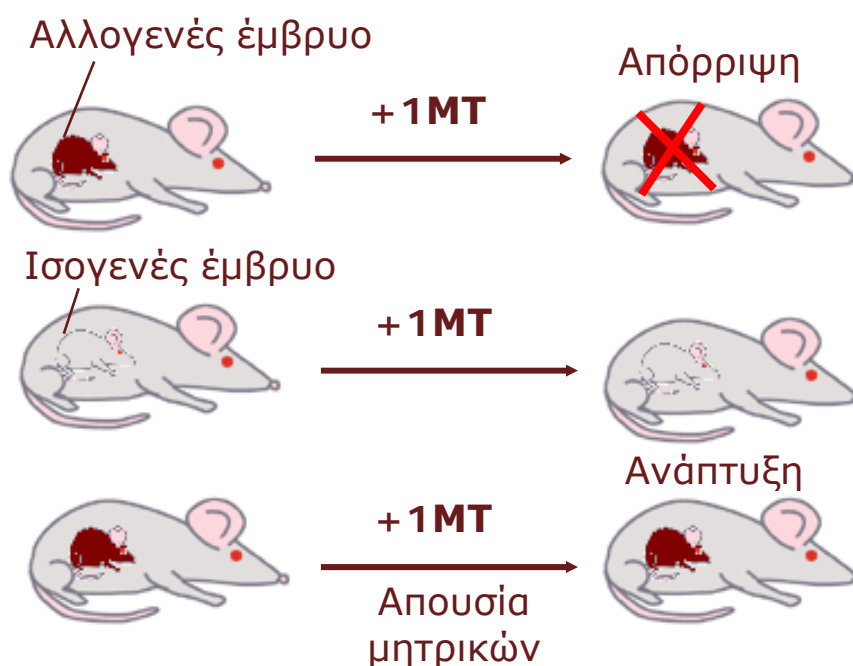
Εικόνα 14: Ακολουθία μεταγράφου cDNA της IDO [217].

2.1.2 IDO ως ανοσολογικός μεσολαβητής

Μέχρι πρόσφατα, ήταν αποδεκτό ότι ο βασικός ρόλος της IDO περιοριζόταν στους αντιμικροβιακούς αμυντικούς μηχανισμούς, καθώς ήταν γνωστή η ισχυρή συσχέτιση της με τη φλεγμονή. Τα φλεγμονώδη κύτταρα, με τη βοήθεια της IDO καταβολίζουν την τρυπτοφάνη, στερώντας το απαραίτητο αυτό αμινοξύ από τα μολυσμένα κύτταρα, οδηγώντας τα στο θάνατο. Ο προστατευτικός αυτός ρόλος της IDO επεκτείνεται σε ένα μεγάλο εύρος ενδοκυττάρων μικροβίων και ιών όπως τοξόπλασμα, χλαμύδια, HIV, HSV κ.ά. [219, 220, 221, 222]. Η παραγωγή της IDO επάγεται μέσω του JAK-STAT σηματοδοτικού μονοπατιού, από διάφορους μεσολαβητές της φλεγμονής (ιντερφερόνες, TNF, IL-1) και μιτογόνους παράγοντες (LPS), από τους οποίους ως πιο ισχυρός εμφανίζεται η IFN- γ [223, 224, 225]. Η IFN- γ έχει αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση σε πολλά κύτταρα στα σημεία φλεγμονής, προσφέροντας προστασία από διάφορα ενδοκυττάρια παθογόνα, τουλάχιστον εν μέρει εξαιτίας της επαγωγής της IDO [226]. Η δραστηριότητα της IDO όταν αξιολογείται αδρά σε ολόκληρα ομογενοποιημένα ιστού, είναι ανιχνεύσιμη σε χαμηλά επίπεδα σε πολλούς ιστούς υγιών (χωρίς μικρόβια ζώων), και είναι εμφανώς υψηλότερη σε ιστούς που αφαιρούνται από ζώα που εκτίθενται σε παθογόνα ή σε παράγοντες φλεγμονής. Υγιείς ιστοί που υπόκεινται σε συνεχή ερεθίσματα φλεγμονής, όπως βλεννώδεις επιφάνειες του πνεύμονα, του εντέρου, του οφθαλμού και της μήτρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, εκφράζουν IDO στη φυσιολογική τους λειτουργία [227]. Ωστόσο, τα σχετικά επίπεδα αποικοδόμησης της τρυπτοφάνης ποικίλλουν αρκετά μεταξύ των ιστών. Η δραστηριότητα της IDO υπάρχει συνεχώς σε υψηλά επίπεδα στο έντερο και στην επιδιδυμίδα, και σε χαμηλότερα επίπεδα στο σπλήνα, τους λεμφαδένες και το θύμο αδέν. Αυτό το πρότυπο της συνεχούς βασικής δραστηριότητας της IDO, δεν είναι σύμφωνο με την υπόθεση ότι ο μόνος ρόλος της είναι να αποκρίνεται σε μικροβιακές μολύνσεις. Επιπλέον, η αξιολόγηση της δραστηριότητάς της σε ομογενοποιημένα ιστού είναι ενδεχομένως παραπλανητική, επειδή σε συγκεκριμένο ιστό, μόνο μια μειονότητα κυττάρων μπορεί να παράγει IDO [207].

Η εμπλοκή της IDO στη διατήρηση της μητρικής ανοχής προς το αντιγονικά "ξένο" έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης - ένα εντυπωσιακό παράδειγμα επίκτητης, ειδικής ανοχής σε αντιγόνο- ανέδειξε περαιτέρω τον ανοσορρυθμιστικό της

ρόλο. Ο ανατομικός διαχωρισμός μητέρας και εμβρύου και η αντιγονική ανωριμότητα του εμβρύου δεν μπορούν να εξηγήσουν την επιβίωση του εμβρυϊκού ημιαλλογενούς μοσχεύματος. Το ένζυμο IDO εκφράζεται στα ανθρώπινα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα και στο ενδομήτριο μερικές μέρες μετά την εμφύτευση στα ποντίκια που εγκυμονούν. Επιπλέον, τα επίπεδα της μητρικής τρυπτοφάνης στο ορό μειώνονται προοδευτικά από το πρώτο προς το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης στον άνθρωπο, συμπίπτοντας χρονικά με την ανάπτυξη και αύξηση του πλακούντα. Φαίνεται ότι κύτταρα που παράγουν IDO στην επιφάνεια επαφής μητέρας-εμβρύου δημιουργούν τοπικό μικροπεριβάλλον που αναστέλλει την ενεργοποίηση των μητρικών T κυττάρων από τα εμβρυϊκά αλλοαντιγόνα [228]. Ποντίκια που εγκυμονούσαν εκτέθηκαν σε 1MT, ένα φαρμακολογικό αναστολέα της IDO. Η αγωγή αυτή προκάλεσε γρήγορη και ενιαία απόρριψη του αλλογενούς κυήματος μερικές ημέρες μετά την εμφύτευση. Σε αντίθεση, τα ισογενή κυήματα αναπτύχθηκαν κανονικά σε ποντίκια που χορηγήθηκε 1MT, όπως και τα αλλογενή κυήματα απουσία μητρικών T κυττάρων (Εικόνα 15). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ότι ο μηχανισμός κατά την εγκυμοσύνη που οδηγεί σε αλλογενή ανοχή του εμβρύου, περιλαμβάνει την παραγωγή της IDO, η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μητρικών T κυττάρων με γρήγορη κατανάλωση τρυπτοφάνης [229].



Εικόνα 15: Ο ρόλος της IDO στην εγκυμοσύνη [228].

Η IDO συμμετέχει επίσης στην καταστολή των T κυτταρικών αποκρίσεων σε ΜHC αλλομοσχεύματα [230, 231] και σε αυτοαντιγόνα σε ζωικά μοντέλα, όπως τα επιρρηπή

σε διαβήτη, μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια [209]. Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων, εμφάνιζαν σημαντική αναλογία ανασταλτικών μονοκυττάρων με αποδέσμευση κινουρενίνης (kynurenine), υποδεικνύοντας αυξημένο καταβολισμό της τρυπτοφάνης μέσω της IDO αλλά και αναστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων [232]. Επίσης κατά την οξεία απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της τρυπτοφάνης και της IDO τόσο στον ορό όσο και στα ούρα των ασθενών [233].

Είναι εμφανές λοιπόν, ότι η IDO έχει ανοσοκατασταλτικό ρόλο, παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων με ένα μηχανισμό που μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται από τα κύτταρα των όγκων, προκειμένου να διαφύγουν από την επιτήρηση του ανοσιακού συστήματος. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η IDO προάγει την ανοσιακή διαφυγή των όγκων αναλύονται στο επόμενο κεφάλαιο.

Κύτταρα που διηθούν τον όγκο και εμπλέκονται στην ανοσιακή απόκριση (μονοκύτταρα, μακροφάγα, και DCs), εκφράζουν υψηλά επίπεδα IDO και έχει αποδειχθεί ότι η έκφρασή της, οδηγεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [209, 211, 212, 234, 235]. Φαρμακολογική παρεμπόδιση της δραστηριότητας της IDO κατά τη διάρκεια της κύησης σε ποντίκια, οδηγεί στην απόρριψη των εμβρυϊκών αλλομοσχευμάτων και εμποδίζει τη δυνατότητα των CD8+ DCs να καταστείλουν καθυστερημένου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας σε TAAs [211]. Οι Mellor et al. χρησιμοποίησαν δύο μοριακές γενετικές στρατηγικές για να ενισχύσουν τη δραστηριότητα της IDO σε διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές και σε νέα στελέχη διαγενετικών ποντικών, ώστε να διασταυρώσουν τα αποτελέσματα των φαρμακολογικών μελετών και να εξετάσουν περαιτέρω τη σχέση ανάμεσα στη δραστηριότητα της IDO και την παρεμπόδιση της απόκρισης των T κυττάρων [212]. Βρέθηκε ότι η ικανότητα απόκρισης των αλλογενών T κυττάρων μετά από τη μεταφορά τους, ήταν λιγότερο ισχυρή στα διαγενετικά ποντίκια, όπου η IDO υπερεκφράζεται στο μικροπεριβάλλον του ιστού. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η γενετικά ενισχυμένη δραστηριότητα της IDO εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων *in vitro* και *in vivo*.

Η IDO όμως μπορεί να εκφράζεται παράλληλα και από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα [208, 209]. Πρόσφατα, οι Uyttenhove et al. κατέδειξαν ότι οι περισσότεροι ανθρώπινοι όγκοι εκφράζουν συνεχώς IDO (Πίνακας 7). Στα καρκινικά κύτταρα διαπιστώθηκε έκφραση της IDO σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη, παγκρέατος και τραχήλου, καθώς επίσης και σε πολλά δείγματα άλλων καρκινικών τύπων, συμπεριλαμβανομένου του ΜΜΚΠ. Σε όλες τις περιπτώσεις τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα του στρώματος ήταν αρνητικά, γεγονός που προτείνει ότι η έκφραση της IDO στα κύτταρα των όγκων δεν προέκυψε από την *in vivo* έκθεση στην

IFN-γ. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της IDO από ανοσιακά κύτταρα των όγκων ποντικών αποτρέπει την απόρριψή τους σε προ-ανοσοποιημένα ποντίκια. Αυτή η επίδραση συνοδεύεται από έλλειψη συσσώρευσης ειδικών T κυττάρων στο σημείο του όγκου και μπορεί να αντιστραφεί εν μέρει με τη συστηματική χορήγηση αναστολέα της IDO, χωρίς αξιοσημείωτη τοξικότητα [208]. Μετέπειτα μελέτες, ανέδειξαν την έκφραση της IDO στα καρκινικά κύτταρα σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως παχέος εντέρου [236], ωοθηκών [237], μαστού [238] και ενδομητρίου [239]. Ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζει, η αναγνώριση της προγνωστικής αξία της IDO σε κάποιες από αυτές. Σε μελέτη που αφορούσε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών φάνηκε ότι η έκφραση της IDO είχε αρνητική συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών [237], σε άλλη μελέτη σε περίπτωση καρκίνου του ενδομητρίου βρέθηκε αρνητική συσχέτιση τόσο με την συνολική επιβίωση (OS) όσο και με την επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) [239], ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν και στην μελέτη των Brandacher et al. σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου μετά όμως από τους πρώτους 45 μήνες από το χειρουργείο [236]. Αντίθετα αποτελέσματα έδωσε μόνο μία μελέτη στο ηπατοκυτταρικό καρκίνο, όπου οι ασθενείς που εκφράζανε IDO είχαν μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς υποτροπή (RFS) [240] Ωστόσο, σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Astigiano et al. υποστήριξαν ότι στο ΜΜΚΠ η IDO δεν εκφράζεται από τα κύτταρα του όγκου, αλλά από φυσιολογικά κύτταρα που διηθούν το στρώμα γύρω από τον όγκο και προσδιορίστηκαν ως ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα [241].

Ορχικό σπερμογονίωμα	0/10	0	0	0
Καρκινικός τύπος	IDO+ καρκινικά δείγματα (θετικά προς εξεταζόμενα)	Ποσοστό IDO θετικών καρκινικών κυττάρων		
		>50%	10- 50%	<10%
Καρκίνος προστάτη	11/11	7	3	1
Καρκίνος ορθού/εντέρου	10/10	5	3	2
Καρκίνος παγκρέατος	10/10	8	2	0
Καρκίνος αυχένα	10/10	0	4	6
Καρκίνος ενδομητρίου	5/5	0	3	2
Καρκίνος στομάχου	9/10	4	3	2
Γλοιοβλάστωμα	9/10	6	3	0
ΜΜΚΠ	9/11	1	1	7
Καρκίνος ουροδόχου κύστης	8/10	3	1	4
Καρκίνος ωοθηκών	8/10	0	3	5
Καρκινώματα κεφαλής και λαιμού	7/11	0	3	4
Καρκίνος οισοφάγου	7/10	1	2	4
Μεσοθηλίωμα	6/10	2	1	3
Καρκίνος νεφρικών κυττάρων	5/10	0	1	4
Μελάνωμα	11/25	0	0	11
Καρκίνος μαστού	3/10	2	0	1
Καρκίνος θυρεοειδούς	2/10	0	0	2
Λεμφώματα	4/18	0	0	4
ΜΚΠ	2/10	0	0	2
Σαρκώματα	2/10	0	1	1
Ηπατοκαρκινώματα	2/5	0	0	2
Καρκίνος επινεφριδίων	2/5	1	0	1
Χοριοκαρκινώματα	1/5	0	0	1
Δερματικά βασεοκυτταρικά	1/5	0	0	1

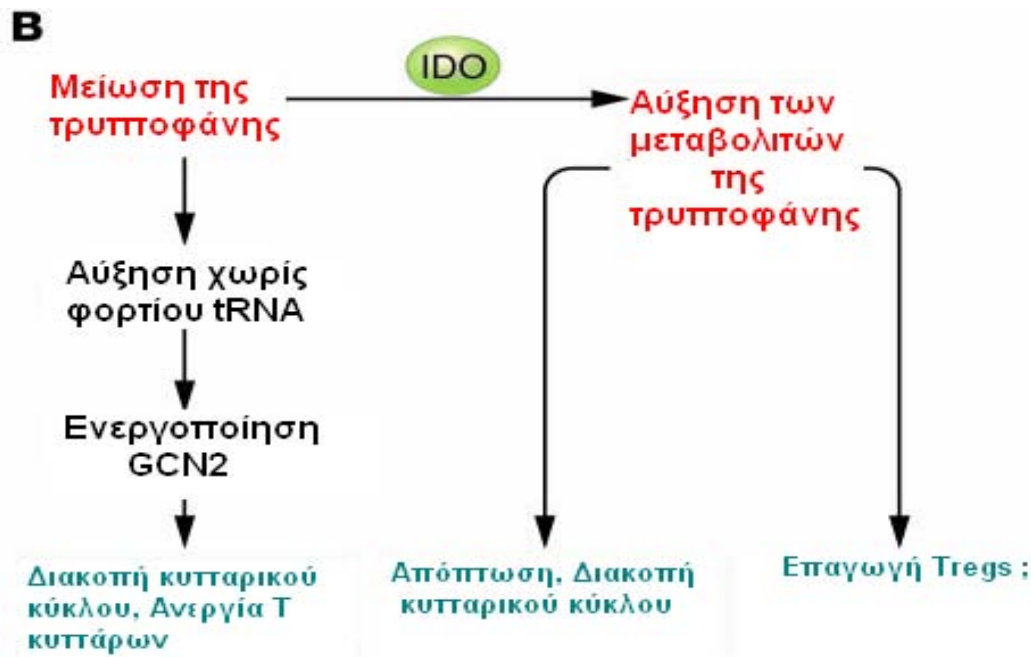
Πίνακας 7: Έκφραση της IDO σε ανθρώπινους όγκους [208].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκφραση της IDO στους επιχώριους λεμφαδένες του όγκου [242, 243], όπου και λαμβάνει χώρα η διαμόρφωση της ανοσιακής απόκρισης με ενορχηστρωτή τα DCs. Δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί πλήρως τα κύτταρα που εκφράζουν IDO στους λεμφαδένες, φαίνεται πάντως να αποτελούν κατηγορίες των DCs, όπως τα πλασματοκυτταρικά DCs κ.ά. Έχει καταδειχθεί ότι τα IDO⁺ DCs των επιχώριων λεμφαδένων, καταστέλλουν τις T κυτταρικές αποκρίσεις in vitro και επάγουν την ανεργία των ειδικών έναντι αντιγόνων T κυττάρων όταν μεταφερθούν σε άλλο ξενιστή [243, 249].

Γενικότερα, διαφορετικοί μηχανισμοί και σε διάφορα επίπεδα συμβάλλουν στην έκφραση της IDO στον καρκίνο: η IDO μπορεί να εκφραστεί, ακόμα και ταυτόχρονα, στον όγκο, στη ζώνη διήθησης του όγκου, στο στρώμα γύρω από τον όγκο και στους επιχώριους λεμφαδένες, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανοσοδιαφυγή του.

2.1.3 IDO και ανοσιακή διαφυγή του καρκίνου

Η μείωση των επιπέδων της τρυπτοφάνης στο μικροπεριβάλλον του όγκου, θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα είτε της αυξημένης παραγωγής της IDO που την καταβολίζει είτε αυξημένης κατανάλωσής της τόσο από τα καρκινικά κύτταρα όσο και από τα APCs του ξενιστή [212]. Ανεξάρτητα από το γεγονός ποια κύτταρα εκφράζουν IDO (καρκινικά κύτταρα, APCs του ξενιστή ή πιθανότατα και τα δύο), έχει καταδειχθεί ο ανοσοκατασταλτικός της ρόλος στον καρκίνο. Η IDO αποικοδομώντας την τρυπτοφάνη προκαλεί μείωση της συγκέντρωσής της στο μικροπεριβάλλον, ενώ παράλληλα παράγονται τοξικοί μεταβολίτες (Εικόνα 16) [244]. Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους η IDO, προστατεύει τον όγκο από το ανοσιακό σύστημα. Ο πρώτος αναφέρεται στην άμεση καταστολή της δράσης ή και της κλωνικής επέκτασης των T κυττάρων και ο δεύτερος στην επίδραση των APCs σε αυτά [245].



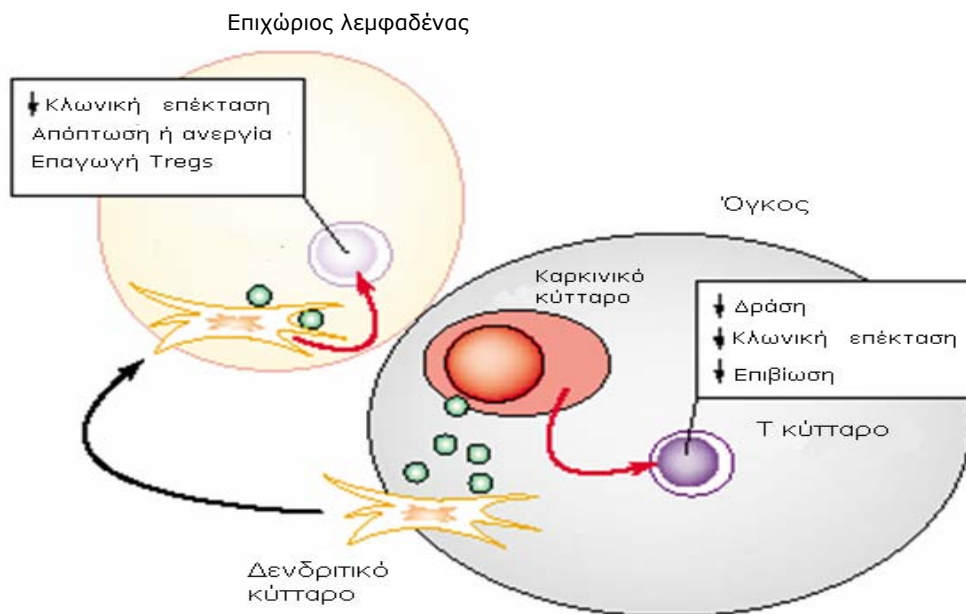
Εικόνα 16: Η IDO αποικοδομεί την τρυπτοφάνη μειώνοντας την συγκέντρωσή της μέσω ενεργοποίησης της GCN2 κινάσης, ενώ παράλληλα παράγονται τοξικοί μεταβολίτες με αποτέλεσμα την διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την ανεργία και την απόπτωση των T κυττάρων και ίσως, την επαγωγή Tregs [244].

Οι όγκοι χρησιμοποιούν την IDO για να διαφύγουν την ανοσιακή απόκριση [246], με μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς που εμπλέκονται στη διατήρηση της μητρικής ανοχής ή στην αποδοχή αλλομοσχευμάτων [228, 247]. Το απλούστερο μοντέλο προτείνει ότι παρουσία της IDO, τα T κύτταρα είναι ανίκανα να πολλαπλασιαστούν και να υποβληθούν σε κλωνική επέκταση, εξ αιτίας ενός σημείου ελέγχου στον κυτταρικό τους κύκλο (στο μέσο της G1 φάσης) που είναι ευαίσθητο στην έλλειψη τρυπτοφάνης. Η IDO είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο, έτσι, ο καταβολισμός της τρυπτοφάνης λαμβάνει χώρα μέσα στο κύτταρο και εφόσον η τρυπτοφάνη διασχίζει εύκολα τη πλασματική μεμβράνη διαμέσου συγκεκριμένων μεταφορέων, δημιουργείται ένα μικροπεριβάλλον με έλλειψη τρυπτοφάνης. Επειδή το K_m της συνθετάσης του τρυπτοφανυλ-RNA είναι χαμηλότερο από αυτό της IDO, η πρωτεϊνοσύνθεση προχωρά παρά τα μειωμένα επίπεδα τρυπτοφάνης και αυτό επιτρέπει στα περισσότερα κύτταρα να αναπτύσσονται. Παραδείγματος χάριν, αν και τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη αύξηση *in vitro*, δεν αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός τους παρουσία της IDO. Αντίθετα, τα T κύτταρα, σταματούν να πολλαπλασιάζονται υπό τέτοιες συνθήκες επειδή έχουν ένα ευαίσθητο στην τρυπτοφάνη σημείο ελέγχου, το οποίο σταματά τον κυτταρικό τους κύκλο στην G1 φάση όταν η συγκέντρωση της τρυπτοφάνης είναι κάτω από 0.5-1 μM . Επιπλέον, τα T κύτταρα που έχουν σταματήσει να αναπτύσσονται καθίστανται ευαίσθητα σε απόπτωση και είναι πιθανό, έτσι, να εξαλειφθούν [208]. Σημαντική είναι και η παρουσία των APCs που εκφράζουν IDO στο μικροπεριβάλλον του όγκου, τα οποία καταβολίζοντας την τρυπτοφάνη μπορούν να καταστείλουν τη δράση των T

κυττάρων. Πρόσφατα, προσδιορίστηκε στα παραγόμενα από τα μονοκύτταρα μακροφάγα, η έκφραση δύο τύπων υποδοχέων (χαμηλής και υψηλής συγγένειας), που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια μεταφορά της τρυπτοφάνης. Η έκφραση των υψηλής συγγένειας υποδοχέων επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, παρέχοντας το απαραίτητο, φτωχό σε τρυπτοφάνη περιβάλλον, μειώνοντας έτσι τη δράση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων [248]. Μία πρόσφατη μελέτη κατέδειξε πως η αντίδραση στο στρες που εξαρτάται από την κινάση GCN2, επάγεται ειδικά στα ενεργοποιημένα T κύτταρα παρουσία κυττάρων που εκφράζουν IDO, οδηγώντας τα T κύτταρα σε ανεργία [249]. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη θεωρία της απαλοιφής της τρυπτοφάνης καθώς η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2 αποτελεί ειδική αντίδραση στην αύξηση των επιπέδων των χωρίς φορτίο μορίων tRNA στο κυτταρόπλασμα.

Κατά την αποικοδόμηση της τρυπτοφάνης από την IDO, παράγονται διάφοροι μεταβολίτες, η συγκέντρωση των οποίων αυξάνεται στο αίμα και στους διάφορους ιστούς. Μερικοί από τους μεταβολίτες της τρυπτοφάνης είναι τοξικοί για τα T κύτταρα *in vitro* [235, 250] και μπορούν να προάγουν την ανεργία και το θάνατό τους [245]. Όμως, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή η τοξικότητα που προκαλείται από τους μεταβολίτες θα μπορούσαν να περιορίσουν σημαντικά την ανοσιακή απάντηση μόνον εάν όλα τα πιθανά αποκρινόμενα T κύτταρα θα μπορούσαν να έρθουν σε άμεση επαφή με ένα κύτταρο που εκφράζει IDO. Επειδή αυτή η υπόθεση δεν είναι ιδιαίτερα πιθανή, το παραπάνω μοντέλο ανταποκρίνεται περισσότερο σε ένα μοντέλο τοπικής καταστολής της ανοσιακής απάντησης, παρά σε πραγματική κατάσταση σωματικής ανοχής [209].

