ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

CD8 Τ-κυτταρική απάντηση έναντι των αντιγόνων της Σαρβιβίνης και της τελομεράσης στον καρκίνο του πνεύμονα

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΦΩΤΕΙΝΗ Β. ΣΟΥΚΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Νόμος 5343/1232, άρθρο 202, παρ. 2).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής
Καθηγητής Ανοσολογίας
(επιβλέπων)

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης
Καθηγητής Πνευμονολογίας

Γεώργιος Νταλέκος
Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής
Καθηγητής Ανοσολογίας

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης
Καθηγητής Πνευμονολογίας

Γεώργιος Νταλέκος
Καθηγητής Παθολογίας

Παπανδρέου Χρήστος
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Πετεινάκη Ευθυμία
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Σπελέτας Ματθαίος
Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

Δανιήλ Ζωή
Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Στην οικογένεια μου,

Στην Μάρω

Στους φίλους μου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ 9
ΠΡΟΛΟΓΟΣ 11
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ 15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 17
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 19
1.1 Ανοσοεπιτηρηση και ανοσοδιαμορφωση του καρκινου 21
1.1.1 Ανοσοεπιτηρηση 21
1.1.2 Ανοσοδιαμορφωση 23
1.2 Η μνημονικη CD8 Τ-κυτταρολυτικη απαντηση εναντι των ογκων 28
1.2.1 Η αναπτυξη και τα χαρακτηριστικα της Τ-κυτταρικης ανοσιακης μνημης 28
1.2.2 Οι υποπληθυσμοι των μνημονικων CTLs 29
1.2.3 Μοντελα διαφοροποιησης των CTLs 32
1.2.4 Τ-κυτταρικη μνημη και χρονια αντιγονικη διεγερση 36
1.3 Η σαρβιβινη ως αντιγονο των ογκων 38
1.4 Η τελομεραση ως αντιγονο των ογκων 42
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 49
2 ΥΛΙΚΟ 51
2.1 Ασθενεις και Υγιεις Δοτες 53
2.2 Πεπτιδια και HLA-πολυμερη 54
2.3 Καρκινικες γραμμες και EBV μετασχηματισμενα Β κυτταρα 55
2.4 Ορος 56
2.5 Αναλωσιμα υλικα 56
3 ΜΕΘΟΔΟΙ 63
3.1 Παρασκευη ορου απο πλασμα 67
3.2 Απομονωση Μονοπυρηνων κυτταρων του Περιφερικου Αιματος 68
3.3 Ψυξη κυτταρων 68
3.4 Ψυξη κυτταρων ως ιζημα 69
3.5 Αποψυξη Κυτταρων 69
3.6 TILS 69
3.7 Καλλιεργεια καρκινικων γραμμων και EBV Β κυτταρων 69
3.8 Ακτινοβοληση Καρκινικων Γραμμων και EBV Β Κυτταρων 70
3.9 Προσδιορισμος αντιγονοειδικων Τ-κυτταρων 71
3.9.1 Μικτη λεμφοκυτταρικη καλλιεργεια (MLPCs) 72
3.9.2 Κυτταρομετρικη αναλυση 74
3.9.3 Προσδιορισμος της πραγματικης συχνοτητας ειδικων κυτταρολυτικων κλωνων 77

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.10 Καλλιεργεια και αναπτυξη CD8 T γραμμων 77
3.11 Απομονωση CD8 κλωνων 79
3.12 Καλλιεργεια CD8 T κλωνων 81
3.13 Αναλυση του ειδικου υποδοχεα των CD8 T κλωνων 84
3.13.1 Εκχυλιση RNA και συνθεση cDNA 84
3.13.2 Αναλυση του TCR με PCR 85
3.13.3 Αναλυση του TCR με κυτταρομετρια ροης 88
3.14 Φαινοτυπικος Χαρακτηρισμος CD8 T Κυτταρων 88
3.14.1 Σχεδιασμος Πρωτοκολλου Κυτταρομετριας Ροης 88
3.14.2 CD8 T Κλωνοι 91
3.14.3 CD8 T γραμμες 91
3.15 Λειτουργικη αναλυση CD8 T Κλωνων 92
3.15.1 Προσδιορισμος Κυτταροκινων – Ενδοκυτταρια Χρωση 92
3.15.2 Προσδιορισμος Κυτταροκινων - Μικροσφαιριδιακη Κυτταρομετρια 93
3.15.3 Λυτικη Ικανοτητα 94
3.15.4 Συγγενεια του TcR 96
3.16 Στατιστικη αναλυση 96
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 97
4.1 Συχνοτητα CD8 T-κυτταρων ειδικων για πεπτιδια της σαρβιβινης και της τελομερασης 99
4.2 Συχνοτητα ειδικων CD8 T-κυτταρων εναντι ιικων πεπτιδιων 107
4.3 Επιδραση της θεραπειας στην συχνοτητα ανιχνευσης ειδικων pCTLs 108
4.4 Φαινοτυπικος χαρακτηρισμος των CD8 T- γραμμων 108
4.5 Φαινοτυπικος χαρακτηρισμος των CD8 κλωνων 112
4.5.1 Φαινοτυπικος χαρακτηρισμος CD8 T κλωνων 113
4.5.2 Αναλυση TCR 114
4.6 Λειτουργικος χαρακτηρισμος των CD8 κλωνων 116
4.6.1 Προσδιορισμος κυτταροκινων 116
4.6.2 Λυτικη ικανοτητα 117
4.6.3 Συγγενεια του TCR 117
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 121
5.1 Συχνοτητα αντιγονοειδικων CTLs 123
5.2 Λειτουργικοτητα των αντιγονοειδικων κυτταρων 130
5.3 Συμπερασμα 132
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 135
ABSTRACT 137
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 139
7 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ 153