Οι όγκοι δημιουργούν γενικευμένη ανοχή στα αντιγόνα τους, ταυτόχρονα με την τοπική ανοσοκαταστολή (Εικόνα 17). Εάν η IDO συμβάλλει σε αυτήν την ευρύτερη σωματική ανοχή, θα πρέπει να το κάνει διαμέσου ενός μηχανισμού μεγαλύτερης εμβέλειας από τις τοπικές μόνο επιδράσεις του ίδιου του ενζύμου. Μέχρι στιγμής, κανένας τέτοιος μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί, ακόμα κι αν είναι πλέον σαφές ότι η IDO είναι σε θέση να προκαλέσει πραγματική ρύθμιση και καταστολή του ανοσιακού συστήματος, που συνεπάγεται ότι κάποιος τέτοιος μηχανισμός θα πρέπει να λειτουργεί [251]. Μία πιθανή εξήγηση, διατυπώθηκε πρόσφατα από τους Mellor και Munn [252]. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση θα μπορούσε να υπάρχει ένα μονοπάτι μέσω του οποίου μερικά από τα κύτταρα T, που έχουν σταματήσει τον πολλαπλασιασμό τους εξαιτίας της IDO, θα μπορούσαν να υιοθετήσουν ένα ρυθμιστικό φαινότυπο. Η θεωρία αυτή

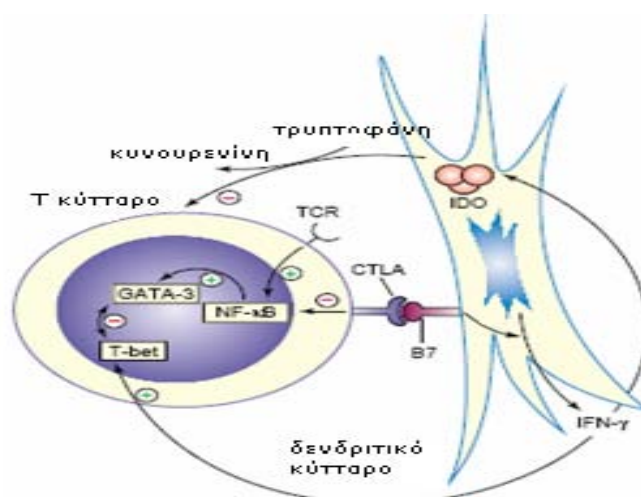


Εικόνα 17: Μοντέλο δράσης της IDO. Η IDO (κόκκινα βέλη) εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα και δημιουργεί ένα τοπικό ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον γύρω από τον όγκο (δεξιά), είτε με την καταστολή της δράσης και του πολλαπλασιασμού των T- κυττάρων, ή με απευθείας καταστροφή των διηθητικών κυττάρων χρησιμοποιώντας τοξικούς μεταβολίτες της τρυπτοφάνης. Εναλλακτικά, δενδριτικά κύτταρα που εκφράζουν IDO μπορούν να προσλάβουν αντιγόνα του όγκου (πράσινες σφαίρες) και να μεταναστεύσουν σε λεμφαδένες που διηθούν τον όγκο, όπου θα παρουσιάσουν τα αντιγόνα σε παρθένα T- κύτταρα (αριστερά). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απαλοιφή αυτών των κλώνων, αποτυχία κλωνικής επέκτασης ή ακόμα και τη μετατροπή κάποιων κυττάρων σε κύτταρα με ρυθμιστικό φαινότυπο. Με τον τρόπο αυτό η IDO θα μπορούσε να οδηγήσει τόσο σε τοπική αλλά και γενικευμένη ανοχή σε αντιγόνα των όγκων [251].

παραμένει υποθετική, επειδή η παραγωγή Tregs από APCs που εκφράζουν IDO δεν έχει καταδειχθεί πειραματικά. Ωστόσο, αυξάνεται ο αριθμός των αναφορών στη βιβλιογραφία που αναφέρουν την επαγωγή Tregs από δενδριτικά κύτταρα [253] και αρχίζει να διαφαίνεται μια σχέση ανάμεσα στα Tregs και την IDO [254, 255]. Επίσης, πρόσφατα διατυπώθηκε πως οποιοσδήποτε καθορισμένος πληθυσμός DCs μπορεί να δημιουργήσει *de novo* Tregs ενάντια σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο [209]. Επειδή οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους τα APCs προκαλούν τη μετατροπή των παρθένων T κυττάρων σε Tregs είναι μέχρι σήμερα ασαφείς, η πιθανή συμβολή της IDO σε αυτήν τη διαδικασία παραμένει άγνωστη. Εντούτοις, σε διηθητικά λεμφοκύτταρα καρκίνου ΜΜΚΠ [256] και σχετικά με τον όγκο λεμφοκύτταρα καρκίνου των ωοθηκών [257] παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά κυττάρων $CD4^+ CD25^+$, που υποδεικνύουν σύνδεση των κυττάρων αυτών με την ανοσοκαταστολή στους συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Η πρόκληση παραγωγής των Tregs παραμένει αντικείμενο έρευνας. Δεν είναι γνωστό εάν στη διαδικασία αυτή συμβάλλει η διακοπή του κυτταρικού κύκλου από την IDO στα αποκρινόμενα T κύτταρα, ή εάν προς την κατεύθυνση αυτή οδηγούν μονοπάτια απόκρισης στο στρες που προκαλείται από την έλλειψη τρυπτοφάνης ή τους τοξικούς μεταβολίτες της [209].

Πρόσφατα, καταδείχθηκε μια μηχανιστική σύνδεση μεταξύ της IDO και της δραστηριότητας ανοχής που παρουσιάζει το ανασυνδυσασμένο αντιγόνο CTLA4-Ig [258, 259]. Πρόσδεση του CTLA4-Ig σε υποδοχείς B7 ή B7-2 στην επιφάνεια των DCs αποδείχθηκε ότι ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην επαγωγή της IDO *in vitro* (Εικόνα 18) [260]. Αντιθέτως, αναστολή της IDO με τη χρήση 1MT αναίρεσε τη πρόκληση ανοχής του CTLA4-Ig σε μοντέλο μεταμόσχευσης κυττάρων νησιδίων (islets). Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι η IDO αποτελεί έναν ενδογενή μεσολαβητή μιας μορφής αυτοανοχής και επίσης ένα πιθανό μηχανισμό πρόκλησης ανοχής *de novo* σε νέα αντιγόνα. Υπό αυτή την έννοια, η IDO θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει έναν αποτελεσματικό μηχανισμό διαφυγής των όγκων από την ανοσιακή επιτήρηση.

Μεταξύ των TILs, ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκφραση της IDO στα NKs. Βρέθηκε ότι η δραστηριότητα της IDO ρυθμίζει την κυτταροτοξική δράση των NKs, συμβάλλοντας και με αυτόν τον τρόπο στην ανοσιακή διαφυγή των καρκινικών κυττάρων [261, 262]. Σε άλλη μελέτη, η έκφραση της IDO συνδέθηκε με τη μειωμένη έκφραση των αντιγόνων MHC τάξης I [263], ενός ακόμη μηχανισμού που χρησιμοποιούν οι όγκοι για να προάγουν την ανοσιακή διαφυγή. Για να εξεταστεί η υπόθεση αυτή, κατασκευάστηκε ένας αδενοϊικός φορέας της IDO και αξιολογήθηκε η επίδρασή της στην έκφραση των αντιγόνων MHC τάξης I στα ανασυνδυσασμένα κερατινοκύτταρα. Τα πειράματα αποκάλυψαν μια σημαντική μείωση της έκφρασης των μεμβρανικών αντιγόνων MHC I στα γενετικά τροποποιημένα κερατινοκύτταρα σε σχέση με τα μη ανασυνδυσασμένα ή τα ανασυνδυσασμένα με κενό φορέα κύτταρα. Περαιτέρω πειράματα κατέδειξαν ότι προσθήκη τρυπτοφάνης ή ανασταλτικού παράγοντα της IDO απεκατέστησε σε μεγάλο βαθμό την έκφραση των MHC τάξης I στα IDO επιμολυσμένα κερατινοκύτταρα. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής προτείνουν τη μειωμένη έκφραση των MHC I ως ένα ακόμη μηχανισμό μέσω του οποίου η IDO μεσολαβεί στην τοπική διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα.



Εικόνα 18: Ο πιθανός ρόλος του CTLA-4 στη ρύθμιση της ομοιόστασης των Τ βοηθητικών κυττάρων. Ο CTLA-4 λειτουργεί σαν μόριο σύνδεσης για τους υποδοχείς B7 στα DCs, και επάγει την ελευθέρωση IFN- γ από αυτά. Η IFN- γ μπορεί με τη σειρά της να επάγει στα Τ κύτταρα τον παράγοντα δέσμευσης σε Th1 (T-bet) που αλληλορυθμίζει το GATA-3. Αυτοκρινής IFN- γ επίσης επάγει την έκφραση της IDO στα DCs. Μια σειρά επιδράσεων που εξαρτώνται από την IDO και την κυνουρενίνη, συμπεριλαμβανομένων της εξάλειψης της τρυπτοφάνης, της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, μπορεί να συμβάλουν στη ρύθμιση της ομοιόστασης των Τ κυττάρων από το CTLA-4 [260].

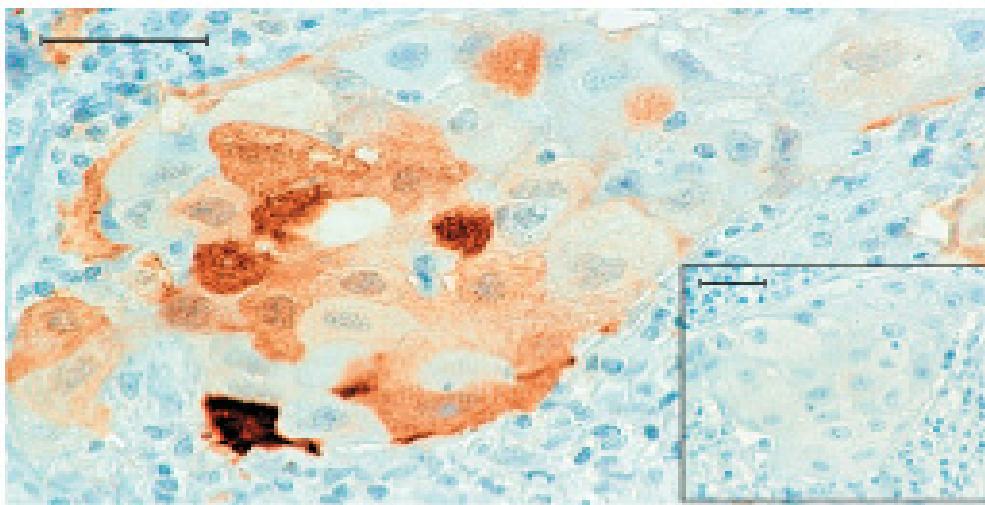
2.1.4 IDO και καρκίνος του πνεύμονα

Ο πνεύμονας καθώς έρχεται σε συνεχή επαφή με αντιγόνα, παρουσιάζει μοναδικούς αμυντικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς. Στο πλαίσιο αυτό, αποτελεί ένα από τα όργανα που εκφράζουν συστηματικά IDO [224], η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία. Ο ρόλος της φαίνεται να είναι προστατευτικός για τον πνευμονικό ιστό από βλάβη που θα μπορούσε να προκληθεί από τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα σε περιπτώσεις φλεγμονής από ιούς ή βακτήρια [264, 265], σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις [266, 267] καθώς και στη μη απόρριψη αλλομοσχεύματος πνεύμονα [268, 269]. Οι Swanson et al. κατέδειξαν ότι η βασική αυτή έκφραση της IDO, οφείλεται στην παραγωγή της από τα APCs του διάμεσου ιστού τα οποία μπορούν να αναστείλουν τις Τ κυτταρικές απαντήσεις *in vitro* και *in vivo* [269]. Ποιο συγκεκριμένα, η αναστολή της IDO σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε 1MT, οδήγησε σε πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων στον πνεύμονα και σε φλεγμονή (καταστροφή του επιθηλίου των αεραγωγών και του διάμεσου ιστού), σε σχέση με ποντίκια ελέγχου. Την ικανότητα της IDO να προκαλεί ανοσοκαταστολή με διάφορους μηχανισμούς που αναλύθηκαν παραπάνω, εκμεταλλεύεται και ο καρκίνος προκειμένου να διαφύγει της ανοσοεπιτήρησης και να αναπτυχθεί «ανενόχλητος».

Οι Yasui et al. σε μια παλιότερη μελέτη, έδειξαν με ενζυμικό προσδιορισμό ότι η δραστηριότητα της IDO ήταν περίπου 5 φορές (εώς 20 φορές) μεγαλύτερη στο μη προσβεβλημένο πνευμονικό ιστό ασθενών με καρκίνο, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (ασθενείς με πνευμοθώρακα) [270]. Επίσης φάνηκε ότι η IFN- γ είναι ο κύριος παράγοντας που προάγει δόσοεξαρτώμενα, την *de novo* παραγωγή της IDO *in vitro* και *in vivo*. Στον καρκινικό ιστό η δραστηριότητα της IDO δεν διέφερε από τους μάρτυρες, εκτός από μία περίπτωση όπου προσδιορίστηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα [270]. Στη μελέτη των Fridberg et al., η έκφραση της IDO προσδιορίστηκε με ανοσοϊστοχημεία στα μονοπύρρηνα κύτταρα που διηθούν τον όγκο και τους επιχώριους λεμφαδένες ποντικών που ανέπτυξαν καρκίνο μετά από εμφύτευση κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα (Lewis lung carcinoma cells) [242]. Επιπλέον, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές, υποκίνησαν ισχυρότερη αλλογενή Τ κυτταρική απάντηση *in vitro*, παρουσία αναστολέα της IDO, ενώ στα πειράματα σε ποντίκια, η αναστολή της καθυστέρησε την ανάπτυξη του

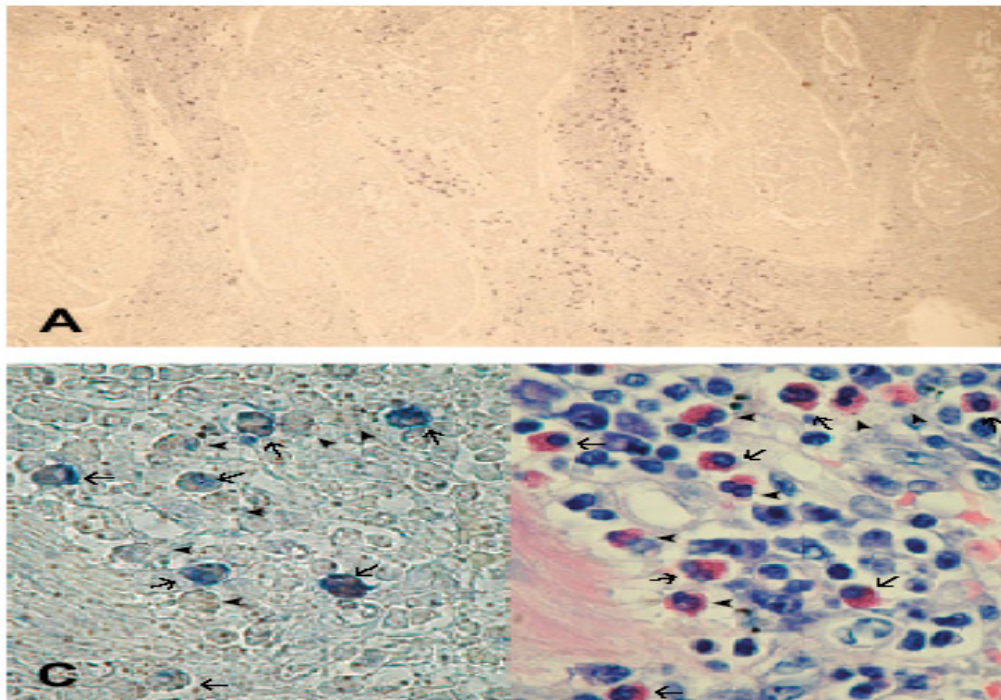
όγκου. Η έκφρασή της στο μικροπεριβάλλον του όγκου αλλά και στους επιχώριους λεμφαδένες, υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην ανοσοδιαφυγή του καρκίνου τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο. Στη συνέχεια οι Uyttenhove et al. κατέδειξαν την έκφρασή της IDO από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα τόσο σε διάφορες κυτταρικές σειρές όσο και σε ανθρώπινους ιστούς διαφόρων τύπων καρκίνου (Πίνακας 7), μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του πνεύμονα [208]. Στην κυτταρική σειρά NCI-H596 ΜΜΚΠ, προσδιορίστηκε το mRNA του *INDO* με RT-PCR πραγματικού χρόνου, ενώ η πρωτεΐνη ανιχνεύεται με western blot και ενζυμικές μεθόδους. Όσον αφορά τον καρκινικό ιστό, η IDO ανιχνεύτηκε με ανοσοϊστοχημεία στα 9 από τα 11 δείγματα ΜΜΚΠ (Εικόνα 19), στην πλειοψηφία τους (7 δείγματα) όμως, εκφράστηκε σε μικρό ποσοστό των καρκινικών κυττάρων (<10%), ενώ στην περίπτωση του ΜΚΠ ανιχνεύτηκε μόνο σε 2 από τα 10 δείγματα.

Εκτός από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα που παράγουν IDO είτε σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεων είτε υπό την επίδραση της IFN- γ , φαίνεται ότι η IDO εκφράζεται και από κύτταρα που διηθούν τον όγκο. Είναι δυνατόν σε τύπους καρκίνου όπως προστάτη, παγκρέατος, ή παχέος εντέρου, η IDO να εκφράζεται κυρίως από τα κύτταρα των όγκων, ενώ σε άλλους τύπους όπως ο ΜΜΚΠ ή το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η IDO να εκφράζεται κυρίως από τα διηθητικά κύτταρα των όγκων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση της IDO μπορεί να δώσει ένα αυξητικό πλεονέκτημα στους όγκους, τουλάχιστον σε εκείνους τους όγκους όπου μια ανοσολογική απόρριψη μπορεί να λάβει χώρα, όπως ο ΜΜΚΠ. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανοσιακή καταστολή που προκαλεί η IDO θα μπορούσε να υποθάψει την αύξηση των όγκων. Την άποψη αυτή ήρθε να



Εικόνα 19: Έκφραση της IDO στα κύτταρα ΜΜΚΠ [208]

ενισχύσει η πρόσφατη μελέτη των Astigiano et al. όπου κατέδειξαν ότι στο ΜΜΚΠ, η IDO δεν εκφραζόταν από τα καρκινικά κύτταρα αλλά από τα ηωσινόφιλα που διηθούν τον όγκο (Εικόνα 20) [241]. Εξετάστηκε επίσης σε 17 ασθενείς, εάν η έκφραση της IDO είχε προγνωστική αξία και βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των IDO-θετικών διηθητικών κυττάρων και της επιβίωσης. Όμως δεν έγινε δυνατόν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το εάν ο μεγάλος αριθμός IDO-θετικών διηθητικών κυττάρων είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της δυσμενούς πρόγνωσης [241].



Εικόνα 20: Έκφραση της IDO στα ηωσινόφιλα που διηθούν τον όγκο σε ΜΜΚΠ [241].

2.1.5 Θεραπευτικές παρεμβάσεις

Η ταυτοποίηση των αντιγόνων των όγκων που αναγνωρίζονται από τα T κύτταρα, επέτρεψαν το σχεδιασμό πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του καρκίνου, που βασίζονται κυρίως στον εμβολιασμό με διάφορους συνδυασμούς αντιγόνων. Αν και αυτές οι κλινικές δοκιμές βρίσκονται ακόμη σε πρώιμα στάδια, έχει παρατηρηθεί ήδη σε μερικές περιπτώσεις υποχώρηση των όγκων [271, 272]. Ωστόσο, αυτές οι θετικές αποκρίσεις εμφανίζονται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των ασθενών [212]. Υπάρχουν πολλοί πιθανοί λόγοι για τους οποίους οι όγκοι δεν υποχωρούν στην πλειοψηφία των ασθενών, συμπεριλαμβανομένης της πιθανότητας ότι το εμβόλιο μπορεί να είναι ανεπαρκές για να προκαλέσει μια ανοσιακή απόκριση σε αυτούς τους ασθενείς. Έχει καταδειχθεί ότι η IDO εκφράζεται πολύ συχνά στον καρκίνο, αποτελώντας έναν σημαντικό παράγοντα που εμπλέκεται με διάφορους μηχανισμούς στην ανοσιακή

αντίσταση των όγκων. Παρά το γεγονός ότι κάποιοι από τους μηχανισμούς ανοσοκαταστολής της IDO, δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη πλήρως, η αναστολή της δράσης της προβάλλει ως ενδιαφέρουσα θεραπευτική προοπτική καθώς θα μπορούσε να ενισχύσει τα αποτελέσματα της ανοσοθεραπείας.

Για την αναστολή της IDO έχει χρησιμοποιηθεί ένα ανάλογο της τρυπτοφάνης, η 1MT [208, 225, 263, 273] η οποία παρουσιάζεται με δύο μορφές, το L και D ισομερές [274]. Σε διάφορες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο ισομερή της 1MT είτε μόνα τους είτε ως ρακεμικό μείγμα, διαπιστώθηκαν όμως, σημαντικές βιολογικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά την ικανότητά τους να αναστέλλουν την IDO. Το L ισομερές φαίνεται να αποτελεί έναν αποτελεσματικό αναστολέα της IDO κυρίως όμως *in vitro* ενώ το D ισομερές εμφανίζει εφάμιλλη αν όχι ποιο δραστική αναστολή της *in vivo* και ποιο αποτελεσματική αποκατάσταση της ανοσοκατασταλτικής της δράσης στη μεσολαβούμενη T κυτταρική απόκριση [275]. Παραταύτα παραμένει ανοιχτό το ερώτημα ποιο από τα δύο ισομερή της 1MT είναι το πιο κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες. Ο ανασταλτικός παράγοντας 1MT παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα καθώς είναι ενεργός σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, και έχει διαπιστωθεί ότι κάποιοι CTLs κλώνοι ανθρώπου αναπτύσσονται καλύτερα *in vitro* παρουσία του αναστολέα [208]. Η ασφάλεια της θεραπείας κρίνεται ικανοποιητική εφόσον δεν έχει αναφερθεί σοβαρή τοξικότητα από τη χορήγησή της σε ποντίκια. Επιπλέον, δεν εμποδίζει τη διοξυγονάση της τρυπτοφάνης, το ηπατικό ένζυμο που ρυθμίζει τα σωματικά επίπεδα τρυπτοφάνης και δεν αναγνωρίστηκαν φαινόμενα αυτοανοσίας μετά από συστηματική χορήγησή της [208, 276], γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν αναμένονται σημαντικές παρενέργειες κατά την κλινική εφαρμογή της. Έχουν αναγνωριστεί και άλλοι παράγοντες, κυρίως φυτικής προέλευσης που διαθέτουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δραστηριότητα της IDO και οι οποίοι χρήζουν περαιτέρω αξιολόγησης [277, 278].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνεργική δράση των κυτταροτοξικών φαρμάκων με αναστολείς της IDO [279]. Οι Muller et al. πρότειναν ότι ανασταλτικοί παράγοντες του ανθρώπινου γονιδίου της IDO, μπορούν να βελτιώσουν την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, οδηγούμενοι από το γεγονός ότι σε μοντέλο καρκίνου του μαστού ποντικών, η συγχορήγηση μικρομοριακών αναστολέων της IDO και κυτταροτοξικών παραγόντων (κυκλοφωσφαμίδης, πακλιταξέλης, πλατίνας, δοξορουμπικίνης), οδήγησαν στην υποχώρηση όγκων που ήταν ανθεκτικοί σε μονοθεραπεία [210]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε μια πρόσφατη μελέτη όπου αναδείχθηκε και η πιθανή ανοσολογική βάση της συνεργικής τους δράσης καθώς η 1MT δεν φάνηκε να δρα όταν οι όγκοι αναπτύχθηκαν σε ανοσοανεπαρκή RAG1^{-/-} ποντίκια [275]. Στην προσπάθεια ενίσχυσης της ανοσοθεραπείας έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης, διάφοροι παράγοντες που διεγείρουν την ανοσιακή απόκριση έναντι των όγκων

και κάποιοι από αυτούς δοκιμάζονται ήδη σε κλινικές μελέτες (CpG ODN, CD137 κά.). Πολλοί όμως από τους επικουρικούς παράγοντες των εμβολίων επάγουν κυρίως μέσω μεσολαβητών φλεγμονής, την παραγωγή της IDO, προκαλώντας παράλληλα ανεπιθύμητη ανοσοκαταστολή [244]. Η ταυτόχρονη αναστολή της IDO μπορεί να συνεισφέρει και προς αυτή την κατεύθυνση [280].

Από τις μέχρι σήμερα μελέτες διαφαίνεται ότι η αναστολή της IDO, θα μπορούσε να διεκδικήσει μία θέση στη θεραπευτική φαρέτρα των ασθενών με καρκίνο. Ο συνδυασμός της με εμβόλια, αναμένεται να δώσει νέα ώθηση στην ανοσοθεραπευτική προσέγγιση, ενώ η συγχορήγησή της με κυτταροτοξικά φάρμακα προσφέρει κλινικό προβάδισμα καθώς μπορεί να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη, χωρίς να στερεί από του ασθενείς την κλασική αντιμετώπιση τους με χημειοθεραπεία. Ωστόσο, θα πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά της σε περισσότερα προκλινικά μοντέλα, προτού χρησιμοποιηθεί σε κλινικά πρωτόκολλα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3 ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 9 καρκινικές κυτταρικές σειρές ΜΜΚΠ: CALU-1, CALU-6, GILI, ONET, NCIH596 NCIH460, NCIH661, NCIH441, SK-LU-1, ενώ έλαβαν μέρος 28 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα, οι οποίοι νοσηλεύθηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας το διάστημα Απρίλιος 2005 – Νοέμβριος 2006.

Οι ασθενείς ήταν 23 άντρες και 5 γυναίκες, μέσης ηλικίας 63.4 ± 9.7 έτη, (48-79 ετών), 17 καπνιστές, 7 πρώην καπνιστές και 4 μη καπνιστές, σε καλή βιολογική κατάσταση (26 ασθενείς με ECOG performance status (PS)=0, και PS=1 οι υπόλοιποι 2 ασθενείς). Σύμφωνα με την προεγχειρητική σταδιοποίηση (cTNM): 14 ασθενείς ήταν σταδίου I, 13 ασθενείς σταδίου II και ένας ασθενής σταδίου III. Όσον αφορά τον ιστολογικό τύπο πρό του χειρουργείου, σε 12 ασθενείς διαγνώσθηκε αδενοκαρκίνωμα, σε 11 πλακώδες, σε 4 ασθενείς ΜΜΚΠ και σε έναν ασθενή ΜΚΠ. Μετά από προεγχειρητικό έλεγχο ακολούθησε χειρουργική αντιμετώπιση κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν 19 λοβεκτομές, μία διλοβεκτομή και 8 πνευμονεκτομές και η χειρουργική αφαίρεση χαρακτηρίστηκε ως πλήρης (complete resection-R0) σε όλες τις περιπτώσεις. Οι ασθενείς ήταν ενήμεροι σχετικά με την παρούσα μελέτη και είχαν συναινέσει σε αυτή εγγράφως.

Ελήφθη καρκινικός ιστός και παρακείμενος μη προσβεβλημένος ιστός σε απόσταση από 2 έως 11 cm από τα μακροσκοπικά όρια του όγκου σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω στη μέθοδο. Σε μία περίπτωση (ασθενής N₀ 15) δεν κατέστη εφικτό να ληφθεί παρακείμενος μη προσβεβλημένος ιστός και σε 4 περιπτώσεις δεν ελήφθη καρκινικός ιστός (ασθενείς N₀ 17, 20, 21, 22). Ιστός συλλέχθηκε και από 1 ασθενή που υποβλήθηκε σε χειρουργική αφαίρεση αμαρτώματος (άνδρας, 62 ετών) και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Οι ασθενείς εκτιμήθηκαν κατά μέσο όρο σε 1 μήνα (από 20 έως 50 ημέρες) και τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά τους όπως διαμορφώθηκαν μετά το χειρουργείο αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 8. Επίσης 18 από τους 28 ασθενείς υποβλήθηκαν σε περαιτέρω θεραπεία: 16 έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία (adjuvant) και 2 παρηγορική χημειοθεραπεία. Στη συνέχεια οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα στα εξωτερικά ιατρεία, με την ανάλογη επανασταδιοποίηση. Η διάμεση παρακολούθηση ήταν 20 μήνες (από 4 έως 36 μήνες).

Πίνακας 8: Κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών

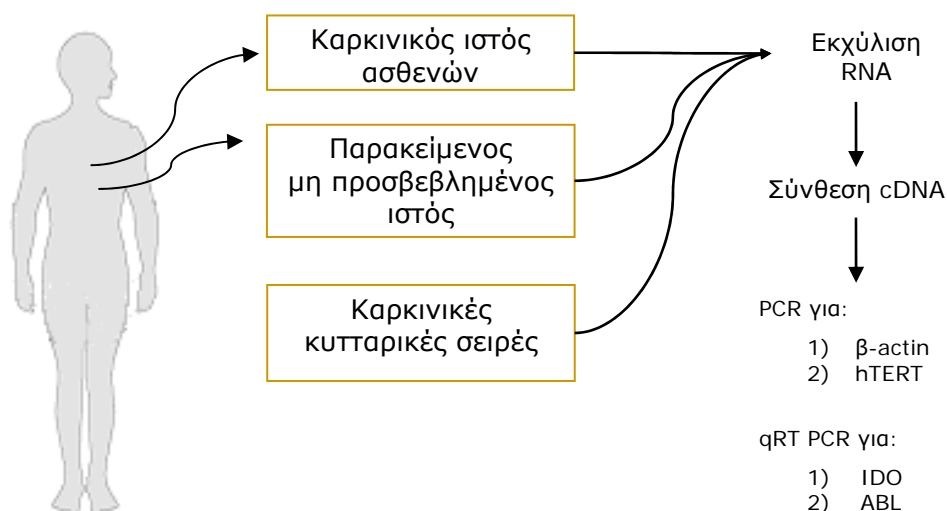
α. Ιστολογικός τύπος, ΑΔ: Αδενοκαρκίνωμα, ΠΛ: Πλακώδες, , ΑΔ-ΒΚ: Αδενοκαρκίνωμα με χαρακτηριστικά βρογχοκυψελιδικού, **β.** Παθολογοανατομική σταδιοποίηση, **γ.** Απόσταση του παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού από τον καρκινικό ιστό σε cm, **δ.** Κ: Καρκινικός ιστός, Φ: Παρακείμενος μη προσβεβλημένος ιστός, -: Δεν ελήφθη δείγμα.

Ασθενείς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος ^α	pT N M ^β	ρΣτάδιο ^β	Διαφοροποίηση	Όγκος cm ³	Απόσταση ^γ	Ιστός ^δ	
1	56	♀	ΑΔ	1 1 0	IIA	Χαμηλή	15	3.5	Κ	Φ
2	65	♂	ΑΔ	3 0 0	IIB	Μέτρια	56	8	Κ	Φ
3	65	♂	ΑΔ	1 2 0	IIIA	Χαμηλή	15	5	Κ	Φ
4	48	♀	ΑΔ	1 0 0	IA	Μέτρια	27	7	Κ	Φ
5	59	♀	ΑΔ	2 2 0	IIIA	Υψηλή	120	8	Κ	Φ
6	73	♂	ΑΔ	2 0 0	IB	Μέτρια	52	5	Κ	Φ
7	55	♂	ΑΔ	4 2 0	IIB	Μέτρια	57	9	Κ	Φ
8	60	♂	ΑΔ	2 1 0	IIB	Χαμηλή	35	11	Κ	Φ
9	65	♂	ΑΔ	3 0 0	IIB	Χαμηλή	55	>4	Κ	Φ
10	74	♂	ΑΔ	2 0 0	IB	Χαμηλή	26	>4	Κ	Φ
11	48	♂	ΑΔ	3 1 0	IIIA	Χαμηλή	1188	>3	Κ	Φ
12	71	♂	ΑΔ	2 2 0	IIIA	Χαμηλή	361	>4	Κ	Φ
13	61	♂	ΠΚ	2 0 1	IV	Χαμηλή	54	8	Κ	Φ
14	67	♂	ΠΚ	1 0 0	IA	Μέτρια	8	10	Κ	Φ
15	55	♂	ΠΚ	2 1 0	IIB	Χαμηλή	42	-	Κ	-
16	79	♂	ΠΚ	2 0 0	IB	Μέτρια	14	9	Κ	Φ
17	70	♂	ΠΚ	2 0 0	IB	Μέτρια	12	-	-	Φ
18	63	♂	ΠΚ	3 1 0	IIIA	Μέτρια	27	-	Κ	Φ
19	79	♂	ΠΚ	2 0 0	IB	Χαμηλή	37	2.5	Κ	Φ
20	59	♂	ΠΚ	2 1 0	IIB	Μέτρια	23	-	-	Φ
21	62	♂	ΠΚ	2 0 0	IB	Χαμηλή	14	10	-	Φ
22	59	♂	ΠΚ	1 1 0	IIA	Μέτρια	13	-	-	Φ
23	58	♂	ΠΚ	2 0 0	IB	Μέτρια	29	>4	Κ	Φ
24	76	♀	ΠΚ	2 0 0	IB	Μέτρια	428	>4	Κ	Φ
25	40	♂	ΜΚΠ	3 1 0	IIIA	Χαμηλή	225	>4	Κ	Φ
26	75	♀	ΑΔ-ΒΚ	2 0 0	IB	Μέτρια	120	>4	Κ	Φ
27	74	♂	ΑΔ-ΒΚ	2 1 0	IIB	Μέτρια	150	>3	Κ	Φ
28	59	♂	ΑΔ-ΒΚ	4 0 1	IV	Χαμηλή	31	>2	Κ	Φ

4 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο σχεδιασμός της μελέτης συνοψίζεται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21: Σχεδιασμός της μελέτης και περιγραφή της μεθοδολογίας.

Η μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης της hTERT και της IDO πραγματοποιήθηκε σε καρκινικές σειρές, και σε καρκινικό και παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση του όγκου. Στα δείγματα έγινε εκχύλιση RNA και στη συνέχεια σύνθεση cDNA, PCR για τα γονίδια της β-ακτίνης και της hTERT ενώ qRT-PCR για τα γονίδια του ABL και της IDO.

4.2 Κυτταρικές μέθοδοι

4.2.1 Συλλογή και επεξεργασία ιστού ασθενών

Μετά την αφαίρεση του λοβού/πνεύμονα, ειδικός παθολογοανατόμος συνέλλεγε τομές πάχους 10μm από το νεοπλασματικό κομμάτι του ιστού και από παρακείμενο τμήμα ιστού που δεν έφερε ένδειξη νόσου. Εν συνέχεια, τα τμήματα του ιστού τοποθετούνταν σε διάλυμα (RLSR, RNA Later Stabilization Reagent, Qiagen Cat 74126), που παρείχε προστασία στο RNA από τις RNAσες του περιβάλλοντος και διατηρούνταν για 24h σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα, μεταφέρονταν σε νέο καθαρό σωληνάριο και αποθηκεύονταν στους -80°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για εκχύλιση RNA. Σε κάθε βήμα της διαδικασίας, όλα τα αντικείμενα που έρχονταν σε επαφή με το δείγμα καθαρίζονταν με διάλυμα RNaseZap (Ambion Cat 9782) που προστατεύει από τη δράση RNAσών.

4.2.2 Καλλιέργεια καρκινικών σειρών

Οι διαθέσιμες καρκινικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες 75cm² (Corning, Cat 430641), ώστε να αποκτηθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων. Τις πρώτες μέρες καλλιέργειας οι καρκινικές σειρές αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10%FBS-RPMI, που αποτελείται από 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού (FBS, Gibco, 10108-157) και πλήρες θρεπτικό μέσο (RPMI, Gibco, Cat 52400-041 με 1%PSG 10,000U/ml Gibco Cat 10378-016, 1%MEM aminoacids Gibco Cat 11140-035 και 0.1% 2ME (50mM) Gibco, Cat 31350-010) σε συνθήκες 37°C, 5%CO₂ και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10%FBS-IDc (IMDM, Gibco Cat 21980-065 αντί RPMI) σε συνθήκες 37°C, 8%CO₂.

4.2.3 Διαδικασία ψύξης κυττάρων

Το πάγωμα των κυττάρων έγινε σε υλικό που αποτελείται από 80% πλήρες θρεπτικό μέσο (SF-IDc), 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού (FBS, Gibco, 10108-157) και 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma Cat D-5879). Στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνταν σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη και μεταφέρονταν στους -80°C, όπου και παρέμεναν για τουλάχιστον 24h. Μετά αποθηκεύονταν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθιά κατάψυξη σε δοχείο υγρού αζώτου.

Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούσαν να καθαριστούν με 1xPBS και να καταψυχθούν σαν ίζημα με άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο ή σε διάλυμα RLT (Lysis reagent, Qiagen, Cat 1015762) με 1% 2-mercaptethanol 14.3M (2ME, Sigma, M-6250) ώστε να χρησιμοποιηθούν για εκχύλιση RNA.

4.3 Μοριακές μέθοδοι

4.3.1 Εκχύλιση RNA

Στο στάδιο της εκχύλισης RNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία RNeasy της Qiagen (Cat 74126). Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε RLT (Lysis reagent) και έγινε ομογενοποίηση του δείγματος με ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 30" και εισαγωγή του 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G (BD, Cat 308027). Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος αιθανόλης 70% (Ethanol, Scharlau Cat ET0016) και μεταφορά όλης της ποσότητας σε μικροκλώνες RNeasy. Για περαιτέρω καθαρισμό του δείγματος από επιμόλυνση γονιδιωματικού DNA, χρησιμοποιήθηκε το RNase-free DNase Set της Qiagen (Cat 79254). Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις καθαρισμού με τη χρήση των διαλυμάτων του πακέτου RNeasy, RW1 και RPE, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο της Qiagen. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ακολούθησε ποσοτικοποίηση κάθε δείγματος με φωτομέτρηση, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και προσαρμογή της συγκέντρωσης στα 100ng/μl (Εικόνα 22). Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -80°C.

4.3.2 Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση RNA

Η φωτομέτρηση έγινε σε φωτόμετρο (BioPhotometer, Eppendorf) με RNase-DNase free κυψελίδες (Eppendorf, UVette) και αραιώση δείγματος 1:20. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε 1,5% αγαρόζη (Agarose, Invitrogen Cat 15510-027) με 5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Biorad Cat 15585-011). Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία γονιδιωματικού DNA και η ποσοτικοποίηση επαληθεύθηκε με τη χρήση πρότυπου RNA (control template RNA Ambion, 500ng/μl) (Εικόνα 23). Έγιναν 4 διαδοχικές αραιώσεις του RNA γνωστής ποσότητας και διαδοχικές αραιώσεις του αγνώστου δείγματος. Με βάση την ένταση των ζωνών του 18sRNA υπολογίστηκε η συγκέντρωση ως εξής: τα 0,6μl δείγματος αντιστοιχούσαν σε 312.5ng RNA, άρα η συγκέντρωση του δείγματος ήταν $312.5/0,6=520\text{ng}/\mu\text{l}$. Στο συγκεκριμένο δείγμα η φωτομέτρηση έδειξε 545.8ng/μl

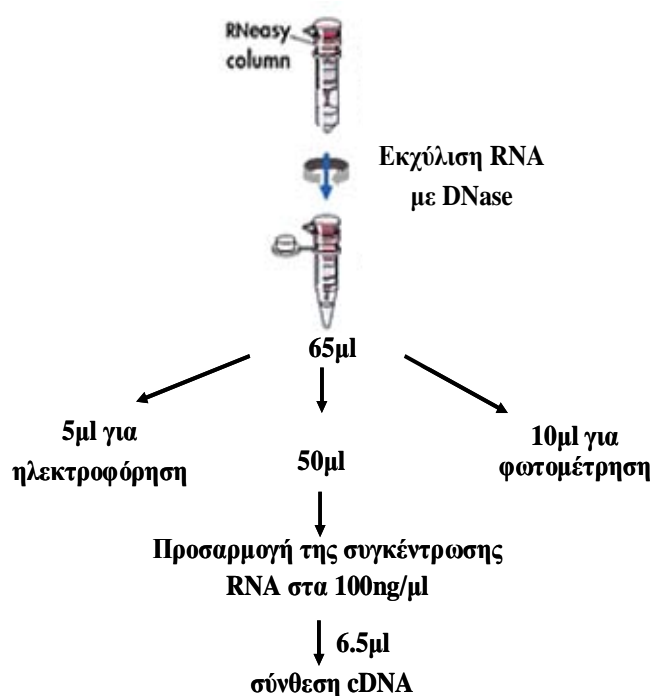
4.3.3 Σύνθεση μορίων cDNA

Προκειμένου να μετατραπούν τα μόρια mRNA σε συμπληρωματικά μόρια DNA (*complementary DNA, cDNA*), απαιτείται η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Qiagen (Omniscrypt RT kit , Cat 205111) που περιλάμβανε: 10xRT buffer, διάλυμα dNTPs, Omniscrypt RT και H₂O ελεύθερο DNAσών και RNAσών. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή (Random Primers p[dN]₆, Roche, Cat 11034731001) και αναστολέας των RNAσών (RNAsin 2,500U, 40U/μl, Promega Cat N2111). Ο όγκος του κάθε αντιδραστήριου ανά δείγμα φαίνεται στον Πίνακα 9.

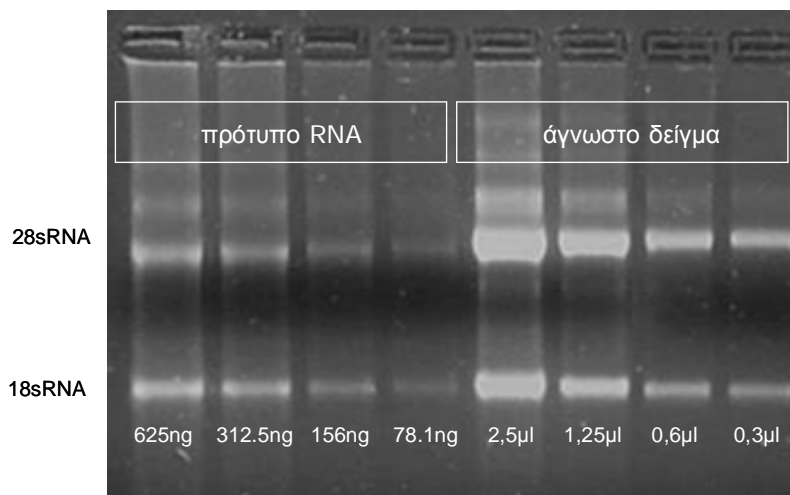
Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 650ng RNA. Προκειμένου να λάβει χώρα η αντίδραση, χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια PCR στα οποία προστέθηκαν αρχικά 3.5 μl νερό με 4 μl τυχαία εξαμερή και 6.5 μl RNA. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στους 72°C για 2 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν 11 μl μείγματος αντιδραστηρίων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 42°C για 90 λεπτά και στη συνέχεια για 10 λεπτά στους 65°C, ώστε να επέλθει αδρανοποίηση των ενζύμων. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως σε πάγο και προστέθηκαν 80 μl H₂O ελεύθερου DNAσών και RNAσών (UltraPure Water, Gibco Cat 10977-035). Τα δείγματα cDNA αποθηκεύθηκαν στους -20°C.

Πίνακας 9: Ποσότητες αντιδραστηρίων για σύνθεση cDNA

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μl) hexamers
10xRT buffer	2.5
dNTP mix (500μM)	2.5
Stock oligodT ₁₅ (10μM)	-
RNAsin (10 Units)	0.31
Omniscript RT (4 Units)	1.25
RNase-free H ₂ O	4.44
Όγκος MasterMix	11
Random hexamers	4
RNase-free H ₂ O	3.5
δείγμα RNA	6.5
Συνολικός όγκος	25



Εικόνα 22: Πορεία της επεξεργασίας των δειγμάτων. Την εκχύλιση RNA ακολούθησε ποσοτικοποίηση του δείγματος και προσαρμογή της συγκέντρωσης στα 100ng/μl. Από αυτό, 650ng χρησιμοποιήθηκαν για σύνθεση cDNA



Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτική αгарόζης. Επεξήγηση στο κείμενο

4.3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της Qiagen Taq Mastermix (Cat 211445), που περιέχει το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, PCR buffer, dNTPs και H₂O ελεύθερο DNAσών και RNAσών. Οι αντιδράσεις έγιναν σε σωληνάρια της Corning (0.2ml thin-wall PCR tubes, Corning Cat 6571) και σε θερμοκυκλοποιητές MJ Research PTC-200.

Ως γονίδιο αναφοράς για την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης, το οποίο εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα σε συγκρίσιμα επίπεδα. Στον Πίνακα 10 αναγράφονται οι συνθήκες καθώς και οι εκκινητές (συντέθηκαν από τη Thermo) που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

Πίνακας 10: Εκκινητές και συνθήκες των αντιδράσεων της συμβατικής PCR.
α. f: πρόσθιος εκκινητής, r: αντίστροφος εκκινητής

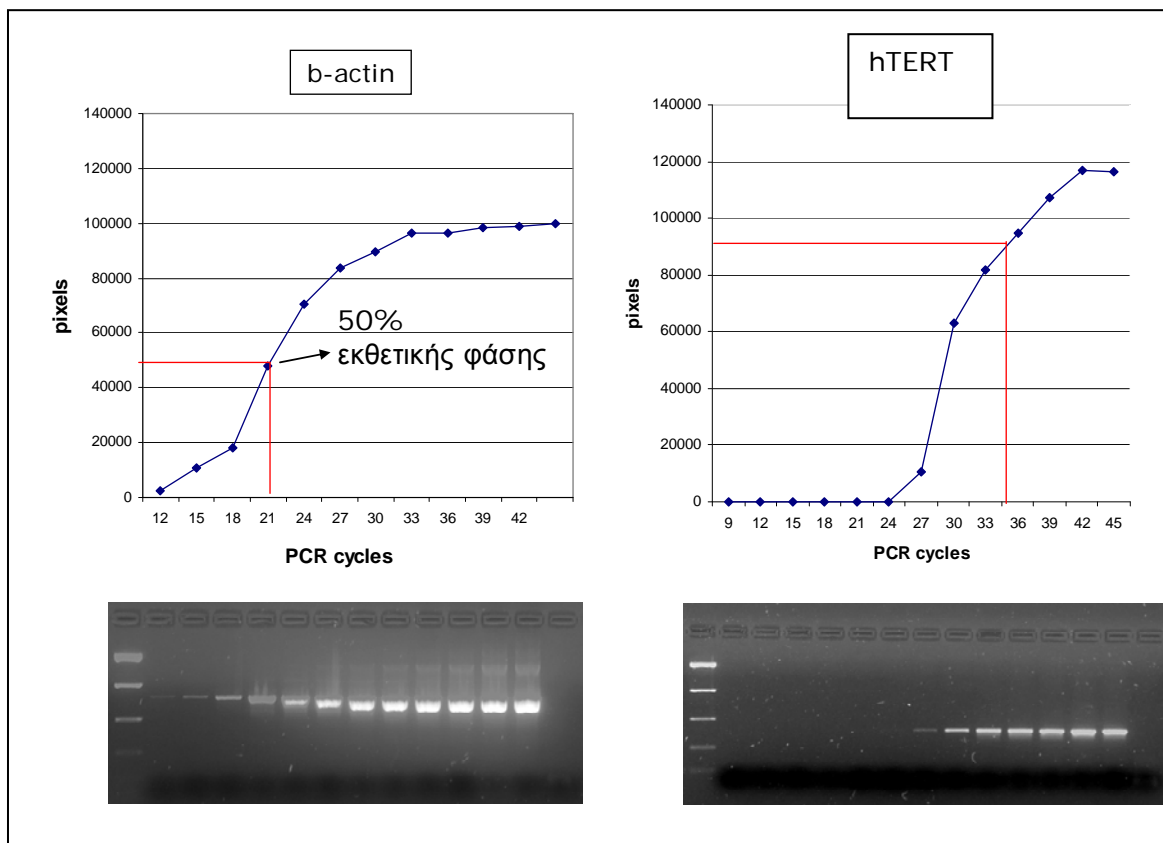
Γονίδια	β-ακτίνη	hTERT
Εκκινητές από 5' προς 3'	f: GGCATCGTGATGGACTCCG ^a r: GCTGGAAGGTGGACAGCGA	f: AGAGTGTCTGGAGCAAGTTGC ^a r: CGTAGTCCATGTTCCACAATCG
Αρχική αποδιάταξη	94°C, 4'	94°C, 4'
Αποδιάταξη	94°C, 1'	95°C, 1'
Αναδιάταξη	68°C, 1'	60°C, 1'
Επιμήκυνση	72°C, 1'	72°C, 2'
Τελική επιμήκυνση	72°C, 15'	72°C, 15'
Κύκλοι	21	35
Μέγεθος προϊόντος (bp)	621	183

4.3.5 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

Προκειμένου να απεικονιστούν τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR, τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης με πυκνότητα 2% (Agarose, Invitrogen Cat 15510-027, 10xTBE BioRad, Cat 161-0770) που περιείχε 5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Biorad Cat 15585-011). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συσκευή Wide Mini Subcell GT system και PowerPac Basic power supply (BioRad, Cat 164-0301) και χρησιμοποιήθηκε χρωστική 5x Nuclei acid sample buffer (BioRad, Cat 161-0767) ή εναλλακτικά 10x Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen, Cat. 10816-015) και ποσοτικός μάρτυρας DNA (Invitrogen, Cat 12373-031).

4.3.6 Βελτιστοποίηση αντιδράσεων PCR

Για τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια των αντιδράσεων PCR και, συγκεκριμένα, για να επιβεβαιωθεί ότι ο αριθμός των κύκλων σε ένα γονίδιο ήταν συγκρίσιμος με τα υπόλοιπα, δημιουργήθηκε μέσω ημι-ποσοτικής PCR μία καμπύλη κύκλων-αριθμού εικονοστοιχείων. Ο αριθμός των εικονοστοιχείων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία αδρή εκτίμηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της PCR. Οι κύκλοι ξεκινούσαν από τους 9 και κατέληγαν στους 45. Υπολογίζοντας το μέσο μεταξύ του πρώτου κύκλου που ανιχνεύεται προϊόν PCR και του κύκλου που αρχίζει η φάση κορεσμού της αντίδρασης, ορίστηκε η τιμή που αντιστοιχεί στους κύκλους με τη μέση συγκέντρωση προϊόντος PCR, με βάση τον τύπο: $(\alpha + \beta) / 2$, όπου α = ο αριθμός κύκλων που για πρώτη φορά ανιχνεύτηκε προϊόν PCR και β = ο αριθμός κύκλων όπου αρχίζει η φάση κορεσμού της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που προέκυψε από την ημιποσοτική PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προϊόντων σε όλα τα δείγματα. Τελικά, με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατή η σύγκριση της έντασης των προϊόντων PCR από διαφορετικές αντιδράσεις, όπως αυτή απεικονίστηκε στις πηκτές αγαρόζης. Στα ακόλουθα γραφήματα παρατίθενται τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας για τις αντιδράσεις PCR: β -ακτίνης και hTERT (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Semi quantitative PCR για τα γονίδια της β-ακτίνης και hTERT. Ο αριθμός των κύκλων που αντιστοιχεί στο 50% της συγκέντρωσης προϊόντος βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης αύξησης του προϊόντος. Για τη β-actin υπολογίστηκε στους 21 κύκλους ενώ για την hTERT στους 35 κύκλους.

4.3.7 Ημιποσοτική PCR (Semi-quantitative PCR)

Για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR, έτσι όπως αυτά απεικονίζονταν στις πηκτές αгарόζης, μετρήθηκε η ένταση της κάθε ζώνης με τη χρήση του προγράμματος UniDocMw 10.01 της Unitech, το οποίο δίνει τον αριθμό των εικονοστοιχείων κάθε ζώνης.

Για τη μελέτη της έκφρασης της hTERT στα δείγματα διαφορετικής ποσότητας RNA δημιουργήθηκε ο λόγος R, όπου:

$$R_1 = \frac{\text{εικονοστοιχεία αντιγόνου}}{\text{εικονοστοιχεία β-ακτίνης}}$$

Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι οι υπολογισμοί βασίστηκαν σε φωτογραφίες των πηκτών αгарόζης και μέτρηση της φωτεινότητας των ζωνών των προϊόντων PCR, προκειμένου να εξλειφθεί το σφάλμα της διαφοράς φωτεινότητας και αντίθεσης μεταξύ των διαφορετικών φωτογραφιών, συνυπολογίστηκε ένας λόγος που να αντιπροσωπεύει τις πηκτές και τις διαφορές τους (κατασκευαστικές ή φωτογραφικές). Ως σταθερά στη συγκεκριμένη περίπτωση ελήφθη μία ζώνη του μάρτυρα (Ladder) και έγινε σύγκρισή της μεταξύ των διαφορετικών πηκτών αгарόζης. Δηλαδή:

R₂=εικονοστοιχεία μάρτυρα αντιγόνου/εικονοστοιχεία μάρτυρα β-ακτίνης

Και τελικά ο τύπος που έδωσε τη σύγκριση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της β-ακτίνης ήταν ο εξής:

$$R = R_1 / R_2$$

Τα δεδομένα καταχωρήθηκαν και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Excel της Microsoft.

4.3.8 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR)

Για την qRT PCR χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της Invitrogen Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG (Cat 11733-038). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε σωληνάρια 0.1ml (Corbett Research, Cat 3001-002) και σε κυκλοποιητή Rotor Gene RG-6000 (Corbett Research).

Για το γονίδιο της IDO χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές:

5' ggTCATggAgATgTCCgTAA 3' (Thermo, D# OR220638-1) (20μM)

5' ACCAATAgAgAgACCAggAAgAA 3' (Thermo, ID# OR220639-2) (20μM)

Οι συνθήκες της PCR ήταν 50°C για 2', 95°C για 2', και 45 κύκλοι που περιλαμβάνουν αποδιάταξη στους 95°C για 15'', αναδιάταξη στους 60°C για 30'' και επιμήκυνση στους 72 °C για 30''. Για το γονίδιο του ABL χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της Ipsogen Fusion Quant Kit BCR-ABL (Cat FQpp-10-CE). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50°C για 2', 95°C για 2', και 45 κύκλοι με 95°C για 15'' και 60°C για 1', με τη μέτρηση του φθορισμού να γίνεται στους 60°C.

Διπλά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων για κάθε δείγμα. Η qRT-PCR, αποδίδει επακριβώς τον αριθμό των αντιγράφων σε κάθε δείγμα, εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ευρύ φάσμα ποσοτικοποίησης. Είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης, ιδιαίτερα για χαμηλό αριθμό μεταγράφων, για περιορισμένη ποσότητα δείγματος και για τη διασαφήνιση μικρών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης mRNA [281].

4.4 Σχετική μεταγραφική έκφραση

Η μεταγραφική έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε με ημιποσοτική PCR και της IDO με qRT-PCR. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν περαιτέρω συγκρίσεις των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων της hTERT και της IDO, που προέκυψαν από τις δύο διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν,

προσδιορίστηκε η σχετική έκφρασή τους ως προς έναν κοινό ιστό αναφοράς που ήταν το αμάρτωμα.