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:	Φωτεινή Σούκου του Βασιλείου
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	25 Φεβρουαρίου 1982
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	Λάρισα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:	Άγαμη
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ:	Νικηταρά 56-58 – 41223 Λάρισα
	Τηλ.: 2410-551596 – Κιν.: 6945-536383
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας – 411 10 Λάρισα
	Τηλ.: 241350-2579 – Fax: 241350-2580
	E-mail: soukoufaye@gmail.com
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:	Αγγλικά (άριστα), Γαλλικά (καλά)

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

1998 Bachelor of Science (BSc) in Biomedical Sciences, School of Life Sciences, Kingston University of South West London, UK

2004 Postgraduate Diploma in Medical Genetics with Immunology, School of Health Sciences, Brunel University, West London, UK

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, **SOUKOU F**, KERENIDI T, TSOUGOS I, THEODOROU K, GEORGOULIAS P, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Cytolytic T-cell response against Epstein-Barr virus in lung cancer patients and healthy subjects. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, 29(1): 64
2. KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, **SOUKOU F**, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Naturally occurring tumor-specific CD8+ T-cell precursors in individuals with and without cancer. *Immunol Cell Biol* 2010, 88: 575-85
3. KARANIKAS V, **SOUKOU F**, KALALA F, KERENIDI T, GRAMMOUSTIANOU ES, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Baseline levels of CD8+ T-cells against survivin and survivin-2B in the blood of lung cancer patients and cancer-free individuals. *Clinical Immunology 2008*, Nov; 129(2): 230-40

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, **SOUKOU F**, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Tumour specific CD8+ T-cells in patients with lung cancer and healthy individuals. *Journal of B.U.ON* 2009, 14:S153-S157
2. KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, **SOUKOU F**, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Low-frequency CD8+T cell precursors specific for surviving and surviving-2B in cancer patients: A caveat for immunotherapy. *Cell Oncol* 2008, 30:134
3. KARANIKAS V, **SOUKOU F**, ZAMANAKOU M, KALALA F, GRAMMOUSTIANOU E, 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. *Cell Oncol* 2008, 30:134

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΖΑΜΑΝΑΚΟΥ Μ, **ΣΟΥΚΟΥ Φ,** ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Age-related alterations of anti-tumor specific cytotoxic $CD8^+$ T cells. *5ο Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας*, Αθήνα 2009
2. KARANIKAS V, ZAMANAKOY M, **SOUKOU F,** KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Age-related alterations of anti-tumor specific cytotoxic $CD8^+$ T cells. *Recent Advances in Cancer Immunotherapy with an Emphasis on Vaccines,* Αθήνα 2008
3. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, **ΣΟΥΚΟΥ Φ**, ΖΑΜΑΝΑΚΟΥ Μ, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΓΡΑΜΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ CD8 Τ- κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα. *Καρκίνος Πνεύμονα*, Κέρκυρα 2008
4. 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? *8th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy,* Berlin 2008
5. 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-κύτταρα in patients with lung cancer and cancer free individuals. *International Society for Cellular Oncology Congerss (ISCO 2008)*, Amsterdam 2008
6. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, **ΣΟΥΚΟΥ Φ**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Ποσοτική και λειτουργική μελέτη ειδικών έναντι αντιγόνων των όγκων (TAA) CD8 Τ-κυτταρικών (CTL) κλώνων στον καρκίνο του πνεύμονα. *16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος,* Αθήνα 2007
7. ΓΡΑΜΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, **ΣΟΥΚΟΥ Φ**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΧΕΒΑΣ Α, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ CD8 Τ-κυτταρικές (CTL) απαντήσεις έναντι ευρέως εκφραζόμενων αντιγόνων των όγκων (TAA) στον καρκίνο του πνεύμονα. *15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος,* Κρήτη 2006
8. ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΓΡΑΜΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, **ΣΟΥΚΟΥ Φ**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, , ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β Ειδικές CD8 Τ-κυτταρικές (CTL) απαντήσεις έναντι αντιγόνων σαρβιβίνη και MAGE στον καρκίνο του πνεύμονα. *Ημέρες Πνευμονολογίας,* Λάρισα 2006
9. ΓΡΑΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, **ΣΟΥΚΟΥ Φ**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΧΕΒΑΣ Α, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β Αντι-hTERT CD8 Τ-κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα, *4ο Πανελλήνιο συνέδριο κυτταρομετρίας.* Σαντορίνη 2006
10. ΓΙΑΝΝΑΚΗ Ε, ΑΝΑΛΑΤΟΣ Α, **ΣΟΥΚΟΥ Φ**, ΝΤΑΛΕΚΟΣ ΓΝ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Πρώτη αξιολόγηση της μικροσφαιριδιακής κυτταρομετρικής μεθοδολογίας στον προσδιορισμό αντισωμάτων για την διάγνωση της κοιλιοκάκης. *3ο Πανελλήνιο συνέδριο βιοπαθολογίας*, Θεσσαλονίκη 2004

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου είχε προταθεί και εφαρμοστεί ως μέθοδος αντιμετώπισης της νόσου, πολύ πριν υπάρξουν ερευνητικές ενδείξεις για την ανοσιακή απάντηση έναντι των όγκων ή, για την ακρίβεια, πολύ πριν ακόμη και από τη στοιχειώδη περιγραφή των πρώτων αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού που ανακαλύφθηκαν. Η επιτυχής αντιμετώπιση μιας σειράς όγκων, από τον αμερικανό χειρουργό WB Coley, το 1893, με τη χρήση ενοφθαλμισμών ορού ασθενών με ερυσίπελας, ουσιαστικά δηλαδή ορού πλούσιου σε TNF, θεωρείται ιστορικά η πρώτη προσπάθεια ανοσοθεραπείας του καρκίνου [1].