4.5 Στατιστική ανάλυση

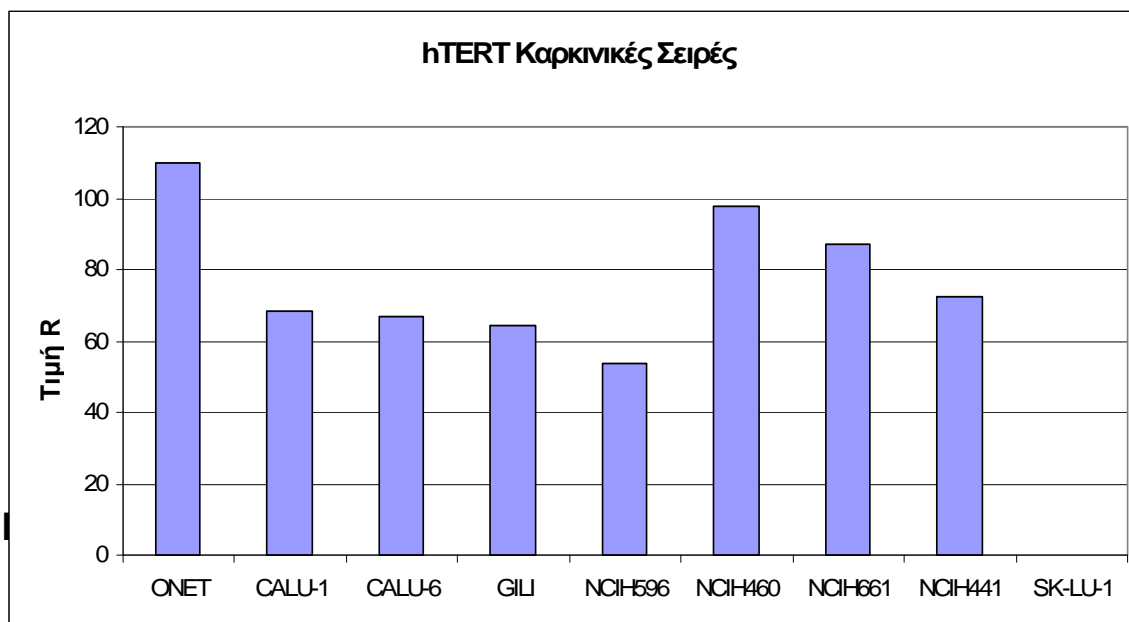
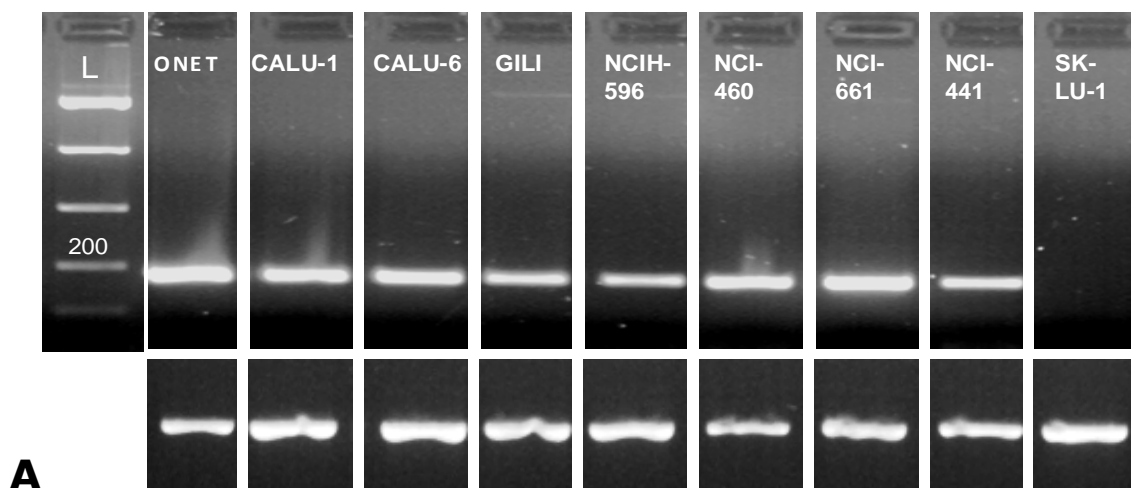
Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος GraphPad-Prism (έκδοση 5.0). Ελέγχθηκε η κατανομή των μετρήσεων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές \pm σταθερή απόκλιση (mean \pm SD), εκτός εάν έχουν χρησιμοποιηθεί άλλες μεταβλητές οι οποίες και αναφέρονται. Για τη σύγκριση τιμών της ίδιας ποσοτικής παραμέτρου σε δύο ανεξάρτητες ομάδες, χρησιμοποιήθηκε η μη κατά ζεύγη ανάλυση (Unpaired t-test) στην περίπτωση κανονικής κατανομής, ενώ στην περίπτωση μη κανονικής κατανομής εφαρμόστηκε η διαδικασία Mann-Whitney U test. Η σύγκριση των μέσων όρων περισσότερων των δύο ομάδων στηρίχθηκε σε ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA). Ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών εκτιμήθηκε με βάση τον συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (κανονική κατανομή τιμών) ή κατά Spearman (μη κανονική κατανομή τιμών). Ορίστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και η σύγκρισή τους έγινε με Logrank test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του $p < 0.05$.

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Έκφραση της hTERT

5.1.1 Έκφραση σε καρκινικές σειρές

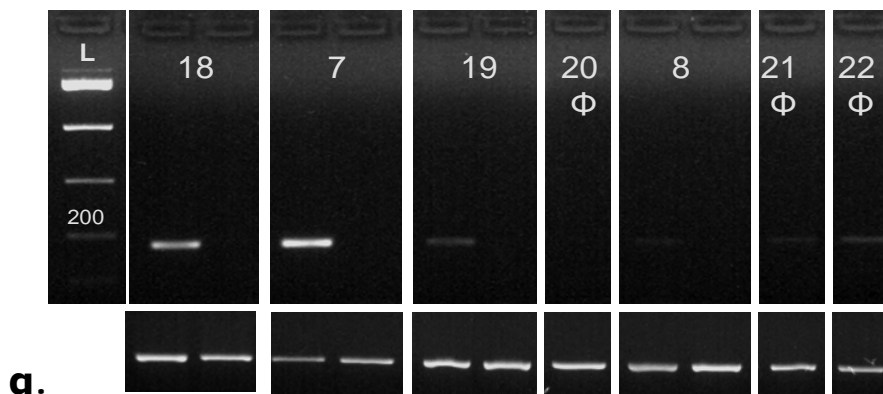
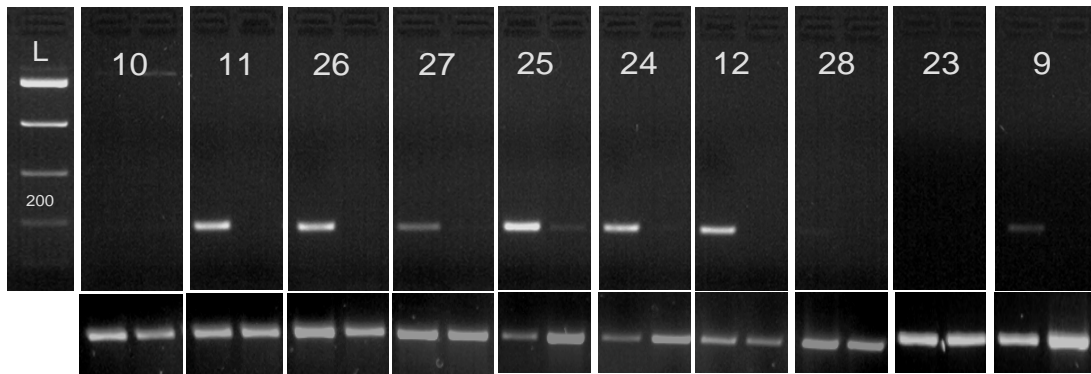
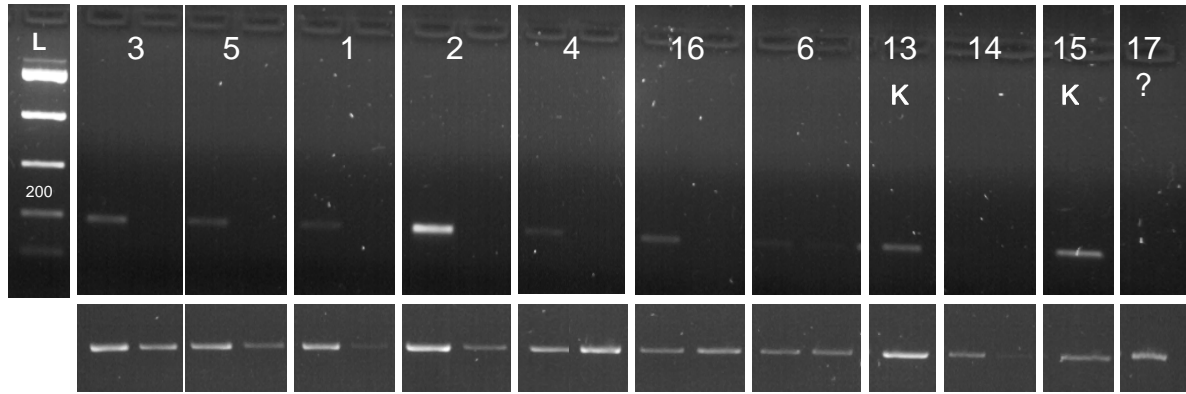
Η μεταγραφική έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε με ημιποσοτική PCR σε 8 από τις 9 καρκινικές σειρές που εξετάστηκαν (Εικόνα 25). Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης της hTERT ήταν 68.96 ± 31.33 .

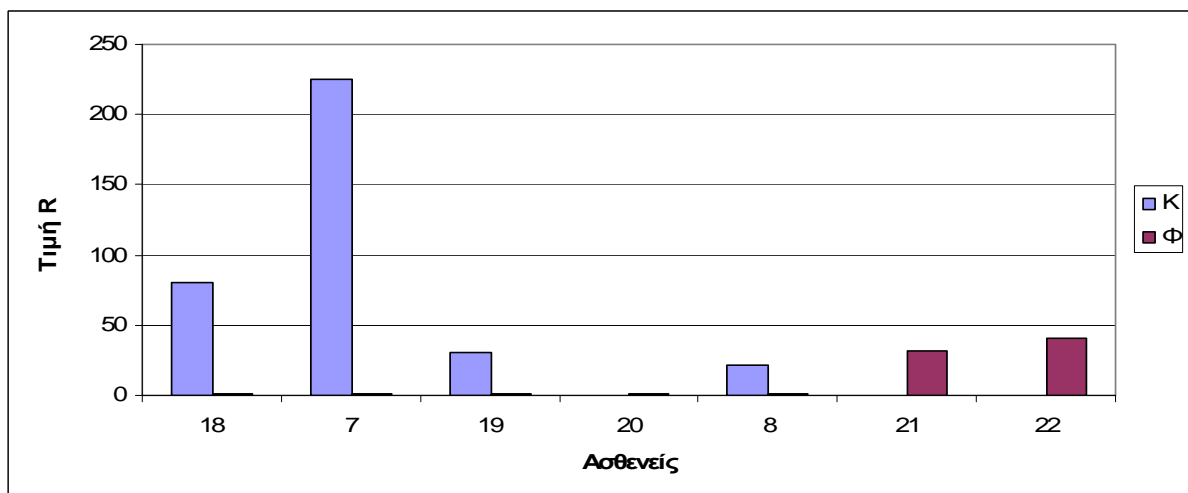
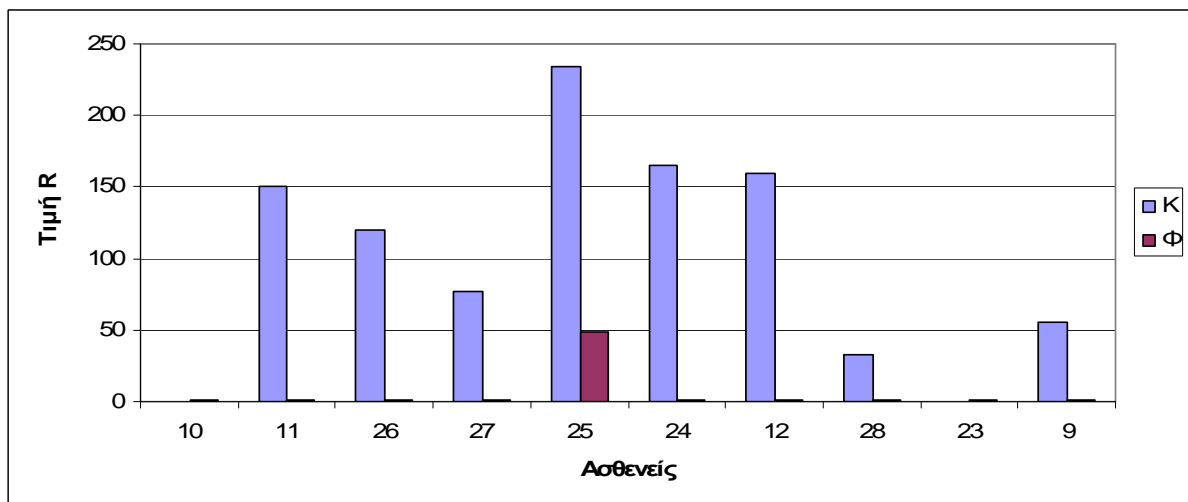
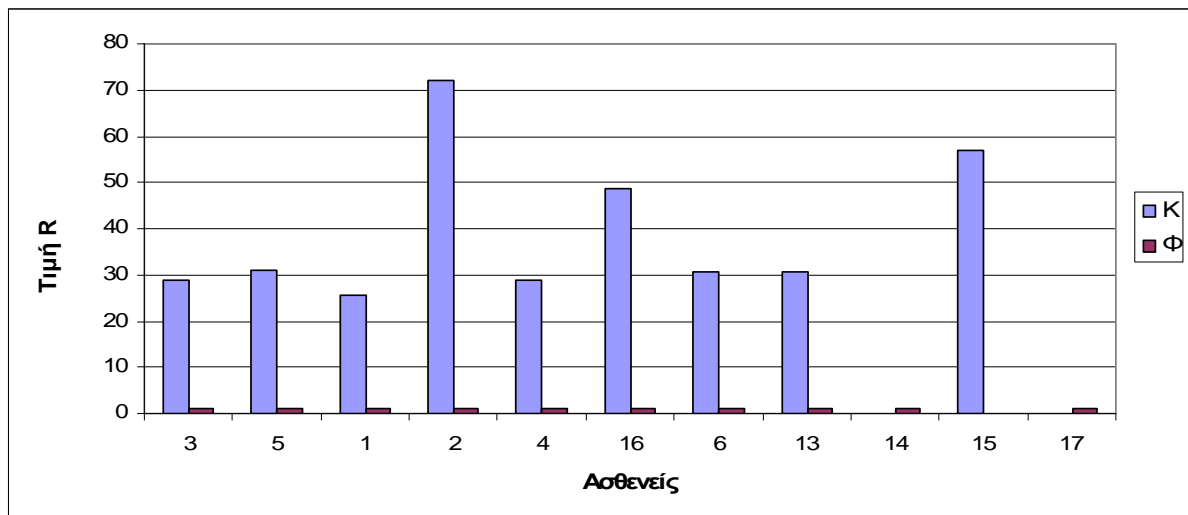


Εικόνα 25: Έκφραση της hTERT σε καρκινικές σειρές. **A.** Απεικόνιση σε ηλεκτροφόρηση. Έκφραση hTERT (πάνω) και b-actin mRNA (κάτω). **B.** Γράφημα της τιμής R αντίστοιχα.

5.1.2 Έκφραση στα δείγματα των ασθενών

Το mRNA της hTERT μετρήθηκε στα διαθέσιμα δείγματα καρκινικού και παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού με ημιποσοτική PCR (Εικόνα 26α,β)





β.

Εικόνα 26: α. Απεικόνιση σε πηκτή αгарόζης των δειγμάτων ασθενών. Για κάθε ασθενή (τετράγωνο) ελέγχθηκε η έκφραση του mRNA για την hTERT (πάνω) και τη β-ακτίνη (κάτω). Αριστερά απεικονίζεται η έκφραση στον καρκινικό ιστό (Κ) και δεξιά η έκφραση στο παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό (Φ) για κάθε ασθενή. Εκτός από τον ασθενή 15 όπου υπήρχε μόνο Κ και στις περιπτώσεις 17, 20, 21, 22 όπου υπήρχε διαθέσιμο μόνο Φ. **β.** Γραφήματα της τιμής R των ασθενών αντίστοιχα.

Έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε σε 21 από τα 24 δείγματα του καρκινικού ιστού (87%) και στα 3 από τα 27 δείγματα παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού (11%) (Πίνακας 11). Η μεταγραφική της έκφραση στον καρκινικό ιστό ήταν 71.00 ± 68.50 και στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό ήταν 1.00 (1.00-48.10).

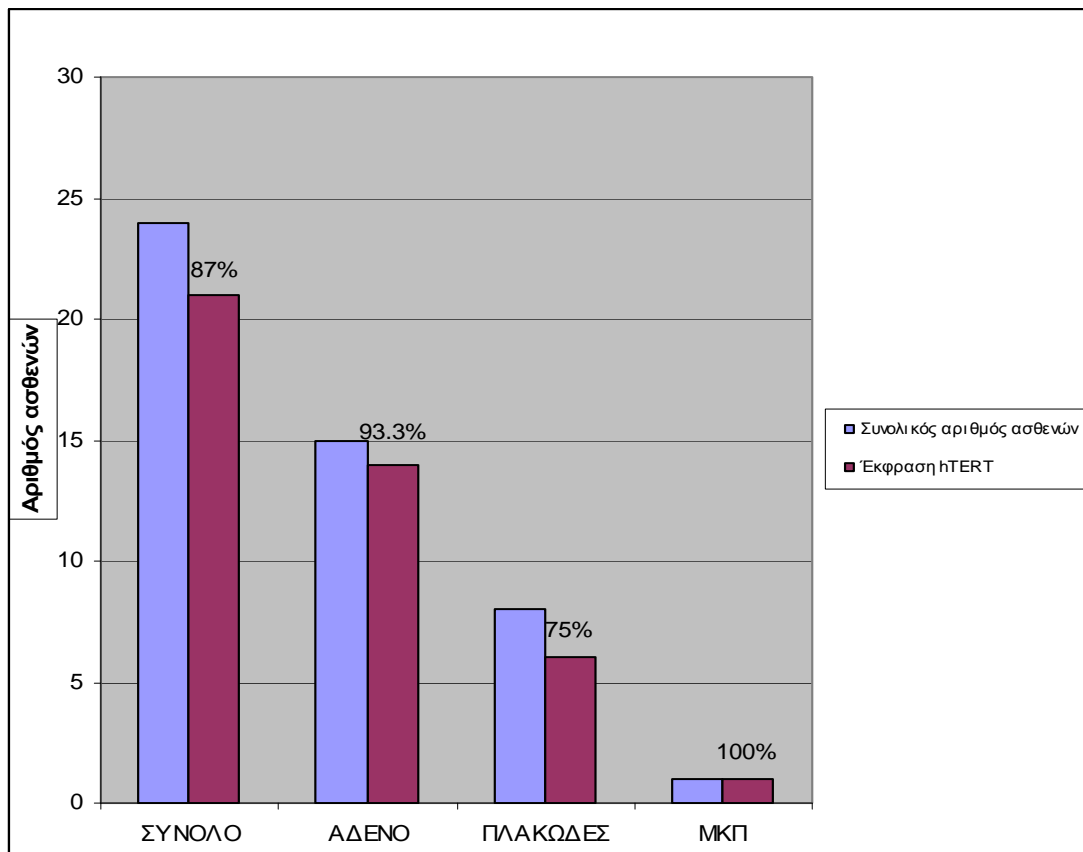
Πίνακας 11: Αποτελέσματα της Ημιποσοτικής PCR για το mRNA της hTERT σε όλους τους ασθενείς στον καρκινικό ιστό (Κ) και στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό (Φ).

* Μη διαθέσιμο δείγμα.

Ασθενείς	Έκφραση hTERT Κ	Έκφραση hTERT Φ	Ασθενείς	Έκφραση hTERT Κ	Έκφραση hTERT Φ
1	25,6	1,0	15	56,9	-
2	72,0	1,0	16	48,7	1,0
3	28,8	1,0	17	-*	1,0
4	28,9	1,0	18	80,3	1,0
5	31,0	1,0	19	30,6	1,0
6	30,5	1,0	20	-	1,0
7	225,3	1,0	21	-	31,7
8	21,6	1,0	22	-	41,2
9	54,9	1,0	23	0,0	1,0
10	0,0	1,0	24	165,3	1,0
11	150,3	1,0	25	233,9	48,1
12	159,1	1,0	26	120,0	1,0
13	30,8	1,0	27	76,9	1,0
14	0,0	1,0	28	32,5	1,0

Όσον αφορά την έκφρασή της στους διάφορους ιστολογικούς τύπους, στα αδenoκαρκινώματα ανιχνεύτηκε στα 14 από τα 15 δείγματα (93,3%), στα πλακώδη στα 6 από τα 8 (75%) καθώς και στο 1 δείγμα ΜΚΠ, με μέση τιμή 70.49 ± 64.57 , 51.58 ± 53.43 και 233.9 αντίστοιχα (Εικόνα 27). Στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό η έκφραση της hTERT δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα 15 δείγματα ασθενών με αδenoκαρκίνωμα, ανιχνεύτηκε όμως στα 2 από τα 8 δείγματα (25%) ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα καθώς και στην περίπτωση του ΜΚΜ.

Έγινε συσχέτιση της έκφρασης της hTERT με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η καπνιστική συνήθεια, το pT, το pN, το pstage (σύμφωνα με την σταδιοποίηση TNM), ο όγκος του νεοπλάσματος (tumor volume), ο βαθμός διαφοροποίησης και ο ιστολογικός τύπος. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 12. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης της hTERT σε σχέση με το pT, το pStage και τον όγκο του νεοπλάσματος (Εικόνα 28). Οι ασθενείς με πιο εκτεταμένο όγκο T3-T4 είχαν μεγαλύτερη έκφραση της



Εικόνα 27: Ανίχνευση της έκφρασης της hTERT σε όλους τους ασθενείς και σε κάθε ιστολογικό τύπο.

hTERT σε σύγκριση με αυτούς με T1-T2, (121.30 ± 82.40 vs 50.26 ± 51.33 $p=0.017$). Επίσης μεγαλύτερη έκφραση της hTERT παρουσίασαν οι ασθενείς σε πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου (III-IV) έναντι αυτών σε αρχικό στάδιο (I-II), (108.00 ± 85.62 vs 48.79 ± 45.95 , $p=0.037$), και με μεγαλύτερο όγκο νεοπλασματος -με κατώφλι τα 50cm^3 - (112.50 ± 73.96 vs 29.49 ± 24.12 , $p=0.001$). Η έκφραση της hTERT εμφάνισε μια τάση συσχέτισης και με τη διήθηση των λεμφαδένων (pN), δεν ήταν όμως στατιστικά σημαντική ($p=0.063$).

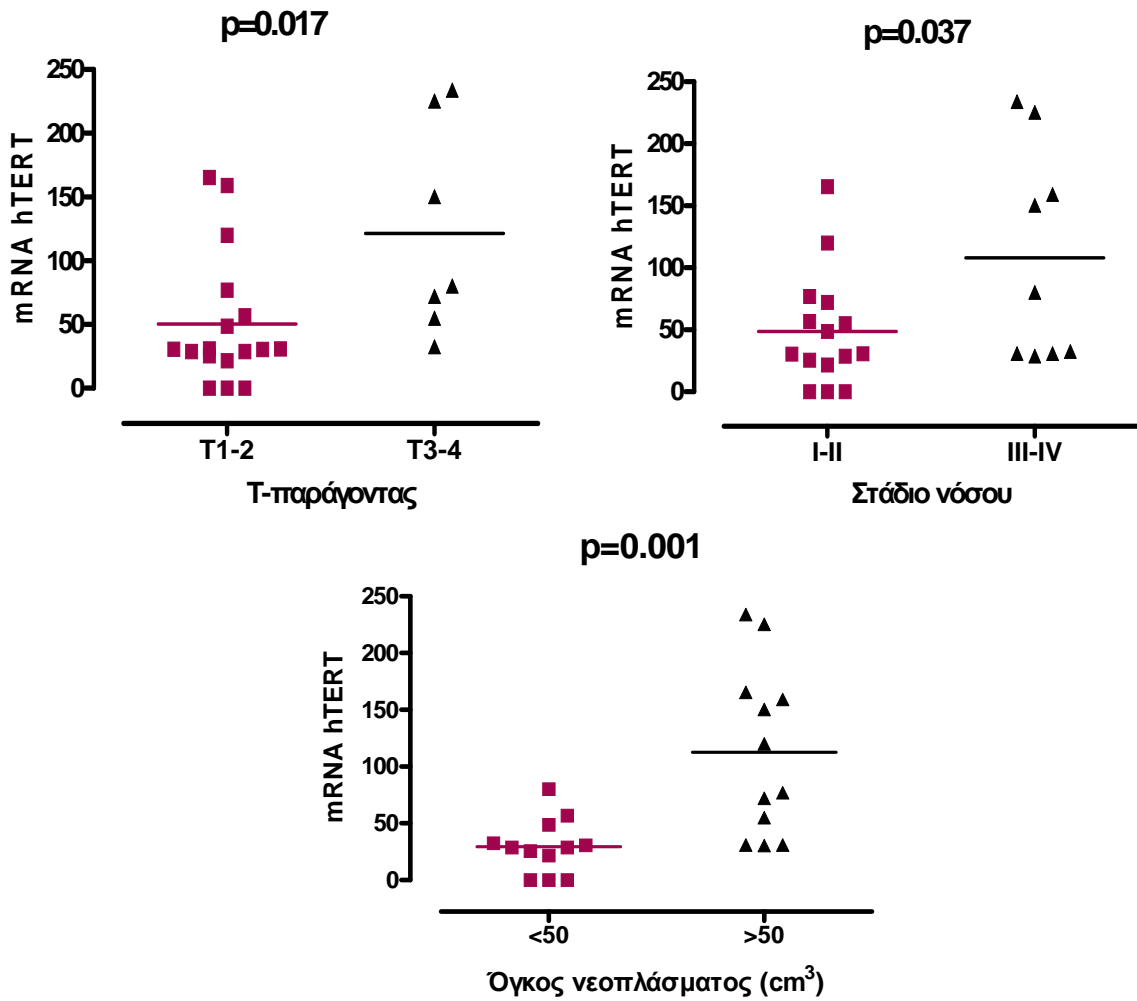
Σε 23 ασθενείς που υπήρχαν δείγματα τόσο καρκινικού όσο και αυτόλογου παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού, η έκφραση του mRNA της hTERT στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό, βρέθηκε σημαντικά μικρότερη από αυτή στον αυτόλογο καρκινικό ιστό ($p<0.001$), αλλά και σε σύγκριση με την έκφρασή της στις καρκινικές σειρές ($p<0.001$). Δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασής της μεταξύ καρκινικού ιστού και καρκινικών σειρών (71.61 ± 69.97 vs 68.96 ± 31.33 , $p>0.05$) (Εικόνα 29).

Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν κατά μέσο όρο 20 μήνες (από 4 έως 36 μήνες). Η διάμεση επιβίωση δεν μπορεί να εκτιμηθεί λόγω του ότι άνω του 50% των ασθενών βρίσκονταν εν ζωή κατά την ολοκλήρωση της μελέτης. Η μονοετής επιβίωση ήταν

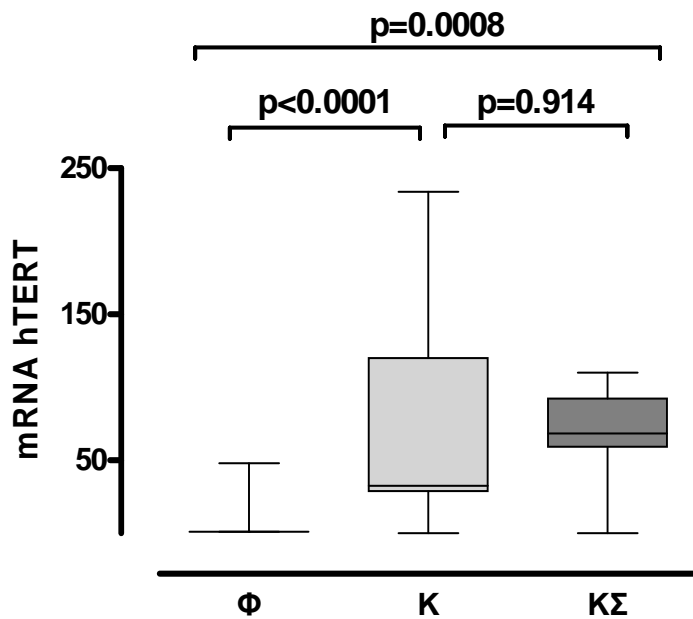
90%, και η 3ετής 75%. Δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης της hTERT με την επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) ή τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

Πίνακας 12: Συσχέτιση της έκφρασης της hTERT με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

hTERT				
		n	mean ± SD	p-value
ΗΛΙΚΙΑ	<70	16	67.05 ± 72.92	0.699
	≥70	8	78.87 ± 62.57	
ΦΥΛΟ	♂	19	70.16 ± 71.17	0.910
	♀	5	74.16 ± 64.57	
ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΜΗ-ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	4	34.08 ± 14.45	0.406
	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	7	63.69 ± 75.32	
	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	13	86.29 ± 73.24	
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΑΔΕΝΟ	15	70.49 ± 64.57	0.487
	ΠΛΑΚΩΔΕΣ	8	51.58 ± 53.43	
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	G1-G2	11	79.90 ± 67.01	0.569
	G3	13	63.46 ± 71.53	
T	T1-T2	17	50.26 ± 51.33	0.017
	T3-T4	7	121.30 ± 82.40	
N	N0	13	47.25 ± 48.29	0.063
	N1-N2	11	99.06 ± 79.96	
M	M0	22	74.57 ± 70.55	
	M1	2	31.65 ± 1.20	
ΣΤΑΔΙΟ	I-II	15	48.79 ± 45.95	0.037
	III-IV	9	108.00 ± 85.62	
ΟΓΚΟΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	<50 cm ³	12	29.49 ± 24.12	0.001
	≥50 cm ³	12	112.50 ± 73.96	



Εικόνα 28: Έκφρασης της hTERT σε σχέση με το T, το στάδιο και τον όγκο του νεοπλάσματος.

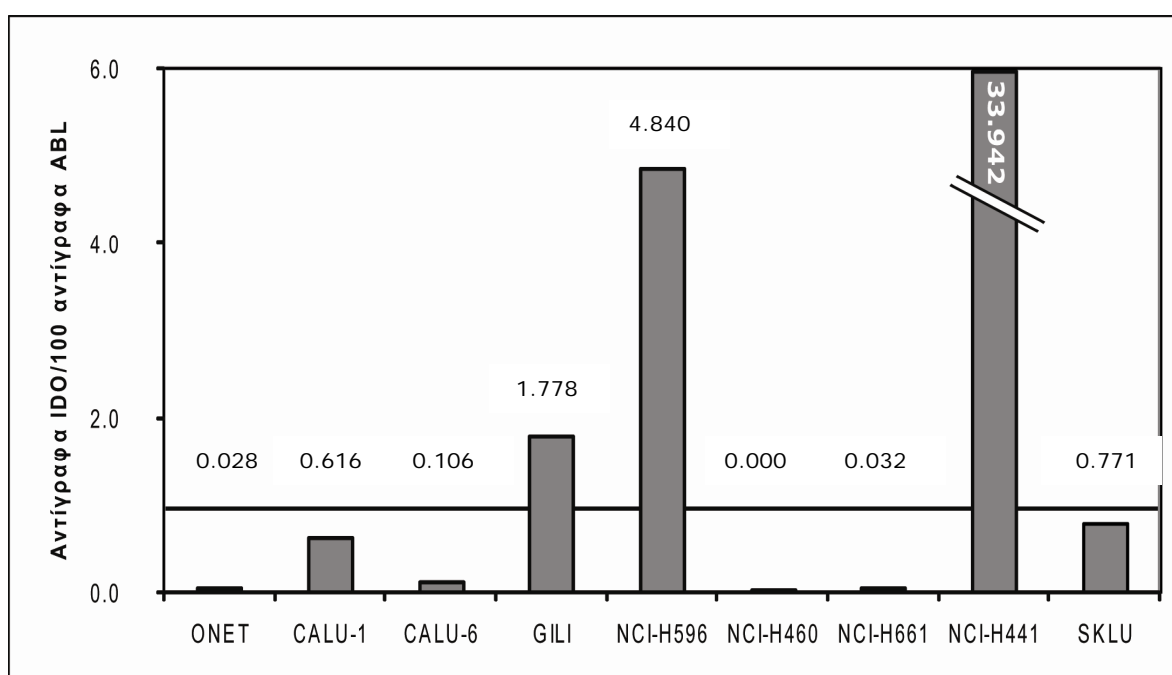


Εικόνα 29: Έκφραση του mRNA της hTERT στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό (Φ), στον καρκινικό ιστό (Κ) και στις καρκινικές σειρές (ΚΣ).

5.2 Έκφραση της IDO

5.2.1 Έκφραση σε καρκινικές σειρές

Οι καρκινικές σειρές εξετάστηκαν με qRT-PCR και έκφραση της IDO ανιχνεύτηκε στις 3 από τις 9 σειρές που μελετήθηκαν. Ισχυρότερη έκφραση εμφάνιζε η σειρά NCI-H441 και μικρότερες οι σειρές NCI-H596 και GILI. Στις υπόλοιπες 6 καρκινικές σειρές τα επίπεδα της έκφρασης της IDO ήταν <1 και θεωρήθηκαν αρνητικές (Εικόνα 30). Η έκφραση της IDO στις καρκινικές σειρές ήταν 4.68 ± 11.08 (0.00-33.94).



Εικόνα 30: Έκφραση του mRNA της IDO στις καρκινικές σειρές.

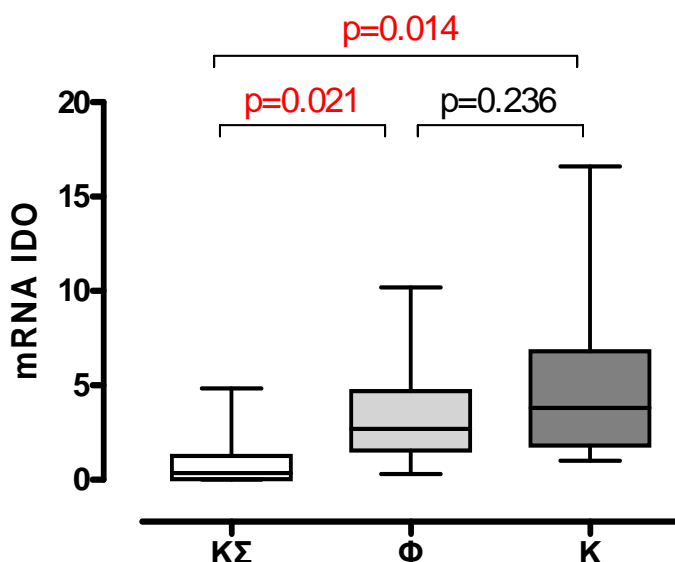
5.2.2 Έκφραση στα δείγματα των ασθενών

Η έκφραση του mRNA της IDO ανιχνεύτηκε με qRT-PCR σε όλα τα διαθέσιμα δείγματα των ασθενών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναγράφονται στον Πίνακα 13. Η μεταγραφική έκφραση της IDO ανιχνεύτηκε σε 21 από τα 24 δείγματα καρκινικού ιστού (87.5%) και σε 21 από τα 25 δείγματα παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού (84%), με μέση τιμή 8.46 ± 15.18 (1.0-70.00) και 3.28 ± 2.51 (0.30-10.20) αντίστοιχα. Η σχετική έκφραση της IDO στις καρκινικές σειρές βρέθηκε μικρότερη τόσο από αυτή στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό ($p=0.021$) όσο και από αυτή στον καρκινικό ιστό ($p=0.014$) (Εικόνα 31).

Πίνακας 13: Έκφραση της IDO με qRT- PCR σε καρκινικό (Κ) και παρακείμενο μη προσβεβλημένο (Φ) ιστό ασθενών και ο λόγος της έκφρασής τους (Κ/Φ).

*Τα νούμερα εκφράζουν αντίγραφα IDO/100 αντίγραφα ABL, *Μη διαθέσιμο δείγμα.

Ασθενείς	Έκφραση IDO* Κ	Έκφραση IDO* Φ	Κ/Φ
1	16.6	10.2	1,6
2	6.5	4.4	1,5
3	2.6	7.5	0,3
4	3.8	2.3	1,6
5	3.3	1.7	1,9
6	1.0	3.0	0,3
7	8.5	2.1	3,9
8	6.8	4.1	1,6
9	37.5	2.7	14,1
10	3.9	3.8	1,0
11	4.7	1.2	3,8
12	7.1	0.9	7,5
13	6.6	4.5	1,5
14	1.8	0.3	6,4
15	1.0	-*	-
16	1.0	1.4	0,7
17	-	8.8	-
18	9.0	4.9	1,8
19	2.9	2.2	1,3
20	-	5.2	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	1.9	0.6	3,2
24	1.6	2.0	0,8
25	1.1	2.2	0,5
26	70.0	2.4	29,1
27	2.4	0.8	3,1
28	1.5	2.7	0,5

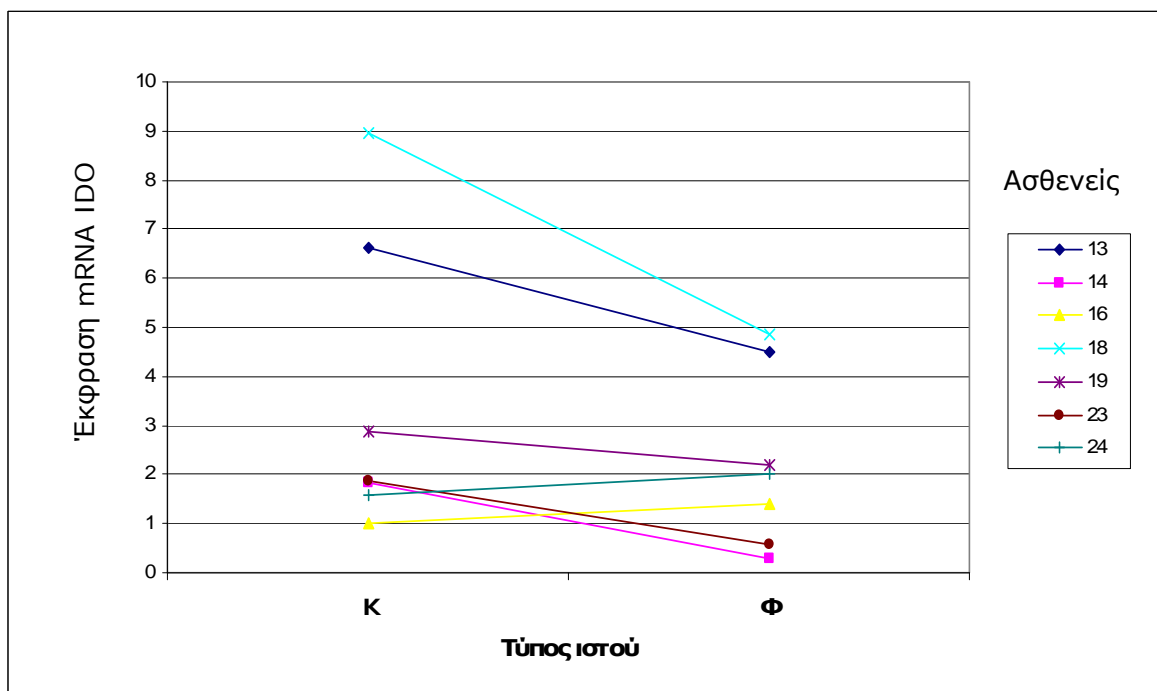
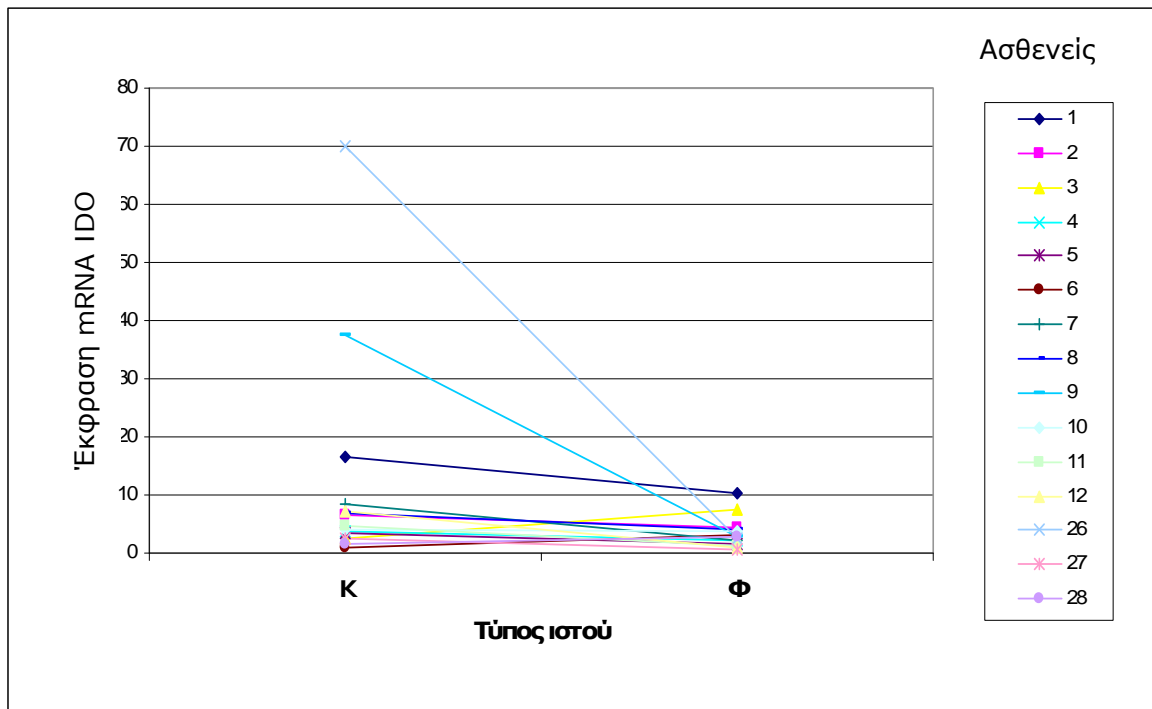


Εικόνα 31: Έκφραση του mRNA της IDO στις καρκινικές σειρές (ΚΣ), στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό (Φ) και στον καρκινικό ιστό (Κ).

Η σχετική έκφραση της IDO στον καρκινικό ιστό στα αδενοκαρκινώματα ήταν 11.75 ± 18.52 , ενώ στα πλακώδη 3.22 ± 2.96 και στην περίπτωση του παρακείμενου μη προσβεβλημένου 3.32 ± 2.54 και 3.32 ± 2.75 αντίστοιχα (Πίνακας 14). Στην Εικόνα 32 παρουσιάζεται η σχετική έκφραση της IDO στον καρκινικό ιστό και στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό για κάθε ασθενή, ξεχωριστά, για τα αδενοκαρκινώματα και τα πλακώδη. Όσον αφορά το λόγο της σχετικής έκφρασης της IDO στο σύνολο των ασθενών, βρέθηκε διάμεση τιμή 1.60 (0.3-29.1) ενώ στο αδενοκαρκίνωμα και στο πλακώδες καρκίνωμα, 4.78 ± 7.61 (0.3-29.1) και 2.24 ± 2.01 (0.7-6.4) αντίστοιχα. Η σχετική έκφραση της IDO στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό δεν συσχετίστηκε τόσο με την απόστασή του από τον καρκινικό ιστό όσο και με την έκφρασή της σε αυτόν. Παρότι στις περισσότερες περιπτώσεις ο καρκινικός ιστός εξέφραζε υψηλότερες τιμές του mRNA της IDO σε σύγκριση με τον αυτόλογο παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, στο σύνολο των ασθενών. Ωστόσο, η σχετική έκφραση της IDO ήταν μεγαλύτερη στον καρκινικό ιστό έναντι του παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού στο αδενοκαρκίνωμα ($p=0.046$), κάτι που δεν ισχύει στην περίπτωση του πλακώδους ενώ δεν βρέθηκε

ΠΛΑΚΩΔΕΣ	3.22 ± 2.96	3.32 ± 2.75
IDO		
	mean \pm SD	
	Καρκινικός ιστός	Παρακείμενος μη προσβεβλημένος ιστός
Σύνολο ασθενών	8.46 ± 15.18	3.28 ± 2.51
ΑΔΕΝΟ	11.75 ± 18.52	3.32 ± 2.54

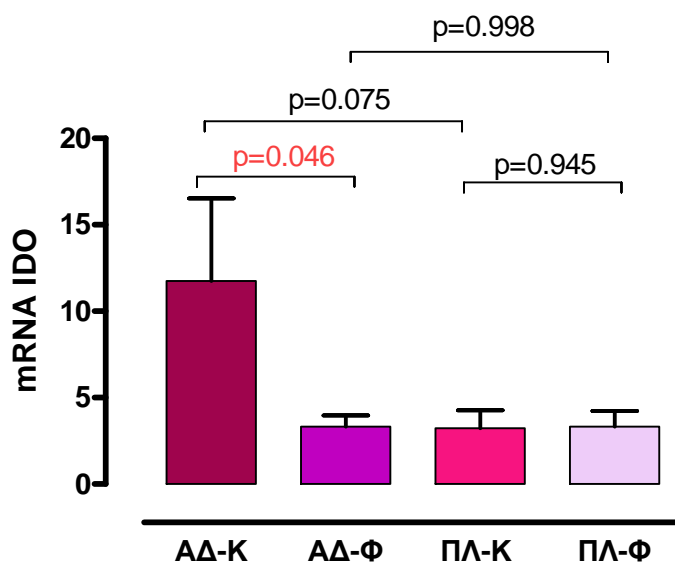
Πίνακας 14: Η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης της IDO



Εικόνα 32: Έκφραση του mRNA της IDO στον καρκινικό (Κ) και παρακείμενο μη προσβεβλημένο (Φ) ιστό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Επάνω: Ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα, Κάτω: Ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα.

στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ιστολογικών τύπων στον καρκινικό ιστό καθώς και στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό (Εικόνα 33).

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης της IDO σε σχέση με κάποια από τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους (ηλικία, φύλο, καπνιστική



Εικόνα 33: Έκφραση του mRNA της IDO στον καρκινικό ιστό (Κ) και στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό (Φ) στο αδενοκαρκίνωμα (ΑΔ) και στο πλακώδες καρκίνωμα (ΠΛ) πνεύμονα.

συνήθεια, pT, pN, pstage, όγκος του νεοπλασματος, βαθμός διαφοροποίησης και ιστολογικός τύπος) (Πίνακας 15).

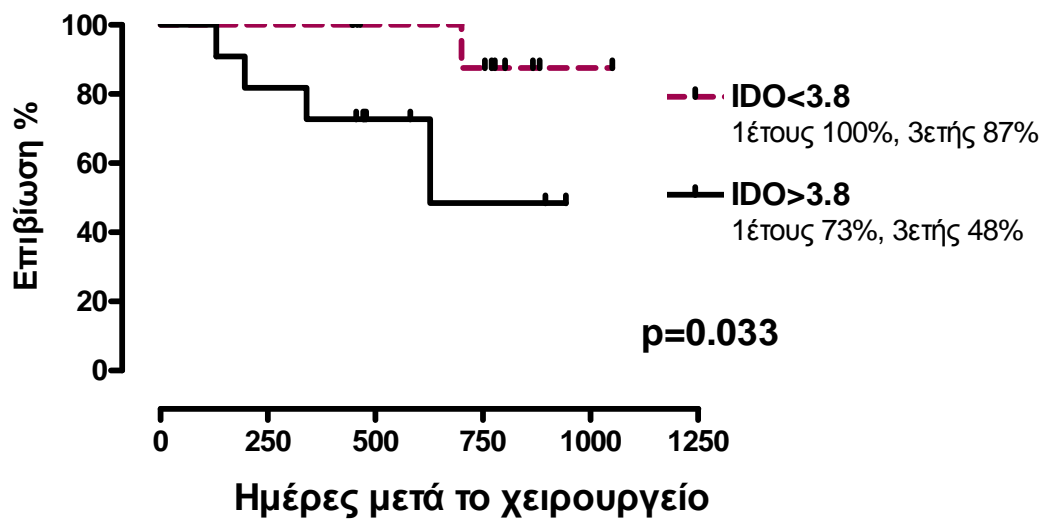
Δεν αναγνωρίστηκε συσχέτιση της έκφρασης της IDO με την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) τόσο στον καρκινικό όσο και στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό. Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της στον καρκινικό ιστό, με τη συνολική επιβίωση των ασθενών (logrank test, $p=0.033$) (Εικόνα 34). Αναδείχθηκε η αρνητική προγνωστική αξία της σχετικής έκφρασης της IDO καθώς οι ασθενείς με υψηλότερη έκφραση (>3.8) έζησαν λιγότερο. Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με υψηλότερη έκφραση ήταν 627 μέρες ενώ δεν μπορεί να εκτιμηθεί στην ομάδα με χαμηλή έκφραση, λόγω του ότι άνω του 50% των ασθενών βρίσκονταν εν ζωή κατά την ολοκλήρωση της μελέτης. Η μονοετής επιβίωση στην ομάδα των ασθενών με υψηλή σχετική έκφραση σε σύγκριση με την ομάδα με χαμηλή έκφραση ήταν 73% και 100% και η 3ετής επιβίωση 48% και 87% αντίστοιχα.

5.3 Συνέκφραση της *hTERT* και της *IDO*

Στα 18 από τα 24 δείγματα καρκινικού ιστού (75%), εκφράστηκε το mRNA και των δύο γονιδίων *hTERT* και *IDO*, χωρίς όμως να αναδειχθεί συσχέτιση μεταξύ τους. Σε 3 περιπτώσεις εκφράστηκε μόνο το mRNA της *hTERT* και σε άλλες 3, μόνο το mRNA της *IDO*. Δεν αναδείχθηκε συσχέτιση της σχετικής έκφρασης των δύο γονιδίων στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.

Πίνακας 15: Συσχέτιση της έκφρασης της IDO με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

IDO				
		n	mean ± SD	p-value
ΗΛΙΚΙΑ	<70	16	7.07 ± 9.06	0.538
	≥70	8	11.24 ± 23.83	
ΦΥΛΟ	♂	19	5.67 ± 8.17	0.078
	♀	5	19.06 ± 29.10	
ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	4	12.55 ± 16.73	0.590
	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	7	5.18 ± 5.64	
	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	13	8.96 ± 18.53	
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΑΔΕΝΟ	15	11.75 ± 18.52	0.075
	ΠΛΑΚΩΔΕΣ	8	3.22 ± 2.96	
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	G1-G2	11	9.90 ± 20.14	0.772
	G3	13	7.24 ± 10.00	
T	T1-T2	17	7.90 ± 16.45	0.309
	T3-T4	7	9.82 ± 12.59	
N	N0	13	10.77 ± 20.28	0.417
	N1-N2	11	5.73 ± 4.59	
M	M0	22	8.86 ± 15.80	
	M1	2	4.05 ± 3.60	
ΣΤΑΔΙΟ	I-II	15	10.58 ± 18.99	0.551
	III-IV	9	4.93 ± 2.98	
ΟΓΚΟΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	<50cm ³	12	4.40 ± 4.53	0.340
	≥50cm ³	12	12.53 ± 20.62	



Εικόνα 34: Η επιβίωση των ασθενών σε σχέση με την σχετική έκφραση της IDO στον καρκινικό ιστό.

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ογκογένεση αποτελεί μια διαδικασία η οποία οδηγεί στην έκφραση ή και υπερέκφραση διαφόρων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και TAs. Η παρουσία των TAs στον όγκο κινητοποιεί ανοσιακή απάντηση που περιλαμβάνει όλους τους ανοσοδραστικούς μηχανισμούς. Οι ανοσιακές απαντήσεις σε μερικές περιπτώσεις δεν είναι επαρκείς και ένας από τους λόγους είναι ότι ο καρκίνος αναπτύσσει μηχανισμούς διαφυγής. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταβληθεί πάρα πολλές προσπάθειες για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο το ανοσιακό σύστημα αναγνωρίζει και αντιδρά έναντι του όγκου. Η ανοσοθεραπεία προβάλλει τα τελευταία χρόνια ως εναλλακτική λύση σε μία προσπάθεια να αξιοποιήσει την ικανότητα και ειδικότητα του ανοσιακού συστήματος στη θεραπεία του καρκίνου. Εκμεταλλεύεται το γεγονός πως τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να ενεργοποιήσουν το ανοσιακό σύστημα ώστε να τα εντοπίσει και να τα καταστρέψει. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα προσέφεραν επαρκείς ενδείξεις της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας, στην πράξη όμως το κλινικό όφελος στις διάφορες κλινικές μελέτες δεν ξεπέρασε το 3-5%. Διάφορες εξηγήσεις έχουν δοθεί για τη μικρή αποτελεσματικότητα των μεθόδων ανοσοθεραπείας και ανάμεσα σε αυτές συμπεριλαμβάνεται η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εμπλέκονται στους μηχανισμούς της ανοσιακής απάντησης διαταράσσοντας την ισορροπία μεταξύ αυτής και της ανάπτυξης του όγκου, προάγοντας την ανοσοκαταστολή.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διερευνηθούν στον καρκίνο του πνεύμονα, η μεταγραφική έκφραση της hTERT, ενός TAA ικανού να διεγείρει ανοσιακή απάντηση και η μεταγραφική έκφραση της IDO, ενός ενζύμου με ανοσοκατασταλτική δράση. Ειδικότερα η hTERT αποτελεί ένα ελκυστικό αντιγόνο καθώς εκφράζεται ευρέως από τα καρκινικά κύτταρα ενώ εκφράζεται ελάχιστα από τους φυσιολογικούς ιστούς, η παρουσία του είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και ήδη εμβόλια έναντι διαφόρων πεπτιδίων της έχουν αξιολογηθεί σε κλινικές μελέτες φάσης I/II με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Από την άλλη η IDO διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ανοσοκαταστολής ίσως να αποτελεί μία από τις αιτίες αποτυχίας της αναγνώρισης και καταστροφής των καρκινικών κυττάρων, ενώ η αναστολή της θα μπορούσε να ενισχύσει την ανοσοθεραπευτική παρέμβαση.