Μετά από τα μέσα του περασμένου αιώνα, συγκεντρώθηκαν πειστικές ερευνητικές ενδείξεις ότι ο οργανισμός κινητοποιεί ένα πλήθος ανοσιακών μηχανισμών που στρέφονται έναντι των καρκινικών κυττάρων. Οι ενδείξεις αυτές αποτέλεσαν ικανή επιστημονική βάση για μια προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου, βασιζόμενη στην τροποποίηση αυτών των μηχανισμών, σε βαθμό που να καταστούν κλινικά αποτελεσματικοί για την καταπολέμηση των όγκων. Στις μέχρι σήμερα προσπάθειες ανοσοθεραπείας του καρκίνου έχουν χρησιμοποιηθεί κυριολεκτικά όλοι οι παράγοντες και οι μηχανισμοί του ανοσιακού συστήματος, για τους οποίους υπάρχει έστω και η παραμικρή πειραματική ένδειξη ότι εμπλέκονται στην έναντι των όγκων ανοσιακή απάντηση. Παρά ταύτα, η κλινική αποτελεσματικότητα αυτών των προσεγγίσεων παραμένει εξαιρετικά μικρή έως απογοητευτική, φθάνοντας μόλις στο 10—15% [2]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει άμεσα ότι ο δρόμος για την κατανόηση της έναντι των όγκων ανοσιακής απάντησης είναι ακόμη μακρύς.

Οι δραστικοί μηχανισμοί του ανοσιακού συστήματος, οι μηχανισμοί δηλαδή της τελικής φάσης της ανοσιακής απάντησης, που μεσολαβούν και έχει δειχθεί ότι *in vitro* επιτυγχάνουν τη λύση των καρκινικών κυττάρων, έχουν προσελκύσει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον των ερευνητών. Ειδικότερα, όσον αφορά την παρούσα μελέτη, έχει δειχθεί ότι η ανοσοθεραπεία με τη χρήση πεπτιδίων αντιγόνων των όγκων επάγει τη δημιουργία ειδικών $CD8^+$ κυτταρολυτικών Τ-κυττάρων, ικανών να προκαλούν *in vitro* λύση των καρκινικών κυττάρων. Οι λόγοι, για τους οποίους αυτή η ειδική κυτταρολυτική απάντηση δεν συνοδεύεται από ανάλογη κλινική αποτελεσματικότητα, αποτελεί αντικείμενο σημαντικού προβληματισμού και μελέτης.

Ο κύριος όγκος της έρευνας σχετικά με την έναντι των όγκων $CD8^+$ Τ-κυτταρολυτική απάντηση έχει γίνει στο πλαίσιο ελέγχου της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας. Συγκεκριμένα, στόχος της ανοσοθεραπείας είναι να προκαλέσει τον πολλαπλασιασμό των έναντι των όγκων $CD8^+$ Τ-κυτταρολυτικών κλώνων, σε επίπεδο που να είναι ικανοί να προκαλέσουν *in vivo* καταστροφή των όγκων. Έτσι, οι περισσότερες από τις μελέτες της βιβλιογραφίας αποσκοπούν να δείξουν την επαγωγή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

αυτής ακριβώς της αύξησης της CD8⁺ Τ-κυτταρολυτικής απάντησης που προκαλεί η χρήση των αντιγόνων των όγκων.

Μέχρι πρότινος, βέβαια, η μελέτη των αντιγονοειδικών Τ-κυττάρων, γενικώς και ιδιαίτερα εκείνων που απαντώνται σε πολύ χαμηλές συχνότητες, όπως αυτά που στρέφονται έναντι πεπτιδίων των αντιγόνων των όγκων, αντιμετώπιζε σημαντικά μεθοδολογικά προβλήματα. Η τεχνολογία των HLA-πολυμερών, που περιγράφηκε το 1996 [3], επέτρεψε για πρώτη φορά τον άμεσο προσδιορισμό των κυκλοφορούντων αντιγονοειδικών Τ-κυττάρων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη λεπτομερή μελέτη τόσο της Τ-κυτταρικής απάντησης έναντι των λοιμώξεων, όσο και της δραστικής διαφοροποίησης (effective differentiation) των Τ-κυττάρων [4]. Με τη χρήση της ίδιας τεχνολογίας και στη βάση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη των λοιμώξεων, επιτεύχθηκε η πληρέστερη κατανόηση των κυτταρολυτικών Τ-κυτταρικών απαντήσεων έναντι καρκινικών αντιγόνων [5], στο βαθμό που κατέστη πλέον εφικτός, τόσο ο ποσοτικός προσδιορισμός των σχετικών Τ-κυτταρικών υποπληθυσμών, όσο και και η απομόνωση και η διερεύνηση των αντίστοιχων κλώνων.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, η παρούσα ερευνητική προσπάθεια σχεδιάστηκε με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό και τη λειτουργική μελέτη των, ειδικών έναντι πεπτιδίων δύο συγκεκριμένων, ευρέως εκφραζομένων αντιγόνων των όγκων, της σαρβιβίνης (και του υποτύπου της 2B) και της hTERT, CD8⁺ Τ-κυτταρολυτικών κλώνων, που κυκλοφορούν στο αίμα πρωτοδιαγνωσμένων ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ή ανιχνεύονται στο περιβάλλον των αντίστοιχων όγκων. Για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, η σχετική μελέτη έγινε, σε τόσο μεγάλο δείγμα, με τη χρήση μιας προηγμένης εκδοχής της τεχνολογίας των HLA-πολυμερών, καθώς και άλλων το ίδιο λεπτομερών μεθοδολογιών, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Για πρώτη φορά, επίσης, τα αποτελέσματα του ποσοτικού και ποιοτικού χαρακτηρισμού των έναντι πεπτιδίων αντιγόνων των όγκων CD8⁺ Τ-κυτταρολυτικών κλώνων που εντοπίζονται στην κυκλοφορία των καρκινοπαθών, συγκρίνονται με εκείνα της ίδιας ακριβώς μελέτης των αντίστοιχων κυτταρολυτικών κλώνων που ανιχνεύονται στο αίμα υγιών ατόμων. Τέλος, στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης που ενδεχομένως έχει, πάνω στους αντιγονοειδικούς CD8⁺ Τ-κυτταρολυτικούς κλώνους, η θεραπεία της νόσου (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία). Με αυτό τον τρόπο, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν πληροφορίες σημαντικές, όχι μόνο σε σχέση με την αποτελεσματικότητα της ενδεχόμενης ανοσοθεραπείας αλλά, πολύ περισσότερο, αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των έναντι πεπτιδίων αντιγόνων των όγκων CD8⁺ Τ-κυτταρολυτικών κλώνων που προϋπάρχουν στον οργανισμό των υγιών ατόμων και είναι επιφορτισμένα με την ανοσοεπιτήρηση (immunosurveillance) των όγκων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Ευχαριστίες

Η μελέτη αυτή υλοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος IRTALUNG, και σε υλικό ασθενών που παραχωρήθηκε από την Πνευμονολογική Κλινική του ίδιου Τμήματος, οι γιατροί της οποίας είχαν την ευθύνη της συλλογής του και μας παραχώρησαν, επίσης, όλες τις κλινικές πληροφορίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Στο σημείο αυτό, θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής μου Καθηγητή κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή, καθώς και στα άλλα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Κ.Ι. Γουργουλιάνη και κ. Γ. Νταλέκο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Βάιο Καρανίκα, EU Marie Curie Fellow στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, ο οποίος με δίδαξε και με καθοδήγησε ακούραστα σε όλα τα βήματα αυτής της ερευνητικής μου προσπάθειας. Χωρίς τη βοήθεια του, η ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήταν αδύνατη.

Η έρευνα αυτή, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των πειραμάτων, δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη σημαντική τεχνική υποστήριξη πολλών ανθρώπων. Στη γιατρό της Πνευμονολογικής Κλινικής κ. Θ. Κερενίδη εκφράζω, επίσης, θερμές ευχαριστίες για την αποτελεσματική και ευχάριστη συνεργασία που είχαμε στη συλλογή του υλικού και των κλινικών πληροφοριών των ασθενών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον D. Colau από το ίδρυμα Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium και ιδιαίτερα τον Prof. P. Coulie για την ευγενή προσφορά των HLA-πολυμερών και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τις επισκέψεις του στο Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας. Ευχαριστώ την Διευθύντρια του Δρακοπούλειου Κέντρου Αιμοδοσίας κα Ελένη Πολυχρονάκη και την κα Ρωξάνη Συριοπούλου για την παροχή των ασκών πλάσματος. Το προσωπικό του τμήματος Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και ιδιαίτερα τον υπεύθυνο του τμήματος κ. Παναγιώτη Γεωργούλια για την άδεια χρήσης του μετρητή ακτίνων-γ και την άριστη συνεργασία. Ευχαριστώ επίσης τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής, Καθ. Κων/νο Κάππα, την Επικ. Καθ. κα. Κυριακή Θεοδώρου, τον Λέκτορα κ. Ιωάννη Τσούγκο και το λοιπό προσωπικό του εργαστηρίου για τη δυνατότητα χρήσης του μαγνητικού επιταχυντή.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Μαρία Ζαμανάκου, στην οποία και αφιερώνω την παρούσα διατριβή, για τις ατελείωτες ώρες συνεργασίας μας και την ενθάρρυνση της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Ευχαριστώ, τη Φανή Καλαλά που μοιράστηκε τις γνώσεις της στην κυτταρομετρία ροής, την Αγγελική Μπάρδα, τον Στέφανο Τσόχα, τον Γεδεών Λουλέ, τον Κώστα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Μπούκα, την Αντιγόνη Μαμάρα, την Φωτεινή Μπαρδάκα, την Νίκη Αργέντου, την Λίτσα Καραμούτη, τον Κώστα Τσολή, καθώς και την υπόλοιπη ομάδα της Μονάδας Ανοσολογίας Καρκίνου, τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές με τους οποίους περάσαμε μαζί τόσα χρόνια καλής συνεργασίας και ευχάριστης ατμόσφαιρας και τους εύχομαι καλή σταδιοδρομία στη ζωή τους.

Σε μια πράξη ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Βασίλη Σούκο και Μαίρη Σούκου για την συμβολή τους σε αυτή την προσπάθεια αλλά και για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου παρείχαν στην ζωή μου.

Ως πράξη φιλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Θοδωρή Αλμπάνη για τις πολύτιμες συμβουλές του σε ευχάριστες και δυσάρεστες στιγμές, τον Φώτη Ευαγγέλου για τις εποικοδομητικές συζητήσεις που έκανα μαζί του και τον Φάνη Ζαδέ για την υποστήριξή του. Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω την κα. Βάσω Βαϊούλη για την υποστήριξη και την υπομονή της καθ'όλη την διάρκεια της μελέτης μου.