Μεταγραφική έκφραση της hTERT

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η μεταγραφική έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε σε υψηλότερα επίπεδα από τον ιστό αναφοράς, στις 8 από τις 9 κυτταρικές σειρές καρκίνου πνεύμονα που μελετήθηκαν. Το παραπάνω εύρημα συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες στις οποίες μελετήθηκαν διάφορες κυτταρικές

σειρές καρκίνου πνεύμονα [90, 94]. Η έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε στο 87% του καρκινικού ιστού ασθενών με ΚΠ και μόλις στο 11% του παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετητών, σύμφωνα με τα οποία η έκφραση της hTERT ανιχνεύεται σε μεγάλο ποσοστό των χειρουργικά αφαιρεθέντων δειγμάτων ΚΠ, σημειώνεται όμως μεγάλη διακύμανσή του (από 50% έως 100%) [84, 89, 93, 94, 121, 122]. Σε κάποιες από αυτές τις μελέτες που συμπεριέλαβαν και παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό, η έκφραση της hTERT είτε δεν ανιχνεύτηκε [93, 121] είτε ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρό ποσοστό δειγμάτων (εώς 12%) [84, 94]. Στον καρκίνο του πνεύμονα, η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα της έκφρασης της hTERT όχι μόνο σε δείγματα χειρουργείου αλλά και σε άλλα βιολογικά υλικά, την ανάγουν δυνητικά σε έναν πιθανόν χρήσιμο βιολογικό δείκτη που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στη διάγνωση της νόσου.

Η ερευνητική προσπάθεια των τελευταίων χρόνων, αναγνωρίζοντας το σημαντικό ρόλο της τελομεράσης στον καρκίνο [282] καθώς και το γεγονός, ότι η hTERT εκφράζεται στην πλειοψηφία των καρκινικών δειγμάτων, το οποίο επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη, αναδεικνύει τις θεραπευτικές προοπτικές της αναστολής της. Οι μέχρι σήμερα θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί και αξιολογηθεί σε διάφορες μελέτες, κυρίως *in vitro*, αναφέρονται αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο του γενικού μέρους (1.3.3). Αξίζει να σημειωθεί η προσπάθεια ανοσοθεραπευτικής παρέμβασης στοχεύοντας την hTERT, η οποία από τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών [152, 153] θεωρείται πολλά υποσχόμενη και δικαιολογεί το ερευνητικό ενδιαφέρον για την περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγησή της στον καρκίνο του πνεύμονα.

Ειδικότερα, στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε, η συσχέτιση της σχετικής έκφρασης της hTERT με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεν βρέθηκε διαφορά της έκφρασης της σε σχέση με την ηλικία, το φύλο, την καπνιστική συνήθεια, το βαθμό διαφοροποίησης και τον ιστολογικό τύπο των ασθενών. Αναγνωρίστηκε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της έκφρασής της, με το pT, το pstage και τον όγκο του νεοπλάσματος ενώ φάνηκε και μια τάση συσχέτισης με τη διήθηση των λεμφαδένων. Τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Αν εξαιρέσουμε δύο μελέτες στις οποίες δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με καμία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν [84, 94], τα ευρήματα των περισσότερων μελετών ανέδειξαν συσχετίσεις με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Fujita et al. σε 146 ασθενείς με ΜΜΚΠ, αναφέρεται θετική συσχέτιση της hTERT με το pT και το pstage [93]. Συσχέτιση με το στάδιο της νόσου διαπιστώθηκε και στη μελέτη των Lantuejoul et al. σε 104 ασθενείς με ΜΜΚΠ και 18 με ΜΚΠ, ενώ στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε

μικρότερη έκφραση της hTERT στο αδενοκαρκίνωμα σε σύγκριση με τους άλλους ιστολογικούς τύπους (πλακώδες, ΜΚΠ, basaloid) [89]. Επίσης, οι Zhu et al. έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της hTERT ήταν συχνότερη στα πλακώδη καρκινώματα ενώ ενίσχυση του γονιδίου της παρατηρήθηκε πιο συχνά στα αδενοκαρκινώματα [135]. Η συσχέτιση της έκφρασης της hTERT με τη διήθηση των λεμφαδένων που ανευρέθηκε στις μελέτες των Hara et al [121] και Toomey et al. [122], δεν επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας, παρά την τάση συσχέτισης που παρατηρήθηκε. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η αυξημένη έκφραση της hTERT στους ασθενείς με μεγαλύτερο όγκο νεοπλασματος, η οποία για πρώτη φορά αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Σχετικά με το παραπάνω εύρημα, μία πολύ πρόσφατη εργασία σε 112 ασθενείς με ΜΜΚΠ, έδειξε με qRT-PCR, ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της hTERT στον ορό των ασθενών συσχετίστηκαν με το μέγεθος του όγκου [118]. Δεν μπορούμε επίσης να αγνοήσουμε, την καινούργια σταδιοποίηση του ΚΠ που έχει προταθεί από την IASLC, σύμφωνα με την οποία το μέγεθος του όγκου επηρεάζει καθοριστικά την πρόγνωση της νόσου και με βάση τα δεδομένα αυτά, αναμένεται η τροποποίηση της σταδιοποίησης του όγκου-T [283].

Το μικρό χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών, ίσως να συντέλεσε στην αδυναμία ανάδειξης συσχέτισης της έκφρασης της hTERT με την επιβίωσή τους. Ανατρέχοντας όμως στη διεθνή βιβλιογραφία, βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα των μελετών που ασχολήθηκαν με την προγνωστική αξία της hTERT, σχετίζοντας την έκφρασή της με διάφορους δείκτες επιβίωσης, δεν χαρακτηρίζονται από ομοφωνία. Είναι αρκετές οι εργασίες οι οποίες αναφέρουν πως η hTERT δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα [84, 89, 94, 122]. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα άλλων μελετών έδειξαν ότι οι ασθενείς με υψηλότερη έκφραση της hTERT έζησαν λιγότερο, καθώς η συνολική τους επιβίωση, και σε μερικές μελέτες και η επιβίωση ελεύθερη νόσου ήταν μικρότερες, αναδεικνύοντας τον ρόλο της ως δείκτη κακής πρόγνωσης [93, 121, 132, 135, 137]. Το ερώτημα παραμένει αναπάντητο προς το παρόν, ελπίζοντας στο μέλλον η συνεχιζόμενη έρευνα να μπορέσει να καταδείξει κατά πόσο η έκφραση της hTERT μπορεί να αποτελέσει έναν αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη στη διάθεση του κλινικού ιατρού.

Μεταγραφική έκφραση της IDO

Η IDO θεωρείται ένα από τα ένζυμα με ανοσοκατασταλτική δράση ενώ συνεχώς αυξάνονται οι μελέτες που την εμπλέκουν στους μηχανισμούς της ανοσοδιαφυγής του καρκίνου [208, 251, 284]. Με την παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, η ανίχνευση της έκφρασης της IDO με τη χρήση της qRT-PCR στον καρκίνο του πνεύμονα. Η χρήση μη προσβεβλημένου ιστού από τους ίδιους ασθενείς ως εσωτερικού μάρτυρα, αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων καθώς

εξαλείφει όλες τις εξωτερικές παραμέτρους που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την έκφραση στα συγκεκριμένα δείγματα σχετίζοντας πλέον την έκφραση του mRNA της IDO με το μοναδικό παράγοντα που διαφέρει ανάμεσα στα μη προσβεβλημένα και καρκινικά δείγματα, την ύπαρξη του όγκου.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι η μεταγραφική έκφραση της IDO ανιχνεύτηκε σε υψηλότερα επίπεδα από τον ιστό αναφοράς, στις 3 από τις 9 καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν. Με εξαίρεση μία καρκινική σειρά MMKP (NCI-H596), στην οποία ανιχνεύτηκε έκφραση της IDO στη μελέτη των Uyttenhove et al. [208] και η οποία συμπεριλήφθηκε και στη μελέτη μας, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, φάνηκε ότι το mRNA της IDO εκφράζεται συνεχώς από τα κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα. Στη βιβλιογραφία έχει ελεγχθεί η έκφραση της IDO σε πληθώρα καρκινικών σειρών διαφόρων τύπων καρκίνου και έχει επιβεβαιωθεί σε μεγάλο αριθμό από αυτές. Συγκεκριμένα, έκφραση IDO ανιχνεύθηκε σε κυτταρικές σειρές από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) παρουσία PBMCs [240], μελάνωμα (LB1610-MEL), καρκίνο παγκρέατος (MZ-PC-1), καρκίνο λάρυγγα (LB1263-SCCHN), πλακώδες καρκίνωμα φάρυγγα (LB1165-SCCHN) [208] και καρκίνο μαστού (MDA-MB-231) [238]. Θα μπορούσαμε λοιπόν να θεωρήσουμε πως σε κάποιες καρκινικές σειρές όπου ανιχνεύθηκε έκφραση της IDO, αυτή εκφράζεται συνεχώς από τα καρκινικά κύτταρα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρειάζεται ένα ερέθισμα για να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του γονιδίου. Είναι, επίσης, πιθανό η έλλειψη της έκφρασης στα δείγματα που εξετάστηκαν να οφείλεται στο χαμηλό ποσοστό των θετικών κυττάρων, στα ίδια τα δείγματα ή ακόμη, και στις συνθήκες καλλιέργειας. Όπως έχει αναφερθεί, η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής σε συνθήκες καλλιέργειας επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως διαλυτές ουσίες (IFN- γ , LPS, CD40L) [211] καθώς και από την παρουσία ή απουσία PBMCs και μακροφάγων [240].

Από τη παρούσα μελέτη φαίνεται, επίσης, ότι η μεταγραφική έκφραση της IDO ανιχνεύτηκε στην πλειοψηφία των δειγμάτων καρκινικού ιστού (87.5%) καθώς και παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού (84%), ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Σε προηγούμενες μελέτες έχει επιβεβαιωθεί έκφραση της IDO σε πολλούς καρκινικούς τύπους που περιλάμβανε η μελέτη των Uyttenhove et al. [208], και επιπλέον σε δείγματα ιστών από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [240], καρκίνο παχέος εντέρου [236], ωσθηκών [237] κ.ά., ενώ μόνο 2 μελέτες αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα [208, 241]. Οι μελέτες αυτές, έγιναν κυρίως σε επίπεδο πρωτεΐνης και κατέδειξαν έκφραση της IDO σε μεγάλο ποσοστό των καρκινικών δειγμάτων. Εντούτοις, σε μία μόνο από αυτές, περιλήφθηκε εσωτερικός μάρτυρας και δεν είναι ξεκάθαρη η έκφραση που διαπιστώθηκε στον υγιή ιστό, καθώς αναφέρεται πως τα περισσότερα κύτταρα του στρώματος ήταν αρνητικά για την IDO, χωρίς να υπάρχει αναφορά σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους ή για το ποσοστό της έκφρασής της

[208]. Από τα αποτελέσματά διαφαίνεται πως υπάρχει αυξημένη έκφραση της IDO στον καρκινικό ιστό, αλλά είναι αδιαμφισβήτητο πως, σε επίπεδο mRNA, υπάρχει και σημαντική έκφρασή της στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό. Παρόλου που στις περισσότερες περιπτώσεις η έκφραση της IDO ήταν μεγαλύτερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον αυτόλογο μη προσβεβλημένο ιστό, συγκρίνοντας, στο σύνολο των ασθενών, την έκφραση της IDO μεταξύ των δύο δειγμάτων, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η αρχική υπόθεση πως η έκφραση της IDO είναι μεγαλύτερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα επιβεβαιώνεται μόνο στην περίπτωση του αδενοκαρκινώματος.

Το ερώτημα που διατυπώνεται είναι για πιο λόγο ο μη προσβεβλημένος ιστός να εκφράζει μία πρωτεΐνη που μειώνει τα αποθέματα της τρυπτοφάνης, ενός από τα πιο βασικά αμινοξέα για την ανάπτυξη των T κυττάρων. Μια πιθανή απάντηση θα μπορούσε να δοθεί από την παρατήρηση πως και ο πνεύμονας μη καρκινοπαθών, ως όργανο που έρχεται συνεχώς σε επαφή με αντιγόνα, εκφράζει IDO για να προστατέψει το φυσιολογικό επιθήλιο από βλάβες. Υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις πως η IDO ευνοείται σε ιστούς όπου η καταστολή της ανοσιακής απάντησης είναι απαραίτητη και πιθανότατα προστατεύει τους ιστούς αυτούς από βλάβη που θα μπορούσε να προκληθεί από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα [227, 269]. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μεταβολή της δομής των βρογχιολίων (καταστροφή του επιθηλίου των αεραγωγών και του περιβάλλοντος ιστού) σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας της IDO, 1-MT σε σχέση με ποντίκια ελέγχου [269]. Μία ακόμη εξήγηση, θα μπορούσε να είναι πως η αυξημένη έκφραση που παρατηρήθηκε στο μη προσβεβλημένο ιστό ανταποκρίνεται στα επίπεδα mRNA, όχι όμως και της πρωτεΐνης. Επιπλέον, έκφραση της πρωτεΐνης δε σημαίνει απαραίτητα πως αυτή είναι ενζυμικά ενεργή. Μάλιστα, ανάλυση σε πηκτή δύο διαστάσεων αποκάλυψε την ύπαρξη διαφόρων ισομορφών της IDO πρωτεΐνης γεγονός που υποδηλώνει πως μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου [252]. Θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης και έλεγχος της δραστηριότητας του ενζύμου στα ίδια δείγματα, για να διαπιστωθεί εάν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA αντιστοιχούν στα επίπεδα της ενεργού πρωτεΐνης στο καρκινικό και στο μη προσβεβλημένο δείγμα. Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής δεν κατέστη δυνατός ο έλεγχος της έκφρασης της IDO σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όμως αποτελεί έναν από τους μελλοντικούς μας στόχους. Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοϊστοχημεία θα αποκάλυπτε όχι μόνο το ποσοστό της έκφρασης, αλλά και την κατανομή της πρωτεΐνης, καθώς έχει διατυπωθεί πως στο σύνολο του ιστού μια μειονότητα μόνο των κυττάρων παράγουν IDO [207, 241].

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα αυτής της μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι η σχετική έκφραση της IDO στις καρκινικές σειρές βρέθηκε μικρότερη από αυτή στον

καρκινικό ιστό αλλά και από την έκφρασή της στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την άποψη ότι εκτός από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα και άλλα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου ή της περιοχής γύρω από τον όγκο παράγουν μεγάλες ποσότητες του ενζύμου. Μέχρι σήμερα, σε διάφορες μελέτες, έχει καταδειχθεί η παραγωγή της IDO από μία ποικιλία κυττάρων που διηθούν τον όγκο όπως δενδριτικά κύτταρα [209], ηωσινόφιλα [241] μακροφάγα, κ.ά. [212], συμβάλλοντας στην κατασταλτική δράση του ενζύμου στην αντικαρκινική ανοσιακή απόκριση του ξενιστή. Η έκφραση της IDO στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί ως ένα βαθμό και στη διήθησή του από τα παραπάνω κύτταρα. Επιπρόσθετα, διάφορες διαλυτές ουσίες που παράγονται από τον όγκο όπως η ιντερφερόνη [270], γνωρίζοντας ότι επάγουν την παραγωγή της IDO [280], θα μπορούσαν καθώς διαχέονται στους ιστούς γύρω από τον όγκο, να προάγουν την παραγωγή του ενζύμου ακόμη και από φυσιολογικά κύτταρα (μακροφάγα κ.ά.). Τέλος, η χρόνια φλεγμονή που συνήθως συνυπάρχει στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, αποτέλεσμα της επίδρασης του καπνίσματος ή και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, θα μπορούσε επίσης να ευθύνεται για την έκφραση της IDO στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό [266].

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να τονιστεί και η σημασία του ευρήματος αυτού από πρακτικής απόψεως καθώς χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της έκφρασης των διαφόρων γονιδίων στον καρκίνο, ανάλογα με το εάν έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη τους, καρκινικές σειρές ή καρκινικός ιστός. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται καρκινικός ιστός υπάρχει πάντα το ενδεχόμενο, τα υπό μελέτη γονίδια να μην εκφράζονται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα αλλά από κάποιον τύπο φυσιολογικών κυττάρων μεταξύ των πολλών που διηθούν τον όγκο, προκαλώντας σύγχυση και οδηγώντας σε παραπλανητικές εκτιμήσεις των αποτελεσμάτων. Επίσης, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα έκφρασης στην περιοχή του όγκου και άλλων γονιδίων που δεν έχουν ακόμη αναγνωρισθεί, ως αποτέλεσμα διαφόρων σημάτων επαγωγής από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, και τα οποία ίσως να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον καρκίνο.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης, δεν αναδεικνύεται συσχέτιση της έκφρασης της IDO με τον ιστολογικό τύπο (αδενοκαρκίνωμα vs πλακώδες καρκίνωμα). Η διαφορά της έκφρασης της IDO (με ανοσοϊστοχημεία), μεταξύ ΜΜΚΠ και ΜΚΠ που περιγράφεται στη μελέτη των Uyttenhove et al. [208], δεν μπορεί να ελεγχθεί στην παρούσα μελέτη καθώς είχαμε στη διάθεσή μας μόνο ένα δείγμα ΜΚΠ. Πιθανόν, άλλοι βιολογικοί παράγοντες εκτός της ιστολογικής προέλευσης των καρκινικών κυττάρων όπως για παράδειγμα η ιντερφερόνη που παράγεται από αυτά, φαίνεται να ρυθμίζουν την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εκφράζουν IDO. Στη δράση των

παραγόντων αυτών, μπορεί να οφείλεται και η μεγάλη διακύμανση των επιπέδων έκφρασης της IDO που παρατηρήθηκε στα δείγματά μας.

Επιχειρήθηκε επίσης, η συσχέτιση της έκφρασης της IDO και με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών χωρίς όμως να αναδειχθεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα, συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετητών, όπως στην περίπτωση καρκίνου των ωοθηκών [237], και ηπατοκυτταρικού καρκίνου [240]. Σε άλλες όμως μελέτες, έχουν αναφερθεί συσχετίσεις, όπως σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, όπου η υψηλή έκφραση της IDO συσχετίστηκε με την ύπαρξη ηπατικών μεταστάσεων [236], ενώ σε μελέτη που αφορούσε ασθενείς με καρκίνο ενδομήτριου, βρέθηκε μεγαλύτερη έκφραση της IDO στους ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις, και σε πιο προχωρημένο στάδιο νόσου [239]. Η αδυναμία ανεύρεσης ανάλογων συσχετίσεων, μπορεί εν μέρει να οφείλεται στο μικρό αριθμό του δείγματος και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης και αξιολόγησης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Μπορεί όμως, η ανοσοκατασταλτική δράση της IDO να μην εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των ασθενών ή τη βαρύτητα της νόσου. Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι η έκφραση της IDO αποτελεί προγνωστικό παράγοντα σε διάφορους τύπους καρκίνου, ανεξάρτητα της συσχέτισής της με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους [236, 237, 239]. Από τα αποτελέσματα της μελέτης, προκύπτουν ενδείξεις ότι η έκφραση της IDO στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα συσχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου. Αναδείχθηκε η αρνητική προγνωστική αξία της σχετικής έκφρασης της IDO καθώς οι ασθενείς με υψηλότερη έκφραση έζησαν λιγότερο. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια μόνο σχετική μελέτη, σε 17 ασθενείς με ΜΜΚΠ, στην οποία φάνηκε ότι οι ασθενείς που έζησαν λιγότερο από 3 χρόνια είχαν περισσότερα IDO (+) κύτταρα έναντι αυτών που έζησαν πάνω από 3 χρόνια [241]. Με βάση τα δεδομένα της μελέτης μας και λαμβάνοντας υπόψη την υπάρχουσα βιβλιογραφία, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε, πως η αυξημένη έκφραση της IDO στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, οδηγεί σε καταστολή της ανοσιακής απάντησης και κατά συνέπεια δυσμενή πρόγνωση. Η κλινική σημασία του ευρήματος είναι ιδιαίτερα σημαντική, εάν θεωρήσουμε ότι η έκφραση της IDO θα μπορούσε να ξεχωρίσει την ομάδα ασθενών με κακή πρόγνωση, η οποία χρήζει πιο επιθετικής θεραπευτικής αντιμετώπισης, αυξάνοντας παράλληλα την επαγρύπνηση για πιο τακτική παρακολούθηση. Η περαιτέρω αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας της IDO στον καρκίνο του πνεύμονα δύναται να αποτελέσει ένα ενδιαφέρον αντικείμενο μελλοντικών κλινικών μελετών.

Συνέκφραση hTERT και IDO

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι το mRNA των γονιδίων της *hTERT* και της *IDO*, συνεκφράστηκαν στο 75% των νεοπλασματικών δειγμάτων. Το

τελευταίο διάστημα γίνεται προσπάθεια αναγνώρισης της συνέκφρασης διαφόρων TAAs στον καρκίνο του πνεύμονα, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολλαπλούς στόχους ανοσοθεραπευτικής προσέγγισης [285]. Από όσο γνωρίζουμε όμως από τη διεθνή βιβλιογραφία, δεν έχει επιχειρηθεί μέχρι σήμερα η εκτίμηση της συνέκφρασης οποιουδήποτε TAA με ανοσοκατασταλτικά μόρια. Η σχετική έκφραση των δύο γονιδίων δεν βρέθηκε να συσχετίζεται μεταξύ τους. Διαφαίνεται, ότι άλλοι παράγοντες που έχουν αναλυθεί παραπάνω, επηρεάζουν την έκφραση της IDO και ρυθμίζουν την ανοσοκατασταλτική της δράση, ανεξάρτητα ίσως από την έκφραση των TAAs στον καρκινικό ιστό. Ενώ η πλειοψηφία των καρκινικών δειγμάτων εκφράζει την hTERT, ένα TAA ικανό να διεγείρει ειδικές CD8+ κυτταρικές απαντήσεις, που θα μπορούσαν να αναγνωρίσουν τον στόχο τους στον όγκο και να οδηγήσουν στην λύση του, η συνέκφραση της IDO παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, πιθανόν συμβάλλει στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση του ξενιστή.

Συμπεράσματα και προοπτικές

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταβληθεί πάρα πολλές προσπάθειες για να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο το ανοσιακό σύστημα αναγνωρίζει και αντιδρά έναντι του καρκίνου. Ωστόσο, πολλές πτυχές αυτής της πολύπλοκης ασθένειας δεν έχουν διευκρινιστεί και πολλά ερωτήματα παραμένουν ακόμη αναπάντητα. Μόλις πρόσφατα, η ανοσοθεραπεία αρχίζει να θεωρείται από πολλούς ως εναλλακτική λύση σε μία προσπάθεια αξιοποίησης του ανοσιακού συστήματος για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι μέχρι τώρα μελέτες στον καρκίνο, αποσκοπούσαν στην αναγνώριση διαφόρων TAAs που ενδεχομένως θα αποτελούσαν στόχους της ανοσοθεραπείας. Κλινικές δοκιμές με εμβολιασμό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα έναντι πληθώρας αντιγόνων των όγκων είχαν μικρή επιτυχία, αν και σε κάποιους από τους ασθενείς ανιχνεύθηκε ανοσιακή απάντηση στο εμβόλιο. Διάφορες εξηγήσεις έχουν δοθεί για τη μικρή αποτελεσματικότητα των μεθόδων ανοσοθεραπείας και ανάμεσα σε αυτές συμπεριλαμβάνεται ένα πλήθος μηχανισμών που οδηγούν στην ανοσοκαταστολή και πιθανότατα αρκετοί από αυτούς (αλλά και άλλοι που δεν είναι ακόμη γνωστοί) να εμπλέκονται και στην ανοσοδιαφυγή του καρκίνου. Ο σχεδιασμός της παρούσας μελέτης στηρίχτηκε στην υπόθεση, ότι στον καρκινικό ιστό, εκφράζονται τόσο TAAs όσο και ανοσοκατασταλτικά μόρια.

Προς αυτή την κατεύθυνση κινήθηκε η μελέτη, με στόχο να ελεγχθεί η μεταγραφική έκφραση ενός TAA, της hTERT, καθώς και ενός ανοσοκατασταλτικού μορίου, της IDO, στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματά της, επιβεβαιώνουν την έκφραση των δύο γονιδίων στην πλειοψηφία των ασθενών καθώς και τη συνέκφρασή τους. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον από κλινικής απόψεως, έχει η

ανάδειξη της προγνωστικής τους αξίας, καθώς η αυξημένη έκφραση της hTERT είχε θετική συσχέτιση με τη βαρύτητα της νόσου, ενώ η έκφραση της IDO συσχετίστηκε με την επιβίωση των ασθενών, όπου φάνηκε ότι οι ασθενείς με υψηλότερη έκφραση της IDO είχαν χειρότερη πρόγνωση. Ο προσδιορισμός προγνωστικών δεικτών στον ΚΠ θεωρείται μείζονος προτεραιότητας, εφόσον η μέχρι σήμερα θεραπευτική αντιμετώπιση δεν έχει προσφέρει τα μέγιστα. Η αναγνώριση κατά τη διάγνωση, των ασθενών με κακή πρόγνωση, θα μπορούσε ίσως να συντελέσει στην τροποποίηση της προσέγγισής τους, συμβάλλοντας στη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής τους αντιμετώπισης, αποσκοπώντας στην ουσιαστική αύξηση της επιβίωσής τους.