Αισθάνομαι ιδιαίτερα υποχρεωμένη προς την κα Ελένη Κλέτσου και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, για τη βοήθεια, μεγαλύτερη ή μικρότερη αλλά πάντα χρήσιμη, που ο καθένας που πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια, ώστε η προσπάθειά μου να φτάσει με επιτυχία στο τέλος της.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ag (antigen)	αντιγόνο
ADC (adenocarcinoma)	αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα
ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity)	εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρική κυτταροτοξικότητα
APC (allophycocyanin)	αλλοφυκοκυανίνη
APCs (antigen presenting cells)	αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
CTLs (cytolytic T Lymphocytes)	κυτταρολυτικά Τ-κύτταρα
DC (dendritic cell)	δενδριτικό κύτταρο
DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene)	7,12-διμεθυλβενζανθρακένιο
DMSO (dimethylsulphoxide)	διμεθυλο-σουλφοξείδιο
EBV (Esptein-Barr virus)	ιός Eptein-Barr
EBV-B (EBV-transformed B cells)	Β-κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε κακοήθη εξαλλαγή μετά από διαμόλυνση με EBV
FITC (fluorescein isothiocyanate)	ισοθειανική φλουορεσκίνη
HEV (high endothelial venules)	φλεβίδια υψηλού ενδοθηλίου
HLA (human leukocyte antigen)	ανθρώπινο αντιγόνο των λευκοκυττάρων
HS (human serum)	ανθρώπινος ορός
hTERT (human telomerase reverse transciptase)	ανθρώπινη ανάστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης
IL (interleukin)	ιντερλευκίνη
IFN (interferon)	ιντερφερόνη
KIR (killer cell Ig-like receptor)	ανάλογος των ανοσοσφαιρινών υποδοχέας των κυτταροκτόνων κυττάρων
mAb (monoclonal antibody)	μονοκλωνικό αντίσωμα
MCA (methylchloranthrene)	μεθυλχλωρανθένιο
MFI (mean fluorescence intensity)	μέση ένταση φθορισμού
MHC (major histocompatibility complex)	μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MLPC (mixed lymphocyte-peptide culture)	μικτή καλλιέργεια λεμφοκυττάρων-πεπτιδίων
NK-κύτταρα (natural killer cells)	φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
NKT-κύτταρα (NK T cells)	φυσικά κυτταροκτόνα Τ-κύτταρα
NSCLC	(non small cell lung carcinoma) μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα
pCTLs (precursor cytolytic T Lymphocytes)	πρόδρομα κυτταρολυτικά Τ-κύτταρα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

PE (phycoerythrin)	φυκοερυθρίνη
PBMC (peripheral blood mononuclear cells)	μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
PCR (polymerase chain reaction)	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PCR-SSO (PCR-Sequence Specific Oligonucleotides)	PCR με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές
PCR-SSP (PCR-Sequence Specific Primers)	PCR με εκκινητές ειδικής αλληλουχίας για κάθε αλληλόμορφο
RAG (recombination activating gene)	γονίδιο ενεργοποίησης των ανασυνδυασμών
SCC (squamous cell carcinoma)	πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα
SCLC (small cell lung cancer)	μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα
STAT (signal transducer and activator of transcription)	επαγωγέας των σημάτων και ενεργοποιητής της μεταγραφής
T_{CM} (central memory T cells)	κεντρικά μνημονικά Τ-κύτταρα
T_{EFF} (effector T cells)	δραστικά Τ-κύτταρα
T_{EM} (effector memory T cells)	δραστικά μνημονικά Τ-κύτταρα
T_{EMRA} (terminally differentiated effector T cells)	τελικώς διαφοροποιημένα δραστικά Τ-κύτταρα
Ta (telomerase activity)	ενεργότητα τελομεράσης
TAA (tumor-associated antigen)	συνδεόμενο με τον όγκο αντιγόνο
TcR (T cell receptor)	υποδοχέας του Τ-κυττάρου
TERC (telomerase RNA component)	RNA υπομονάδα της τελομεράσης
TILs (tumor infiltrating cells)	κύτταρα που διηθούν τον όγκο
TILN (tumor infiltrated lymph node)	λεμφαδένας διηθημένος από κύτταρα του όγκου
TNF (tumor necrosis factor)	παράγοντας νέκρωσης των όγκων
TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate)	12-*O*-τετραδεκανοϋλφορβολ-13-οξικό
Tregs (regulatory T cells)	Τ ρυθμιστικά κύτταρα
WT (wild-type)	φυσικού τύπου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1.1 Ανοσοεπιτήρηση και ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου

1.1.1 ΑΝΟΣΟΕΠΙΤΗΡΗΣΗ

Ο καρκίνος θεωρείται ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης εκ γενετής ή επίκτητων, γενετικών και επιγενετικών βλαβών, η αθροιστική επίδραση των οποίων πάνω σε βασικούς μηχανισμούς των κυττάρων είναι τέτοια, ώστε να οδηγήσει στην κακοήθη εξαλλαγή τους (malignant transformation). Η πιθανότητα συνάθροισης τέτοιων βλαβών είναι τεράστια, δεδομένου ότι κάθε γονίδιο, κατά τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού, υπολογίζεται πως έχει μια πιθανότητα ανά ώρα να υποστεί κάποια μετάλλαξη, υπό την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα κύτταρα, όμως, διαθέτουν μια σειρά μηχανισμών, διά των οποίων αποφεύγεται και μειώνεται σημαντικά το ενδεχόμενο της κακοήθους εξαλλαγής τους. Οι φυλογενετικά αρχαιότεροι και πιθανώς πιο αποτελεσματικοί από αυτούς τους μηχανισμούς είναι εκείνοι, που εξασφαλίζουν την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (DNA repair). Οι εκτροπές, εξ άλλου, της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων πυροδοτούν, φυσιολογικά, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, έτσι ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία κακοήθως εξαλλαγμένων κυττάρων. Τέλος, αθροιζόμενες πειραματικές ενδείξεις υποστηρίζουν ότι η επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό μηχανισμό αποφυγής της κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων του οργανισμού [6].

Εντούτοις και παρά την ύπαρξη και τη λειτουργία των μηχανισμών που διαθέτουν τα κύτταρα για την αποφυγή της κακοήθους εξαλλαγής τους, κάποιο ποσοστό γενετικών και επιγενετικών βλαβών κατορθώνει, τελικά, να τους παρακάμψει, με αποτέλεσμα, στη διάρκεια της ζωής κάθε οργανισμού, να δημιουργείται συνεχώς κάποιος αριθμός καρκινικών κυττάρων. Ακόμη όμως και αυτό γεγονός δεν είναι πάντοτε ικανό να οδηγήσει στη δημιουργία όγκων και στην εμφάνιση καρκίνου, επειδή τα κύτταρα αυτά φαίνεται ότι καταστρέφονται με τη μεσολάβηση ανοσιακών μηχανισμών.

Η ικανότητα του ανοσιακού συστήματος να προστατεύει τον οργανισμό από τον καρκίνο, αναγνωρίζοντας και καταστρέφοντας τα διαρκώς παραγόμενα, κακοήθως εξαλλαγμένα κύτταρα, φέρεται ως *ανοσοεπιτήρηση του καρκίνου* (cancer immunosurveillance) [7, 8]. Η αρχική σύλληψη της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου είχε γίνει από τον Paul Ehrlich [9] στις αρχές του περασμένου αιώνα, αλλά η διατύπωσή της ως ολοκληρωμένη θεωρία έγινε στα μέσα της δεκαετίας του 1950 από τους Sir Macfarlane Burnet και Lewis Thomas, στους οποίους ανήκει και το όνομά της [10, 11]. Ακολούθησαν πολυάριθμες και εντατικές ερευνητικές προσπάθειες για την απόδειξη της θεωρίας, με τη χρήση κυρίως μοντέλων πειραματοζώων με ανοσοανεπάρκεια. Γενικώς, τα αποτελέσματα εκείνων των μελετών ήταν αντικρουόμενα και δεν επέτρεπαν τη συναγωγή πειστικών συμπερασμάτων. Έτσι, η θεωρία της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου περιέπεσε σταδιακά στην αφάνεια, σε σημείο που το 1978 να πιστεύεται ότι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

είναι οριστικά άκυρη [7]. Η ανοσολογία του Καρκίνου είχε ήδη αρχίσει να στρέφεται και κατακλιζόταν πλέον εκείνη την περίοδο από την προσπάθεια μοριακού προσδιορισμού των αντιγόνων των όγκων και της χρήσης τής έναντι αυτών ανοσιακής απάντησης ως μέσο θεραπείας της νόσου.

Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας των πειραματοζώων, κατά τα τελευταία χρόνια της δεκαετίας του 1970 και μετέπειτα, αποτέλεσε τη βασική αφορμή για επανεξέταση της θεωρίας της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου. Έτσι, ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, χρησιμοποιώντας κυρίως ποντίκια με αποσιώπηση συγκεκριμένων ανοσογονιδίων (knock-out mice), έδειξαν βάσιμα την εγκυρότητα της θεωρίας, τουλάχιστον όσον αφορά τα πειραματόζωα (**Πίνακας 1**). Ανάλογη έρευνα είναι προφανώς αδύνατο να εφαρμοστεί στον άνθρωπο. Μια σειρά δεδομένων, εντούτοις, συνηγορεί ότι ανάλογη δράση, όσον αφορά την προστασία από τον καρκίνο, παρουσιάζει το ανοσιακό σύστημα και στον άνθρωπο. Την ισχυρότερη ένδειξη αποτελεί η αυξημένη επίπτωση μη ιογενών όγκων σε μεταμοσχευμένα άτομα που βρίσκονται υπό φαρμακευτική ανοσοκαταστολή, σε σύγκριση με τα ανάλογης ηλικίας ανοσοεπαρκή άτομα [12, 13, 14]. Συνηγορητική είναι, επίσης, η προϊούσα αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου σε συνάρτηση με την ηλικία, η οποία βαίνει παράλληλα με την αποδεδειγμένη έκπτωση των αμυντικών μηχανισμών κατά το γήρας. Παρομοίως, ισχυρή υποστηρικτική ένδειξη αποτελεί η θετική συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ του αριθμού των TILs και της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο [15, 16, 17, 18]. Τέλος, υπάρχει πλέον μεγάλη σειρά έγκυρων πειραματικών ενδείξεων, που δείχνουν ότι η παρουσία των όγκων στον οργανισμό των καρκινοπαθών επάγει ένα πλήθος αυτομάτων φυσικών και ειδικών ανοσιακών απαντήσεων [7].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ευπάθεια πειραματοζώων με ανοσοανεπάρκεια στο σχηματισμό επαγομένων ή αυτόματων όγκων [7].

Φαινότυπος / Εξάλειψη	**Ανοσοανεπάρκεια**	**Όγκοι**
RAG-2$^{-/-}$	Τ, Β και NKT-κύτταρα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα Αυτόματες νεοπλασίες του εντέρου
RAG-2$^{-/-}$ × STAT1$^{-/-}$ (RkSk)	Τ, Β και NKT-κύτταρα Απουσία απάντησης στις IFN-γ και IFN-α/β	MCA-επαγόμενα σαρκώματα Αυτόματες νεοπλασίες του εντέρου και του μαστού
BALB/c SCID	Τ, Β και NKT-κύτταρα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
Περφορίνη$^{-/-}$	Απουσία περφορίνης	MCA-επαγόμενα σαρκώματα Αυτόματο διάχυτο λέμφωμα
TCR Jα281$^{-/-}$	Υποπληθυσμοί των NKT-κυττάρων	MCA-επαγόμενα σαρκώματα