Τέλος, καθώς ο στόχος της ανοσοθεραπείας είναι η εκμετάλλευση της επίκτητης ανοσίας για την πρόκληση αποτελεσματικής απάντησης ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, η IDO θα μπορούσε να είναι ένας θεραπευτικός στόχος για την επαγωγή της T κυτταρικής απάντησης στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου [284]. Χρήσιμο θα ήταν ίσως, πέρα από τα TAAs που προσδιορίζονται στον καρκινικό ιστό με σκοπό να αποτελέσουν στόχο εμβολίων, να αναλύονται και τα επίπεδα έκφρασης της IDO. Σε περίπτωση αυξημένης έκφρασης της IDO, θα ήταν ενδιαφέρον να αναστέλλεται η δράση της, με τη χορήγηση αναστολέων της, όπως η 1MT, με σκοπό την πιθανή ενίσχυση των ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων. Μάλιστα, πρόσφατα, μελετήθηκαν και διάφοροι υποψήφιοι αναστολείς της IDO, οι οποίοι με τη σύγχρονη χορήγησή τους με κυτταροτοξικά φάρμακα, θα μπορούσαν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας στην καταπολέμηση του καρκίνου [279]. Η περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγηση του θέματος στο πλαίσιο καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών είναι αναγκαία για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ της μελέτης ήταν η ανίχνευση της μεταγραφικής έκφρασης της hTERT και της IDO σε καρκινικές σειρές και σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα τόσο σε καρκινικό ιστό όσο και σε παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό, καθώς και η συσχέτιση της σχετικής έκφρασής τους με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους και με την επιβίωση των ασθενών.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ: Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 9 καρκινικές κυτταρικές σειρές ΜΜΚΠ και 28 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα, 23 άντρες και 5 γυναίκες, μέσης ηλικίας 63.4 ± 9.7 έτη. Η μεταγραφική έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε με ημιποσοτική PCR και της IDO με qRT-PCR, ενώ προσδιορίστηκε η σχετική έκφρασή τους ως προς έναν κοινό ιστό αναφοράς που ήταν το αμάρτωμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η μεταγραφική έκφραση της hTERT ανιχνεύτηκε σε 8 από τις 9 καρκινικές σειρές (68.96 ± 31.33), σε 21/24 δείγματα καρκινικού ιστού (71.00 ± 68.50) και στα 3/27 δείγματα παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού (1.00 ($1.00-48.10$)). Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης της hTERT σε σχέση με το pT ($p=0.017$), το pstage ($p=0.037$) και τον όγκο του νεοπλασματος ($p=0.001$) ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ελεύθερη νόσου επιβίωση ή τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Η μεταγραφική έκφραση της IDO ανιχνεύτηκε στις 3 από τις 9 καρκινικές σειρές (4.68 ± 11.08) σε 21/24 δείγματα καρκινικού ιστού (8.46 ± 15.18) και σε 21/25 δείγματα παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού (3.28 ± 2.51). Η σχετική έκφραση της IDO στις καρκινικές σειρές βρέθηκε μικρότερη από αυτή στον παρακείμενο μη προσβεβλημένο ιστό ($p=0.021$) και στον καρκινικό ιστό ($p=0.014$). Στο αδενοκαρκίνωμα η σχετική έκφραση της IDO ήταν μεγαλύτερη στον καρκινικό ιστό έναντι του παρακείμενου μη προσβεβλημένου ιστού ($p=0.046$). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης της IDO σε σχέση με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους ή την ελεύθερη νόσου επιβίωση, παρατηρήθηκε όμως αρνητική συσχέτιση της έκφρασής της στον καρκινικό ιστό, με τη συνολική επιβίωση των ασθενών ($p=0.033$). Συνέκφραση του mRNA των δύο γονιδίων, παρατηρήθηκε στα 18 από τα 24 δείγματα καρκινικού ιστού (75%), χωρίς όμως να αναδειχθεί συσχέτιση μεταξύ τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Αναγνωρίστηκε η μεταγραφική έκφραση των γονιδίων της hTERT και της IDO στον καρκίνο του πνεύμονα καθώς και η συνέκφρασή τους στην πλειοψηφία των ασθενών. Επίσης, ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον, έχει η ανάδειξη της προγνωστικής τους αξίας ενώ θα μπορούσαν να αποτελέσουν και έναν ελκυστικό, παράλληλο, θεραπευτικό στόχο στο πλαίσιο ανοσοθεραπείας του καρκίνου.

ABSTRACT

Transcriptional Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) and Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) in Lung Cancer

T.Kerenidi

Department of Respiratory Medicine; Cancer Immunology Unit, Department of Immunology and Histocompatibility; School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, Greece.

OBJECTIVE: The aim of this study was to investigate the transcriptional expression of hTERT and IDO in lung cancer cell lines as well as in patients with lung cancer (both in malignant and autologous adjacent non affected lung tissue samples). Correlations of their relative expression with clinicopathological parameters of the disease and survival were performed.

MATERIAL AND METHODS: Nine human lung cancer cell lines and 28 patients (23 males and five females, mean age 63.4 ± 9.7 years) with primary lung cancer were enrolled in the study. hTERT expression was determined by semi-quantitative PCR and IDO expression by qRT-PCR, using a sample of lung hamartoma as reference.

RESULTS: hTERT expression was detected in 8 out of the 9 cell lines (68.96 ± 31.33), in 21/24 patients' tumor samples (71.00 ± 68.50) and in 3/27 autologous non malignant lung tissues ($1.00 (1.00-48.10)$) that were examined. The relative expression of hTERT was significantly associated with pT ($p=0.017$), pTNM stage ($p=0.037$) and tumor volume ($p=0.001$). In contrast, no significant difference was found with disease free survival, or overall survival. IDO expression was detected in 3 out of the 9 cell lines (4.68 ± 11.08), in 21/24 patients' tumor samples (8.46 ± 15.18) and in 21/25 autologous non malignant lung tissues (3.28 ± 2.51) that were examined. The relative expression of IDO in lung cancer cell lines (4.7 ± 11.1) was significantly lower than that of all patients' tumor samples ($p=0.014$) as well as than that of the autologous non affected lung tissues ($p=0.021$). Only in ADC the relative expression of IDO was

higher in tumor samples than in non malignant lung tissues ($p=0.046$). No statistically significant differences were noted between ADC and SCC regarding either the tumor samples or the autologous non affected samples. No significant correlations between IDO expression and other clinicopathological parameters were found. However, there was a negative relationship between IDO expression and survival ($p=0.033$). Although co-expression of the two genes was observed in the majority of tumor samples (75%), their expression was not correlated.

CONCLUSION: Direct evidence is provided demonstrating that both hTERT and IDO mRNA can be constitutively expressed in lung cancer and co-expressed in the majority of them. The findings suggest that their expression may serve as a valuable prognostic factor for patients with lung cancer and as potential target for cancer immunotherapy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 JEMAL A, THOMAS A, MURRAY T, THUN M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002, 53:23.
- 2 FERLAY J, BRAY F, PISANI P, PARKIN DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide Version 2.0 (IARC, Cancerbase No. 5) Lyon, France, IARC Press, 2004.
- 3 BOYLE P, FERLAY J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005, 16:481-8.
- 4 ALBERG AJ, SAMET JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003, 123(Suppl):21-49.
- 5 BRAMBILLA E, TRAVIS WD, COLDY TV, CORRIN B, SHIMOSATO Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001, 18:1059-68.
- 6 LI MAO. Molecular abnormalities in lung carcinogenesis and their potential clinical implications. *Lung Cancer* 2001, 34(Suppl):27-34.
- 7 PASCHEN A, EICHMULLER S, SCHADENDORF D. Identification of tumor antigens and T-cell epitopes and its clinical application. *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53:196-203.
- 8 ROSENBERG SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001, 411:380-92.
- 9 KIRKIN AF, DZHANDZHUGAZYAN K, ZEUTHEN J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS* 1998, 106:665-79.
- 10 CASTELLI C, RIVOLTINI L, ANDREOLA G, CARRABBA M, RENKVIST N, PARMIANI G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 2000, 182:323-31.
- 11 VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, ET AL. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991, 254:1643-7.
- 12 DUNN G, LLOYD O, SCHREIBER R. The immunobiology of cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 2004, 21:137-48.
- 13 MITRA R, SINGH S, KHAR A. Antitumour immune responses. *Exp Rev Mol Med* 2003, 5:1-22.
- 14 VAN DEN EYNDE BJ, VAN DER BRUGGEN P. T cell defined tumor antigens *Curr Opin Immunol* 1997, 9:684-93.
- 15 DAVIS ID, JEFFORD M, PARENTE P, CEBON J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2003, 73:3-29.
- 16 <http://www.cancerimmunity.org/links/databases.htm>
- 17 GILLESPIE AM, COLEMAN RE. The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 1999, 25:219-27.
- 18 ALTIERI DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003, 22:8581-9.
- 19 ROSENBERG SA, YANG JC, RESTIFO NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004, 10:909-15.
- 20 KARANIKAS V, COLAU D, BAURAIN JF, CHIARI R, THONNARD J, GUTIERREZ-ROELENIS I, 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. *Cancer Res* 2001, 61:3718-24.

-
- 21 MAMI-CHOUAIB F, ECHCHAKIR H, DOROTHEE G, VERGNON I, CHOUAIB S. Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human carcinoma: identification of tumor-associated antigen. *Immunol Rev* 2002, 188:114-21.
 - 22 HIRSCHOWITZ EA, HIESTAND DM, YANNELLI JR. Vaccines for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006, 1:93-100.
 - 23 RAEZ LE, FEIN S, PODACK ER. Lung cancer immunotherapy. *Clin Med Res* 2005, 3:221-8.
 - 24 GRIFFITH JD, COMEAU L, ROSENFELD S, STANSEL RM, BIANCHI A, MOSS H, ET AL. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999, 97:503-14.
 - 25 DE LANGE T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 2002, 21: 532-40.
 - 26 DE LANGE T. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:323-9.
 - 27 www.mun.ca/.../Topics/Euk_replication.html
 - 28 D'ADDA DI FAGAGNA F, TEO SH, JACKSON SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response *Genes & Development* 2004, 18:1781-99.
 - 29 BLACKBURN EH, GALL JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 1978, 120:33-53.
 - 30 FENG J, FUNK WD, WANG SS, WEINRICH SL, AVILION AA, CHIU CP, ET AL. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995, 269:1236-41.
 - 31 NAKAMURA TM, MORIN GB, CHAPMAN KB, WEINRICH SL, ANDREWS WH, LINGNER J, ET AL. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997, 277:955-9.
 - 32 HARRINGTON L, MCPHAIL T, MAR V, ZHOU W, OULTON R, BASS MB, ET AL. A mammalian telomerase associated protein. *Science* 1997, 275:973-7.
 - 33 SHAY JW, ZOU Y, HIYAMA E, WRIGHT WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 2001, 10:677-85.
 - 34 REDDEL RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase and cancer. *Cancer Lett* 2003, 194:155-62.
 - 35 SUN B, CHEN M, HAWKS CL, HORNSBY PJ. Immortal ALT+ human cells do not require telomerase reverse transcriptase for malignant transformation. *Cancer Res* 2005, 65:6512-5.
 - 36 SODER AI, HOARE SF, MUIR S, GOING JJ, PARKINSON EK, KEITH WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 1997, 14:1013-21.
 - 37 BRYCE LA, MORRISON N, HOARE SF, MUIR S, KEITH N. Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2000, 2:197-201.
 - 38 http://www.phoenixbiomolecular.com/regenerative_medicine.html
 - 39 www.patentlens.net/.../navaggregator
 - 40 KILIAN A, BOWTELL DDL, ABUD HE, HIME GR, VENTER DJ, KEESE PK, ET AL. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 1997, 6:2011-9.
 - 41 MAURO LJ, FOSTER DN. Regulators of Telomerase Activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 26:521-4.
 - 42 LIU J P. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 1999, 13:2091-104.
 - 43 DUCREST AL, SZUTORISZ H, LINGNER J, NABHOLZ M. Regulation of the human telomerase gene. *Oncogene* 2002, 21:541-52.
 - 44 HORIKAWA I, BARRETT JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003, 24:1167-76.
 - 45 ZHANG A, ZHENG C, LINDVALL C, HOU M, EKEDAHL J, LEWENSOHN R, ET AL. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res* 2000, 60:6230-5.
 - 46 www.bio.davidson.edu/.../Parker/protein.html
 - 47 FORSYTH NR, WRIGHT WE, SHAY JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on and turn it off again. *Differentiation* 2002, 69:188-97.

-
- 48 BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORIN GB, ET AL. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998, 279:349-52.
- 49 BEN-PORATH I, WEINBERG RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 2004, 113:8-13.
- 50 SHARPLESS NE, DEPINHO RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 2004, 113:160-8.
- 51 MEYERSON M. Role of Telomerase in Normal and Cancer Cells. *J Clin Oncol* 2000, 18:2626-34.
- 52 www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004519h.htm
- 53 SHAY JW, WRIGHT WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005, 26:867-74.
- 54 CHANG S, KHOO CM, NAYLOR ML, MASER RS, DEPINHO RA. Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. *Genes & Development* 2003, 17:88-100.
- 55 PERRAULT SD, HORNSBY PJ, BETTS DH. Global gene expression response to telomerase in bovine adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 335:925-36.
- 56 JAGADEESH S, BANERJEE PP. Telomerase reverse transcriptase regulates the expression of a key cell cycle regulator, cyclin D1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 347:774-80.
- 57 MASSARD C, ZERMATI Y, PAULEAU A, LAROCLETTE N, MÉTIVIER D, SABATIER L, ET AL. hTERT: A novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006, 25:4505-14.
- 58 LAI SR, CUNNINGHAM AP, HUYNH VQ, ANDREWS LG, TOLLEFSBOL TO. Evidence of extra-telomeric effects of hTERT and its regulation involving a feedback loop. *Exp Cell Res* 2007, 313:322-30.
- 59 MEYERSON M, COUNTER CM, EATON ENG, ELLISEN LW, STEINER P, CADDLE SD, ET AL. hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization. *Cell* 1997, 90:785-95.
- 60 MEEKER AK, HICKS JL, IACOBUZIO-DONAHUE CA, MONTGOMERY WH, WESTRA EA, CHAN TY, ET AL. Telomere Length Abnormalities Occur Early in the Initiation of Epithelial Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004, 10:3317-26.
- 61 DE LANGE T, SHIUE L, MYERS RM, COX DR, NAYLOR SL, KILLERY AM, ET AL. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 1990, 10:518-27.
- 62 DE KOK JB, RUERS TJM, VAN MUIJEN GNP, VAN BOKHOVEN A, WILLEMS HL, SWINKELS DW. Real-Time Quantification of Human Telomerase Reverse Transcriptase mRNA in Tumors and Healthy Tissues. *Clin Chem* 2000, 46:313-8.
- 63 HIYAMA E, HIYAMA K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 2002, 21:643-9.
- 64 SATRA M, GATSELIS N, ILIOPOULOS D, ZACHAROULIS D, DALEKOS GN, TSEZOU A. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in liver tissues from patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2007, 14:41-7.
- 65 HOOS A, HEPP HH, KAUL S, AHLERT T, BASTERT G, WALLWIENER D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer* 1998, 79:8-12.
- 66 GHORI A, USSELMANN B, FERRYMAN S, MORRIS A, I FRASER. Telomerase expression of malignant epithelial cells correlates with Dukes' stage in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2002, 4:441-6.
- 67 YIM HW, SLEBOS RJC, RANDELL SH, UMBACH DM, PARSONS AM, RIVERA MP, ET AL. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett* 2007, 246:24-33.
- 68 CAPKOVA L, KALINOVA M, KRŠKOVA L, KODETOVA D, PETRIK F, TREFNY M, ET AL. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer* 2007, 109:2299-307.
- 69 YASHIMA K, LITZKY LA, KAISER L, ROGERS T, LAM S, WISTUBA II, ET AL. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997, 57:2373 - 7.

-
- 70 DEJMEK A, YAHATA N, OHYASHIKI K, KAKIHANA M, HIRANO T, KAWATE N, ET AL. Correlation between morphology and telomerase activity in cells from exfoliative lung cytologic specimens. *Cancer* 2000, 90:117-25.
- 71 KAKIHANA M, YAHATA N, HIRANO T, HONDA H, IKEDA N, KAWATE N, ET AL. Telomerase activity during carcinogenesis in the bronchus. *Oncol Rep* 2002, 9:43-9.
- 72 SNIJDERS PJF, BREUER RHJ, SUTEDJA TG, EGGING M, VOORHORST FJ, STEENBERGEN RDM, ET AL. Elevated hTERT mRNA levels: A potential determinant of bronchial squamous cell carcinoma (in situ). *Int J Cancer* 2004, 109(3):412-7.
- 73 NAKANISHI K, KAWAI T, KUMAKI F, HIRO T, MUKAI M, IKEDA E. Expression of human telomerase RNA component and telomerase reverse transcriptase mRNA in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hum Pathol* 2002, 33:697-702.
- 74 KAWAI T, HIROI S, NAKANISHI K, MEEKER AK. Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* 2007, 127:254-62.
- 75 SHIBUYA K, FUJISAWA T, HOSHINO H, BABA M, SAITOH Y, IIZASA T, ET AL. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 2001, 92:849-55.
- 76 LANTUEJOUL S, SORIA JC, MORAT L, LORIMIER P, MORO-SIBILOT D, SABATIER L, ET AL. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res* 2005, 11:2074-82.
- 77 SHIROTANI Y, HIYAMA K, ISHIOKA S, INYAKU K, AWAYA Y, YONEHARA S, ET AL. Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer* 1994, 11:29-41.
- 78 HIRASHIMA T, KOMIYA T, NITTA T, TAKADA Y, KOBAYASHI M, MASUDA N, ET AL. Prognostic significance of telomeric repeat length alterations in pathological stage I-IIIa non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2000, 20:2181-7.
- 79 WU X, AMOS CI, ZHU Y, ZHAO H, GROSSMAN BH, SHAY JW, ET AL. Telomere Dysfunction: A Potential Cancer Predisposition Factor. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95:1211-1218.
- 80 HIYAMA K, HIYAMA E, ISHIOKA S, YAMAKIDO M, INAI K, GAZDAR AF, ET AL. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:895-902.
- 81 HIRASHIMA T, YOSHITAKA O, NITTA T, SASADA S, KOBAYASHI M, MASUDA N, ET AL. Telomerase activity in endoscopically visible lung cancer. *Anticancer Res* 2001, 21:3685-9.
- 82 LANTUEJOUL S, SALON C, SORIA J, BRAMBILLA E. Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *Int J Cancer* 2007, 120:1835-41.
- 83 KUMAKI F, KAWAI T, HIROI S, SHINOMIYA N, OZEKI Y, FERRANS VJ, ET AL. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol* 2001, 32:188-95.
- 84 ARINAGA M, SHIMIZU S, GOTOH K, HARUKI N, TAKAHASHI T, TAKAHASHI T, ET AL. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann Thorac Surg* 2000, 70:401-405.
- 85 HSU CP, MIAW J, HSIA JY, SHAI SE, CHEN CY. Concordant expression of the telomerase-associated genes in non-small cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003, 29:594-9.
- 86 YOKOI S, YASUI K, IIZASA T, IMOTO I, FUJISAWA T, INAZAWA J. *TERC* Identified as a Probable Target within the 3q26 Amplicon That Is Detected Frequently in Non-Small Cell Lung Cancers *Clin Cancer Res* 2003, 9:4705 - 13.
- 87 SARVESVARAN J, GOING JJ, MILROY R, KAYE SB, KEITH WN. Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment? *Carcinogenesis* 1999, 20: 1649-52.

-
- 88 SARETZKI G, PETERSEN S, PETERSEN I, KOLBLE K, VON ZGLINICKI T. hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 2002, 176:81-91.
- 89 LANTUEJOUL S, SORIA JC, MORO-SIBILO D, MORAT L, VEYRENC S, LORIMIER P, ET AL. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *Br J Cancer* 2004, 90:1222-9.
- 90 FUJIWARA M, KAMMA H, WU W, HAMASAKI M, KANEKO S, HORIGUCHI H, ET AL. Expression and alternative splicing pattern of human telomerase reverse transcriptase in human lung cancer cells. *Int J Oncol* 2004, 24:925-30.
- 91 MAVROGIANNOU E, STRATI A, STATHOPOULOU A, TSAROUCHEA EG, KAKLAMANIS L, LIANIDOU ES. Real-Time RT-PCR Quantification of Human Telomerase Reverse Transcriptase Splice Variants in Tumor Cell Lines and Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Chem* 2007, 53:53-61.
- 92 TAGA S, OSAKI T, OHGAMI A, IMOTO H, YASUMOTO K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Ann Surg* 1999, 230:715-20.
- 93 FUJITA Y, FUJIKANE T, FUJUCHI S, NISHIGAKI Y, YAMAZAKI Y, NAGASE A, ET AL. The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003, 98:1008-13.
- 94 WU TC, LIN P, HSU CP, HUANG YJ, CHEN CY, CHUNG WC, ET AL. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer* 2003, 41:163-9.
- 95 ZAFFARONI N, DE POLO D, VILLA R, DELLA PORTA C, COLLINI P, FABBRI A, ET AL. Differential expression of telomerase activity in neuroendocrine lung tumours: correlation with gene product immunophenotyping. *J Pathol* 2003, 201:127-33.
- 96 SEN S, REDDYA VG, KHANNAA N, GULERIAB R, KAPILAC K, SINGH N. A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer. *Lung Cancer* 2001, 33:41-9.
- 97 SEN S, REDDY VG, GULERIA R, JAIN SK, KAPILA K, SINGH N. Telomerase--a potential molecular marker of lung and cervical cancer. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40:994-1001.
- 98 YAHATA N, OHYASHIKI K, OHYASHIKI JH, IWAMA H, HAYASHI S, ANDO K, ET AL. Telomerase Activity in Lung Cancer Cells Obtained From Bronchial Washings *J Natl Cancer Inst* 1998, 90:684-90.
- 99 PASRIJA T, SRINIVASAN R, BEHERA D, MAJUMDAR S. Telomerase activity in sputum and telomerase and its components in biopsies of advanced lung cancer. *Eur J Cancer* 2007,43:1476-82.
- 100 TAILLADE L, PENAUT-LLORCA F, BOULET T, FOURET P, MICHIELS S, TARANCHON E, ET AL. Immunohistochemical expression of biomarkers: A comparative study between diagnostic bronchial biopsies and surgical specimens of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2007,18:1043-50.
- 101 ARAI T, YASUDA Y, TAKAYA T, ITO Y, HAYAKAWA K, TOSHIMA S, ET AL. Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep* 1998, 5:405-8.
- 102 XINARIANOS G, SCOTT FM, LILOGLOU T, PRIME W, TURNBULL L, WALSHAW M ET AL. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer* 2000, 28:37-42.
- 103 DIKMEN E, KARA M, DIKMEN G, ÇAKMAK H, DOGAN P. Detection of telomerase activity in bronchial lavage as an adjunct to cytological diagnosis in lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003, 23:194-9.
- 104 ENGEL E, SCHMIDT B, CARSTENSEN T, WEICKMANN S, JANDRIG B, WITT C, ET AL. Detection of Tumor-Specific mRNA in Cell-Free Bronchial Lavage Supernatant in Patients with Lung Cancer. *Ann NY Acad Sci* 2004, 1022:140-6.
- 105 MU XC, BRIEN TP, ROSS JS, LOWRY CV, MCKENNA BJ. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer* 1999, 87:93-9.
- 106 MU XC, BRIEN TP, ROSS JS, LOWRY CV, MCKENNA BJ. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer* 1999, 87:93-9.
- 107 YANG CT, LEE MH, LAN RS, CHEN JK. Telomerase activity in pleural effusions: diagnostic significance. *J Clin Oncol* 1998, 16:567-73.

-
- 108 DEJMEK A, YAHATA N, OHYASHIKI K, EBIHARA Y, KAKIHANA M, HIRANO T, ET AL. In situ telomerase activity in pleural effusions: a promising marker for malignancy. *Diagn Cytopathol* 2001, 24:11-5.
- 109 DIKMEN G, DIKMEN E, KARA M, SAHIN E, DOGAN P, ÖZDEMİR N. Diagnostic implications of telomerase activity in pleural effusions. *Eur Respir J* 2003, 22:422-6.
- 110 ZENDEHROKH N, DEJMEK A. Telomere repeat amplification protocol (TRAP) in situ reveals telomerase activity in three cell types in effusions: malignant cells, proliferative mesothelial cells, and lymphocytes. *Mod Pathol* 2005, 18:189-96.
- 111 HIROI S, NAKANISHI K, KAWAI T. Expressions of human telomerase mRNA component (hTERC) and telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 2003, 29:212-6.
- 112 NIEH S, CHEN SF, FU E, JAN CI, LEE WH. Detection of the human telomerase RNA component by in situ hybridization in cells from body fluids. *Acta Cytol* 2005, 49:31-7.
- 113 YASHIMA, K, PIATYSZEK MA, SABOORIAN HM, VIRMANI AK, BROWN D, SHAY JW, ET AL. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and nonmalignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 1997, 50:110-7.
- 114 AHRENDT SA, YANG SC, WU L, WESTRA WH, JEN J, CALIFANO JA ET AL. Comparison of oncogene mutation detection and telomerase activity for the molecular staging of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997, 3:1207-14.
- 115 WALLACE MB, BLOCK M, HOFFMAN BJ, HAWES RH, SILVESTRI G, REED CE, ET AL. Detection of Telomerase Expression in Mediastinal Lymph Nodes of Patients with Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167:1670-5.
- 116 GAUTHIER LR, GRANOTIER C, SORIA JC, FAIVRE S, BOIGE V, RAYMOND E, ET AL. Detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity. *Br J Cancer* 2001, 84:631-5.
- 117 PELOSI G, SCHIANCHI E, DELL'ORTO P, VERONESI G, SPAGGIARI L, PASINI F, ET AL. Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients. *Virchows Arch* 2006, 448:7-15.
- 118 MIURA N, NAKAMURA H, SATO R, TSUKAMOTO T, HARADA T, TAKAHASHI S. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Science* 2006, 97:1366-73.
- 119 SOZZI G, CONTE D, LEON M, CIRINCIONE R, ROZ L, RATCLIFFE C, ET AL. Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2003, 21:3902-8.
- 120 ALBANELL J, LONARDO F, RUSCH V, ENGELHARDT M, LANGENFELD J, HAN W, ET AL. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1609-15.
- 121 HARA H, YAMASHITA K, SHINADA J, YOSHIMURA H, KAMEYA T. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001, 34:219-26.
- 122 TOOMEY D, SMYTH G, CONDRON C, KAY E, CONROY R, FOLEY D, ET AL. Immune function, telomerase, and angiogenesis in patients with primary, operable nonsmall cell lung carcinoma: tumor size and lymph node status remain the most important prognostic features. *Cancer* 2001, 92:2648-57.
- 123 LEE KH, RUDOLPH KL, JU YJ, GREENBERG RA, CANNIZZARO L, CHIN L, ET AL. Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *P Natl Acad Sci* 2001, 98:3381-6.
- 124 TERASHIMA M, TAKIYAMA I, UESUGI N, SASAKI N, TAKAGANE A, HAYAKAWA Y, ET AL. Telomerase assay as a possible predictor of the response to anticancer chemotherapy. *Anticancer Res* 2000, 20:293-7.
- 125 LIN Z, LIM S, VIANI MA, SAPP M, LIM MS. Down-Regulation of Telomerase Activity in Malignant Lymphomas by Radiation and Chemotherapeutic Agents. *Am J Pathol* 2001, 159:711-9.
- 126 SUN P, WEI L, LUO M, LIU G, WANG J, MUSTEA A, ET AL. The telomerase activity and expression of hTERT gene can serve as indicators in the anti-cancer treatment of human ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007, 130:249-57.