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ***(συνέχεια)***

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

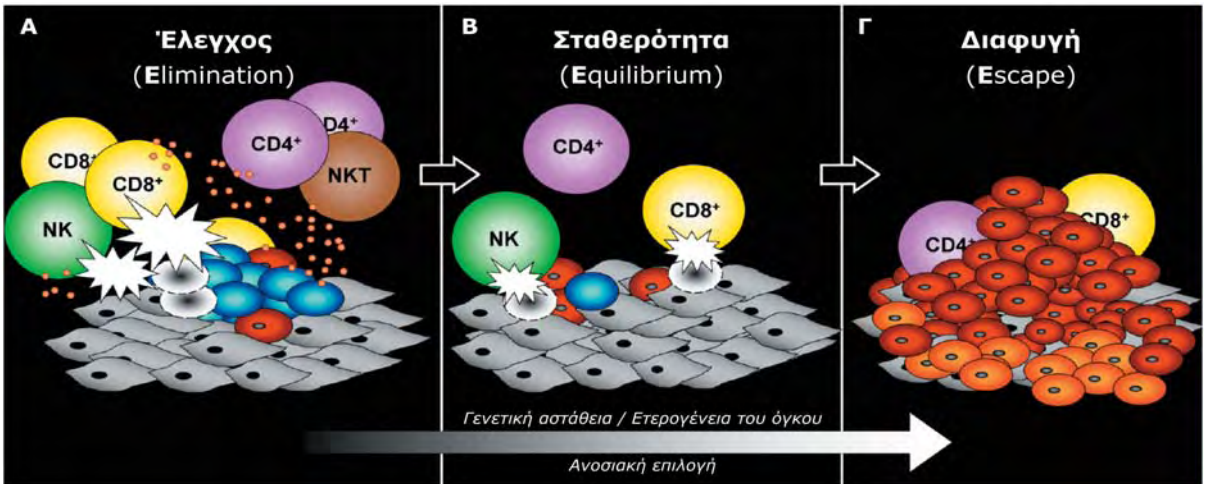
Φαινότυπος / Εξάλειψη	Ανοσοανεπάρκεια	Όγκοι
Αντι-ασιαλο-GM1 αντίσωμα	NK-κύτταρα και ενεργοποιημένα μακροφάγα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
Αντι-NK1.1 αντίσωμα	NK και NKT-κύτταρα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
Αντι-Thy1 αντίσωμα	Τ-κύτταρα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
αβΤ κύτταρα$^{-/-}$	αβΤ-κύτταρα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
γδΤ κύτταρα$^{-/-}$	γδΤ-κύτταρα	MCA-επαγόμενα σαρκώματα DMBA/TPA-επαγόμενοι όγκοι του δέρματος
STAT1$^{-/-}$	Απουσία απάντησης στις IFN-γ και IFN-α/β	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
IFNGR1$^{-/-}$	Απουσία απάντησης στην IFN-γ	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
IFN-γ$^{-/-}$	Απουσία IFN-γ	MCA-επαγόμενα σαρκώματα C57BL/6: Αυτόματα διάχυτα λεμφώματα BALB/c: Αυτόματο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα
Περφορίνη$^{-/-}$×IFN-γ$^{-/-}$	Απουσία περφορίνης και IFN-γ	MCA-επαγόμενα σαρκώματα Αυτόματα διάχυτα λεμφώματα
IL-12$^{-/-}$	Απουσία IL-12	MCA-επαγόμενα σαρκώματα
WT + IL-12	Εξωγενής IL-12	Μικρότερη επίπτωση MCA-επαγομένων σαρκωμάτων

1.1.2 ΑΝΟΣΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ

Η θεωρία της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου και οι πειστικές ενδείξεις που υποστηρίζουν την εγκυρότητά της, όπως αναπτύχθηκαν παραπάνω, αφήνουν αναπάντητο ένα σημαντικό ερώτημα: «Αφού το ανοσιακό σύστημα έχει τη δυνατότητα να καταστρέφει τα κακοήθως εξαλλασσόμενα κύτταρα που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ζωής, πώς κάποια άτομα που δεν παρουσιάζουν ελλείμματα της ανοσιακής λειτουργίας τους, αναπτύσσουν καρκίνο;». Ως απάντηση στο ερώτημα αυτό, οι GP Dunn και RD Schreiber, από τις αρχές αυτής της δεκαετίας, προτείνουν τη συμπληρωματική προς τη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης, *θεωρία της ανοσοδιαμόρφωσης των όγκ*ων [7, 19, 20, 21]. Σύμφωνα με τη θεωρία των Dunn και Schreiber, η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με το ανοσιακό σύστημα, από τη στιγμή της δημιουργίας των κακοήθως εξαλλαγμένων κυττάρων μέχρι την κλινική εκδήλωση των όγκων, εξελίσσεται στις ακόλουθες τρεις φάσεις (the three Es of cancer immunoediting: **E**limination, **E**quilibrium, **E**scape) (**Εικόνα 1**):