-
- 127 MITSUI A, KUWABARA Y, IWASE H, MITANI M, SHINODA N, SATO A, ET AL. Telomerase activity in esophageal squamous cell carcinoma: down-regulation by chemotherapeutic agent. *J Surg Oncol* 2002, 79:37-45.
- 128 BUTTITTA F, PELLEGRINI C, MARCHETTI A, GADDUCCI A, COSIO S, FELICIONI L, ET AL. Human Telomerase Reverse Transcriptase mRNA Expression Assessed by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Predicts Chemosensitivity in Patients With Ovarian Carcinoma. *J Clin Oncol* 2003, 21: 1320-5.
- 129 OGAWA Y, NISHIOKA A, HAMADA N, TERASHIMA M, INOMATA T, YOSHIDA S, ET AL. Changes in telomerase activity of advanced cancers of oral cavity and oropharynx during radiation therapy: correlation with clinical outcome. *Int J Mol Med* 1998, 2:301-7.
- 130 CHIU C, LI C, UNG M, FUH T, CHEN W, FANG K. Etoposide (VP-16) elicits apoptosis following prolonged G2-M cell arrest in p53-mutated human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett* 2005, 223:249-58.
- 131 CAMPS C, SIRERA R, BREMNES RM, RÓDENAS V, BLASCO A, SAFONT MJ, ET AL. Quantification in the serum of the catalytic fraction of reverse telomerase: A useful prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2006, 26:4905-9.
- 132 MARCHETTI A, PELLEGRINI C, BUTTITTA F, FALLENI M, ROMAGNOLI S, FELICIONI L, ET AL. Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. *Lab Invest* 2002, 82:729-36.
- 133 GONZÁLEZ-QUEVEDO R, INIESTA P, MORÁN A, DE JUAN C, SÁNCHEZ-PERNAUTE A, FERNÁNDEZ C, ET AL. Cooperative Role of Telomerase Activity and p16 Expression in the Prognosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2002, 20:254-62.
- 134 KOMIYA T, KAWASE I, NITTA T, YASUMITSU T, KIKUI M, FUKUOKA M, ET AL. Prognostic significance of hTERT expression in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2000, 16:1173-7.
- 135 ZHU C, CUTZ J, LIU N, LAU D, SHEPHERD FA, SQUIRE JA, ET AL. Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006, 94:1452-9.
- 136 LU C, SORIA J, TANG X, XU X, WANG L, MAO L, ET AL. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: A multivariate analysis of six molecular markers. *J Clin Oncol* 2004, 22:4575-83.
- 137 WANG L, SORIA JC, KEMP BL, LIU DD, MAO L, KHURI FR. hTERT Expression Is a Prognostic Factor of Survival in Patients with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2002, 8:2883-9.
- 138 GORDAN JD, VONDERHEIDE RH. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy* 2002, 4:317-27.
- 139 VONDERHEIDE RH. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* 2002, 21:674-9.
- 140 VONDERHEIDE RH, HAHN WC, SCHULTZE JL, NADLER LM. The Telomerase Catalytic Subunit Is a Widely Expressed Tumor-Associated Antigen Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity* 1999, 10:673-9.
- 141 MINEV B, HIPP J, FIRAT H, SCHMIDT JD, LANGLADE-DEMOYEN P, ZANETTI M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *P Natl Acad Sci* 2000, 97:4796-801.
- 142 VONDERHEIDE RH, ANDERSON KS, HAHN WC, BUTLER MO, SCHULTZE JL, NADLER LM. Characterization of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase. *Clin Cancer Res* 2001, 7:3343-8.
- 143 HUO LF, TANG JW, HUANG JJ, HUANG PT, HUANG CF, KUNG HF, ET AL. Cancer immunotherapy targeting the telomerase reverse transcriptase. *Cell Mol Immunol* 2006, 3:1-11.
- 144 DUPONT J, LATOUCHE JB, MA C, SADELAIN M. Artificial antigen presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells. *Cancer Res* 2005, 65:5417-27.
- 145 AYYOUB M, MIGLIACCIO M, GUILLAUME P, LIÉNARD D, CEROTTINI JC, ROMERO P, ET AL. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8+ T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol* 2001, 31:2642-51.

-
- 146 PARKHURST MR, RILEY JP, IGARASHI T, LI Y, ROBBINS PF, ROSENBERG SA. Immunization of patients with the hTERT:540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin Cancer Res* 2004, 10:4688-98.
- 147 SPEISER DE, CEROTTINI JC, ROMERO P. Can hTERT peptide540-548-specific T cells recognize and kill tumor cells? *Cancer Immunity* 2002, 2:14.
- 148 NAIR SK, HEISER A, BOCZKOWSKI D, MAJUMDAR A, NAOE M, LEBKOWSKI, JS, ET AL. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med* 2000, 6:1011-7.
- 149 SU Z, DANNULL J, HEISER A, YANCEY D, PRUITT S, MADDEN J, ET AL. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 2003, 63:2127-33.
- 150 SU Z, DANNULL J, YANG BK, DAHM P, COLEMAN D, YANCEY D, ET AL. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* 2005, 174:3798-807.
- 151 VONDERHEIDE RH, DOMCHEK SM, SCHULTZE JL, HOAR GDJ, CHEN KM, STEPHANS DY, ET AL. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004, 10:828-39.
- 152 BRUNSVIG PF, AAMDAL S, GJERTSEN MK, KVALHEIM G, MARKOWSKI-GRIMSRUD CJ, SVE I, ET AL. Telomerase peptide vaccination: A phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1553-64.
- 153 BOLONAKI I, KOTSAKIS A, PAPADIMITRAKI E, AGGOURAKI D, KONSOLAKIS G, VAGIA A, ET AL. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol* 2007, 25:2727-34
- 154 MASUTOMI K, KANEKO S, YASUKAWA M, ARAI K, MURAKAMI S, KOBAYASHI K. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002, 21:5946-50.
- 155 HERNANDEZ J, GARCIA-PONS F, LONE YC, FIRAT H, SCHMIDT JD, LANGLADE-DEMOYEN P, ET AL. Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:12275-80.
- 156 GROSS DA, GRAFF-DUBOIS S, OPOLON P, CORNET S, ALVES P, BENNACEUR-GRISCELLI A, ET AL. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2004, 113:425-33.
- 157 ARAI J, YASUKAWA M, OHMINAMI H, KAKIMOTO M, HASEGAWA A, FUJITA S. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2001, 97:2903-7.
- 158 SCHROERS R, SHEN L, ROLLINS L, ROONEY, CM, SLAWIN KD, SONDERSTRUP G, ET AL. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clin Cancer Res* 2003, 9:4743-55.
- 159 SCHROERS R, HUANG XF, HAMMER J, ZHANG J, CHEN SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res* 2002, 62:2600-5.
- 160 ZIMMERMANN S, MARTENS UM. Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64:906-21.
- 161 OLAUSSEN KA, DUBRANA K, DOMONT J, SPANO JP, SABATIER L, SORIA JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, 57:191-214.
- 162 MISAWA M, TAUCHI T, SASHIDA G, NAKAJIMA A, ABE K, OHYASHIKI JH, ET AL. Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int J Oncol* 2002, 21:1087-92.

-
- 163 OGRETMEN B, KRAVEKA JM, SCHADY D, USTA J, HANNUN YA, OBEID LM. Molecular Mechanisms of Ceramide-mediated Telomerase Inhibition in the A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line. *J Biol Chem* 2001, 276:32506-14.
- 164 LIU WJ, ZHANG YW, SHEN Y, JIANG JF, MIAO ZH, DING J. Telomerase inhibition is a specific early event in salvicine-treated human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 323:660-7.
- 165 CHEN Z, KOENEMAN KS, COREY DR. Consequences of Telomerase Inhibition and Combination Treatments for the Proliferation of Cancer Cells. *Cancer Res* 2003, 63:5917-25.
- 166 CUNNINGHAM AP, LOVE WK, ZHANG RW, ANDREWS LG, TOLLEFSBOL TO. Telomerase inhibition in cancer therapeutics: Molecular-based approaches. *Curr Med Chem* 2006, 13:2875-88.
- 167 LANSON JR NA, FRIEDLANDER PL, SCHWARZENBERGER P, KOLLS JK, WANG G. Replication of an Adenoviral Vector Controlled by the Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Causes Tumor-Selective Tumor Lysis. *Cancer Res* 2003, 63:7936-41.
- 168 SONG JS, KIM HP. Adenovirus-mediated HSV-TK gene therapy using the human telomerase promoter induced apoptosis of small cell lung cancer cell line. *Oncol Rep* 2004, 12:443-7.
- 169 UCHINO J, TAKAYAMA K, HARADA A, KAWAKAMI Y, INOUE H, CURIEL DT, NAKANISHI Y. Infectivity enhanced, hTERT promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for SCLC treatment. *Cancer Gene Ther* 2005, 12:737-48.
- 170 GU J, KAGAWA S, TAKAKURA M, KYO S, INOUE M, ROTH JA, ET AL. Tumor-specific Transgene Expression from the Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Enables Targeting of the Therapeutic Effects of the Bax Gene to Cancers. *Cancer Res* 2000, 60:5359-64.
- 171 CARPENTER EL, VONDERHEIDE RH. Telomerase-based immunotherapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006, 6:1031-9.
- 172 SORIA JC, MOON C, WANG L, HITTELMAN WN, JANG SJ, SUN SY, ET AL. Effects of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide on hTERT Expression in the Bronchial Epithelium of Cigarette Smokers. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:1257-63.
- 173 CHIN, L, ARTANDI SE, SHEN Q, TAM A, LEE SL, GOTTLIEB GJ, ET AL. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999, 97:527-38.
- 174 MAXWELL SA, CAPP D, ACOSTA SA. Telomerase activity in immortalized endothelial cells undergoing p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 241:642-5.
- 175 HIYAMA K, ISHIOKA S, SHIROTANI Y, INAI K, HIYAMA E, MURAKAMI I, ET AL. Alteration in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. *Oncogene* 1995, 10:937-44.
- 176 MANIWA Y, YOSHIMURA M, OBAYASHI C, INABA M, KIYOOKA K, KANKI M, ET AL. Association of p53 Gene Mutation and Telomerase Activity in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Chest* 2001, 120:589-94.
- 177 KIYOOKA K, MANIWA Y, OKADA M. Analysis of mutant p53 and telomerase activity in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 1999, 5: 293-9.
- 178 WU X, KEMP B, AMOS CI, HONN SE, ZHANG W, WALSH GL, ET AL. Associations among telomerase activity, p53 protein overexpression, and genetic instability in lung cancer. *Br J Cancer* 1999, 80:453-7.
- 179 OHMURA Y, AOE M, ANDOU A, SHIMIZU N. Telomerase Activity and Bcl-2 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6:2980-7.
- 180 MANDAL M, KUMAR R. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 1997, 272:14183-7.
- 181 DRISSI R, ZINDY F, ROUSSEL MF, CLEVELAND JL. c-Myc-mediated Regulation of Telomerase Activity Is Disabled in Immortalized Cells. *J Biol Chem* 2001, 276:29994 - 30001.
- 182 CERNI C. Telomeres, telomerase and myc. An update. *Mutat Res* 2000, 462:31-47.

-
- 183 CASILLAS MA, BROTHERTON SL, ANDREWS LG, RUPPERT JM, TOLLEFSBOL TO. Induction of endogenous telomerase (hTERT) by c-Myc in WI-38 fibroblasts transformed with specific genetic elements. *Gene* 2003, 316:57-65.
- 184 LATIL A, VIDAUD D, VALERI A, FOURNIER G, VIDAUD M, LIDEREAU R, ET AL. htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2000, 89:172-6.
- 185 KIRKPATRICK KL, OGUNKOLADE W, ELKAK AE, BUSTIN S, JENKINS P, GHILCHICK M, ET AL. hTERT expression in human breast cancer and non-cancerous breast tissue: correlation with tumour stage and c-Myc expression. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 77:277-84.
- 186 GENG Z, ZHANG D, LIU Y. Expression of telomerase hTERT in human non-small cell lung cancer and its correlation with c-Myc gene. *Chinese Med J (Engl)* 2003, 116:1467-70.
- 187 LIGGETT WH, SIDRANSKY D. Role of the *p16* tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16:1197-206.
- 188 KIYONO T, FOSTER SA, KOOP JI, MCDUGALL JK, GALLOWAY DA, KLINGELHUTZ AJ. Both Rb/p16^{INK4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998, 396:84-8.
- 189 GROEGER AM, CAPUTI M, ESPOSITO V, DE LUCA A, BAGELLA L, PACILIO C, ET AL. Independent prognostic role of *p16* expression in lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999, 118:529-35.
- 190 ZIMMERMANN SV, BENIGNI F, MONDINO A. Immune surveillance and anti-tumor immune responses an anatomical perspective. *Immunol Lett* 2005, 98:1-8.
- 191 DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H, OLD LJ, SCHREIBER RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002, 3:991-8.
- 192 DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004, 22:329-60.
- 193 SCHREIBER RD. Cancer Vaccines 2004 opening address: The molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immunity* 2005, 5 (Suppl 1):1-8.
- 194 GERMENIS AE, KARANIKAS V. Immunoepigenetics: the unseen side of cancer immunoediting. *Immunol Cell Biol* 2007, 85:55-9.
- 195 CASTELLI C, DALERBA P, CASATI C, NOVELINO L, PARMIANI G, FILIPPO DE. A Immune mechanisms in neoplasia. *Drug Discov Today: Disease Mechanisms* 2004, 1:375-81.
- 196 GARRIDO F, ALGARRA I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Ad Cancer Res* 2001, 83:117-58.
- 197 MOCCELLIN S, MANDRUZZATO S, ZANOVELLO P, BRONTE V. Cancer rejection by the immune system: Forcing the check-points of tumor immune escape. *Drug Discov Today: Disease Mechanisms* 2005, 2: 191-7.
- 198 UROSEVIC M, DUMMER R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer—different stories with the same message. *Semin Cancer Biol* 2003, 13:337-42.
- 199 BRONTE V, CINGARLINI S, MARIGO I, DE SANTO C, GALLINA G, DOLCETTI L, ET AL. Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention. *Immunol Invest* 2006, 35:327-57.
- 200 OWEN-SCHAUB LB. Fas function and tumor progression: Use it and lose it. *Cancer Cell* 2002, 2:95-6.
- 201 ANDREOLA G, RIVOLTINI L, CASTELLI C, HUBER V, PEREGO P, DEHO P, ET AL. Induction of lymphocytes apoptosis by tumour cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002, 195:1303-16.
- 202 SMYTH MJ, GODFREY DI, TRAPANI JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature immunol* 2001, 2:293-9.
- 203 SALOMON B, BLUESTONE, JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001, 19:225-52.
- 204 EDINGER AL, THOMPSON CB. Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:1107-9.

-
- 205 BRONTE V, SERAFINI P, MAZZONI A, SEGAL D, ZANOVELLO P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T- lymphocyte functions *Trends Immunol* 2003, 24:302-30.
- 206 ANGELINI G, GARDELLA S, ARDY M, CIRIOLO MR, FILOMENI G, DI TRAPANI G, ET AL. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:1491-6.
- 207 MELLOR A, MUNN D. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Rev Immun Today* 1999, 20:469-73.
- 208 UYTENHOVE C, PILOTTE L, THEATE I, STROOBANT V, COLAU D, PARMENTIER N, ET AL. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Med* 2003, 9:1269-74.
- 209 MELLOR A, MUNN D. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004, 4:762-74.
- 210 MULLER A J, DUHADAWAY JB, DONOVER PS, SUTANTO-WARD E, PRENDERGAST GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Med* 2005, 11:312-9.
- 211 HWU P, DU M, LAPOINTE R, DO M, TAYLOR M, YOUNG H. Indoleamine 2,3- dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T cell Proliferation. *J Immunol* 2000, 164:3596-9.
- 212 MELLOR L, KESKIN B, JOHNSON T, CHANDLER P, MUNN DH. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 2002, 168:3771-6.
- 213 TONE S, TAKIKAWA O, HABARA-OHKUBOL A, KADOYA A, YOSHIDA R, KIDO R. Primary structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. *Nucleic Acids Res* 1989, 18:367
- 214 TERENTIS AC, THOMAS SR, TAKIKAWA O, LITTLEJOHN TK, TRUSCOTT RJ, ARMSTRONG RS, ET AL. The Heme Environment of Recombinant Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase structural properties and substrate-ligand interactions. *J Biol Chem* 2002, 277:15788-94.
- 215 LITTLEJOHN KT, TAKIKAWA O, TRUSCOTT JWR, WALKER JM. Asp274 and His346 are essential for heme binding and catalytic function of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 2003, 278:29525-31.
- 216 SUGIMOTO H, ODA S, OTSUKI T, HINO T, YOSHIDA T, SHIRO Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 2006, 103:2611-6.
- 217 BURKIN DJ, KIMBRO KS, BARR BL, JONES C, TAYLOR MW, GUPTA SL. Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics* 1993, 17:262-3.
- 218 NAJFELD V, MENNINGER J, MUHLEMAN D, COMINGS DE, GUPTA, SL. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase gene (INDO) to chromosome 8p12-p11 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1993, 64:231-2.
- 219 PFEFFERKORN ER. Interferon- γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:908-12.
- 220 ROTTENBERG ME, GIGLIOTTI ROTHFUCHS A, GIGLIOTTI D, CEASU M, UNE C, LEVITSKY V, ET AL. Regulation and role of IFN- γ in the innate resistance to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 2000, 164:4812-8.
- 221 POTULA R, POLUEKTOVA L, KNIPE B, CHRASTIL J, HEILMAN D, DOU H, ET AL. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. *Blood* 2005, 106:2382-90.
- 222 ADAMS O, BESKEN K, OBERDORFER C, MACKENZIE CR, TAKIKAWA O, DAUBENER W. Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Alpha/Beta and Gamma Interferon-Mediated Antiviral Effects against Herpes Simplex Virus Infections. *J Virol* 2004, 78:2632-6.

-
- 223 BABCOCK TA, CARLIN JM. TRANSCRIPTIONAL activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor α in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 2000, 12:588-94.
- 224 TAYLOR MW, FENG G. Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 1991, 5:2516-22.
- 225 FUJIGAKI S, SAITO K, SEKIKAWA K, TONE S, TAKIKAWA O, FUJII H, ET AL. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism. *Eur J Immunol* 2001, 31:2313-8.
- 226 DAI W, GUPTA S. Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon gamma-inducible indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA. *J Biochem Biophys Res Commun* 1990, 168:1-8.
- 227 MELLOR A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Bioch Bioph Res Com* 2005, 338:20-4.
- 228 MUNN DH, ZHOU M, ATTWOOD JT, BONAREV I, CONWAY SJ, MARSHALL B, ET AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998, 281:1191-3.
- 229 MELLOR AL, SIVAKUMAR J, CHANDLER P, SMITH K, MOLINA H, MAO D, ET AL. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol* 2001, 2:64-8.
- 230 MIKI T, SUN H, LEE Y, TANDIN A, KOVSCEK AM, SUBBOTIN V, ET AL. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc* 2001, 33:129-30.
- 231 ALEXANDER AM, CRAWFORD M, BERTERA S, RUBERT WA, TAKIKAWA O, ROBBINS PD, ET AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 2002, 51:356-65.
- 232 HAINZ U, OBEXER P, WINKLER C, SEDLMAYR P, TAKIKAWA O, GREINIX H, ET AL. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2005, 105:4127-34.
- 233 BRANDACHER G, CAKAR F, WINKLER C, SCHNEEBERGER S, OBRIST P, BOSMULLER C, ET AL. Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation. *Kidney Int* 2007, 71:60-7.
- 234 FALLARINO F, GROHMANN U, VACCA C, BIANCHI R, ORABONA C, SPRECA A, ET AL. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002, 9:1069-77.
- 235 TERNESS P, BAUER TM, ROSE L, DUFTER C, WATZLIK A, SIMON H, ET AL. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002, 19:447-57.
- 236 BRANDACHER G, PERATHONER A, LADURNER R, SCHNEEBERGER S, OBRIST P, WINKLER C, ET AL. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 2006, 12:1144-51.
- 237 OKAMOTO A, NIKAIKO T, OCHIAI K, TAKAKURA S, SAITO M, AOKI Y, ET AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005, 11:6030-9.
- 238 TRAVERS MT, GOW IF, BARBER MC, THOMSON J, SHENNAN DB. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1661:106-12.
- 239 INO K, YOSHIDA N, KAJIYAMA H, SHIBATA K, YAMAMOTO E, KIDOKORO K, ET AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 2006, 95:1555-6.
- 240 ISHIO T, GOTO S, TAHARA K, TONE S, KAWANO K, KITANO S. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004, 19:319-26.
- 241 ASTIGIANO S, MORANDI B, COSTA R, MASTRACCI L, D'AGOSTINO A, RATTO BG, ET AL. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 2005, 7:390-6.

-
- 242 FRIBERG M, JENNINGS R, ALSARRAJ M, DESSUREAULT S, CANTOR A, EXTERMANN M, ET AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection *Int J Cancer* 2002, 101:151–5.
- 243 MUNN DH, SHARMA DM, HOU D, BABAN B, LEE RJ, SCOTT JA, ET AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumour-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004, 114:280-90.
- 244 MUNN DH, MELLOR AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007, 117:1147–54.
- 245 ZAMANAKOU M, GERMENIS AE, KARANIKAS V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett* 2007, 15:69-75.
- 246 ZOU W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5:263-74.
- 247 KUDO Y, BOYD C, SARGENT I, REDMAN CWG. Tryptophan Degradation By Human Placental Indoleamine 2,3-Dioxygenase Regulates Lymphocyte Proliferation. *J Physiol* 2001, 535:207–15.
- 248 SEYMOUR RL, GANAPATHY V, MELLOR AL, MUNN DH. A high-affinity, tryptophanselective amino acid transport system in human macrophages. *J Leukoc Biol* 2006, 80:1320-7.
- 249 MUNN D, SHARMA M, BABAN B, HARDING H, ZHANG Y, RON D, ET AL. GCN2 kinase in T Cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* 2005, 22:633–42.
- 250 WEBER W, FEDER-MENGUS C, CHIARUGI A, ROSENTHAL R, RESCHNER A, SCHUMACHER R, ET AL. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8+ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *Eur J Immunol* 2006, 36:296-304.
- 251 MUNN D, MELLOR A. IDO and tolerance to tumors. *Trends Mol Med* 2004, 10:15–8.
- 252 MELLOR A, MUNN D. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 2003, 170:5809-13.
- 253 STEINMAN R, NUSSENZWEIG M. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99:351-8.
- 254 FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG K, ORABONA C, VACCA C, BIANCHI R, ET AL. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, 4:1206-12.
- 255 MONTAGNOLI C, FALLARINO F, GAZIANO R, BOZZA S, BELLOCCHIO S, ZELANTE T, ET AL. Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J Immunol* 2006, 176:1712-23.
- 256 WOO E, CHU C, GOLETTZ T, SCHLIENGER K, YEH H, COUKOS G, ET AL. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer *Cancer Res* 2001, 61:4766–72.
- 257 CURIEL T, COUKOS G, ZOU L, ALVAREZ X, CHENG P, MOTTRAM P ET AL. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004, 10:942-8.
- 258 GROHMANN U, ORABONA C, FALLARINO F, VACCA C, CALCINARO F, FALORNI A, ET AL. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002, 3:1097-101.
- 259 BOASSO A, HERBEUVAL JP, HARDY A, WINKER C, SHEARER G. Regulation of indoleamine 2,3 dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Immunobiology* 2005, 105:1574-82.
- 260 GROHMANN U, PUC CETTI P. CTLA-4, T helper lymphocytes and dendritic cells: an internal perspective of T-cell homeostasis. *Trends Mol Med* 2003, 9:133-5.
- 261 KAI S, GOTO S, TAHARA K, SASAKI A, TONEY S AND KITANO S. Indoleamine 2,3-Dioxygenase is Necessary for Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. *Scand J Immunol* 2004, 59:177–82.

-
- 262 KAI S, GOTO S, TAHARA K, SASAKI A, KAWANO K, KITANO S. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth. *J Exp Ther Oncol* 2003, 3:336–45.
- 263 LI Y, TREDGET EE, GHAHARY A. Cell surface expression of MHC Class I antigen is suppressed in indoleamine 2,3-dioxygenase genetically modified keratinocytes: Implications in allogeneic skin substitute engraftment. *Hum Immunol* 2004, 65:114–23.
- 264 URADE, Y, YOSHIDA R, KITAMURA H, HAYAISHI O. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in alveolar interstitial cells of mouse lung by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1983, 258:6621–7.
- 265 YOSHIDA R, URADE Y, TOKUDA M, HAYAISHI O. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76:4084–6.
- 266 MEYER KC, AREND RA, KALAYOGLU MV, ROSENTHAL NS, BYRNE GI, BROWN RR. Tryptophan metabolism in chronic inflammatory lung disease. *J Lab Clin Med* 1995, 126:530–40.
- 267 HAYASHI T, BECK L, ROSSETTO C, GONG X, TAKIKAWA O, TAKABAYASHI K, ET AL. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2004, 114:270–9.
- 268 LIU H, LIU L, FLETCHER BS, VISNER GA. Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB J* 2006, 20:2384–6.
- 269 SWANSON K, ZHENG Y, HEILDER K, MIZOBUCHI T, WILKES D. CD11c+ Cells modulate pulmonary immune responses by production of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, 30:311–8.
- 270 YASUI H, TAKAI K, YOSHIDA R, HAYAISHI O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: Its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:6622–6.
- 271 KARANIKAS V, LURQUIN C, COLAU D, VAN BAREN N, DE SMET C, LETHE B, 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.
- 272 COULIE P, KARANIKAS V, LURQUIN C, COLAU D, CONNEROTTE T, HANAGIRI T, ET AL. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* 2002, 188:33–42.
- 273 VICARI AP, CAUX C AND TRINCHIERI G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 2002, 12:33–42.
- 274 CADY SG, SONO M. 1-Methyl-DL-tryptophan, β -(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and β -(3-benzo(b)thienyl)-DL-alanine (the sulphur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 1991, 291:326–33.
- 275 HOU DY, MULLER AJ, SHARMA MD, DUHADAWAY J, BANERJEE T, JOHNSON M, ET AL. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1- methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 2007, 67:792–801.
- 276 GURTNER GJ, NEWBERRY RD, SCHLOEMANN SR, McDONALD KG, STENSON WF. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 2003, 125:1762–73.
- 277 MEZENCEV R, MOJZIS J, PILATOVA M, KUTSCHY P. Antiproliferative and cancer chemopreventive activity of phytoalexins: Focus on indole phytoalexins from crucifers. *Neoplasma* 2003, 50:239–45.
- 278 VOTTERO E, BALGI A, WOODS K, TUGENDREICH S, MELESE T, ANDERSEN RJ, ET AL. Inhibitors of human indoleamine 2,3-dioxygenase identified with a target-based screen in yeast. *Biotechnol J* 2006, 1:282–8.
- 279 MULLER AJ, PRENDERGAST GC. Marrying Immunotherapy with Chemotherapy: Why Say IDO? *Cancer Res* 2005, 65:8065–8.
- 280 MUNN D. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol* 2006, 18:1–6.
- 281 PFAFFL M. Quantification strategies in real-time PCR In: A-Z of quantitative PCR Chapter 3, Edit. S.A. Bustin, IUL, CA, USA.

-
- 282 DENG Y, CHANG S. Role of Telomeres and Telomerase in Genomic Instability, Senescence and Cancer. *Lab Invest* 2007, 87:1071-6.
- 283 RAMI-PORTA R, BALL D, FJ CROWLEY, GIROUX DJ, JETT J, TRAVIS W, ET AL. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the T Descriptors in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2007, 2:593-602.
- 284 ALEGRE E, DIAZ A, LOPEZ S, URIZ M, MURILLO O, MELERO I, ET AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase: from tolerance during pregnancy to cancer. *Immunologia* 2005, 24:362-9.
- 285 KARANIKAS V, TSOHAS S, BOUKAS K, KERENIDI T, NAKOU M, DAHABREH J, ET AL. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2007, 7: (Epub ahead of print)