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

α. *Έλεγχος και περιορισμός των κακοήθως εξαλλαγμένων κυττάρων* (elimination). Η φάση αυτή αντιστοιχεί και καλύπτει τη σχέση του ανοσιακού συστήματος με τον καρκίνο, όπως αυτή περιγράφεται από τη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης. Εν συντομία, τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού, που δέχονται την επίδραση διαφόρων ογκογενετικών παραγόντων και υπόκεινται σε κακοήθη εξαλλαγή, εκφράζουν χαρακτηριστικούς δείκτες και φλεγμονώδη κυρίως σήματα κινδύνου, τα οποία είναι αναγνωρίσιμα από το ανοσιακό σύστημα. Η αναγνώριση αυτή επάγει μια σειρά φυσικών και ειδικών ανοσιακών απαντήσεων, ο συνδυασμός των οποίων καθορίζεται και εξαρτάται εκάστοτε από την κυτταρική προέλευση του όγκου, τη διαδικασία της εξαλλαγής, την ανατομική εντόπιση, την αντίδραση του στρώματος, τις παραγόμενες κυτταροκίνες και την εγγενή ανοσογονικότητα. Σε κάθε περίπτωση, οι απαντήσεις αυτές είναι ικανές να αντιμετωπίσουν καρκινικά κύτταρα.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Σχηματική απεικόνιση της θεωρίας ανοσοδιαμόρφωσης των όγκων [7]. Με γκρί χρώμα φαίνονται τα κύτταρα του στρώματος και τα μη εξαλλαγμένα κύτταρα, με μπλε τα εξαλλαγμένα κύτταρα, με κόκκινο και πορτοκαλί τα καρκινικά κύτταρα που έχουν υποστεί ανοσοδιαμόρφωση.

β. *Σταθερότητα* (equilibrium). Σε περίπτωση που τα δημιουργούμενα καρκινικά κύτταρα αναπτύξουν δυνατότητες παράκαμψης της πλήρους καταστροφής τους από το ανοσιακό σύστημα, κύτταρα του όγκου επιβιώνουν και υπάρχουν πλέον στον οργανισμό, χωρίς βέβαια να είναι εντοπίσιμα και χωρίς φυσικά να εκδηλώνεται καρκίνος. Τι είναι, όμως, εκείνο που κάνει, κάποια στιγμή, τα καρκινικά κύτταρα ικανά να υπερβαίνουν τη μέχρι πρότινος ικανότητα του ανοσιακού συστήματος να τα καταστρέφει; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό αποτελεί κομβικό στοιχείο της θεωρίας. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται, όπως είναι καλά γνωστό, από εκατοντάδες μεταλλάξεις [22] και διαθέτουν μια τεραστίων διαστάσεων πλαστικότητα του γενώματός τους, που προέρχεται από τη διαφόρων ειδών γενετική τους αστάθεια (μικροδορυφορική, χρωμοσωματική αστάθεια κ.ά.) [23]. Αυτή η σταθερή γενωμική μεταμόρφωση των καρκινικών κυττάρων είναι δυνατό, κάποια στιγμή, να οδηγήσει σε αλλαγή του φαινότυπού τους, κατά τρόπο που να παρουσιάζουν πλέον μειωμένη αντιγονικότητα. Το τελευταίο, σύμφωνα με τη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

θεωρία, αντιπροσωπεύει μεν μια στοχαστική πιθανότητα, αλλά ταυτόχρονα δεν παύει να εξαρτάται από τους «ανοσοδιαμορφωτές» που υπάρχουν στο περιβάλλον. Με άλλα λόγια, ο καρκινικός φαινότυπος που θα κατορθώσει να επικρατήσει στη βάση της γενωμικής μεταμορφωσιμότητας, είναι αυτός που μπορεί ταυτόχρονα να διαφύγει και από τη δράση του ανοσιακού συστήματος του συγκεκριμένου ατόμου. Κατ' αυτή την έννοια, το ανοσιακό σύστημα φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη διαμόρφωση του αντιγονικού φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων.

Η μετάδοση καρκίνου από τους δότες στους λήπτες μετά από τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη, μέχρι στιγμής, ένδειξη ότι πράγματι υφίσταται μια τέτοια φάση κατά την εξέλιξη της αλληλεπίδρασης καρκινικών κυττάρων—ανοσιακού συστήματος. Στη βιβλιογραφία, δηλαδή, αναφέρονται αρκετές περιπτώσεις ανάπτυξης καρκίνου σε όργανα των ληπτών διαφορετικά από εκείνα που μεταμοσχεύθηκαν, ενώ οι αντίστοιχοι δότες είτε δεν είχαν ιστορικό καρκίνου είτε είχαν καρκίνο σε μακροχρόνια ύφεση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ανοσοκαταστολή, στην οποία υποβλήθηκαν οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς, διευκόλυνε την ανάπτυξη λανθανόντων όγκων που, στον οργανισμό των δοτών, βρίσκονταν σε κατάσταση ελεγχόμενης σταθερότητας [24, 25, 26, 27]. Σειρά πειραμάτων που έχουν γίνει με στόχο την επιβεβαίωση των παραπάνω κλινικών παρατηρήσεων και με τη χρήση ποντικών με αποσιώπηση συγκεκριμένων ανοσογονιδίων (knock-out mice), έχουν δείξει πράγματι ότι οι όγκοι που αναπτύσσονται σε περιβάλλον ανοσοανεπάρκειας εμφανίζουν αυξημένη αντιγονικότητα σε σύγκριση με εκείνους που αναπτύσσονται σε ανοσοϊκανούς ξενιστές, καθώς και ότι, όταν οι πρώτοι μεταμοσχεύονται στους τελευταίους, απορρίπτονται πολύ ευκολότερα [28, 29, 30, 31, 32].

Η φάση αυτή αντιπροσωπεύει την πιο υποθετική και, κατά πάσα πιθανότητα, την πιο μακρόχρονη φάση της θεωρίας. Ταυτόχρονα, όμως, είναι και η φάση της φυσικής ιστορίας του καρκίνου, στην οποία εστιάζεται πλέον το ενδιαφέρον των ερευνητών, αφού μικρής εμβέλειας ενίσχυση της ανοσιακής απάντησης κατά τη συγκεκριμένη περίοδο αναμένεται ότι θα μπορούσε εύκολα να προλάβει την εκδήλωση του καρκίνου.

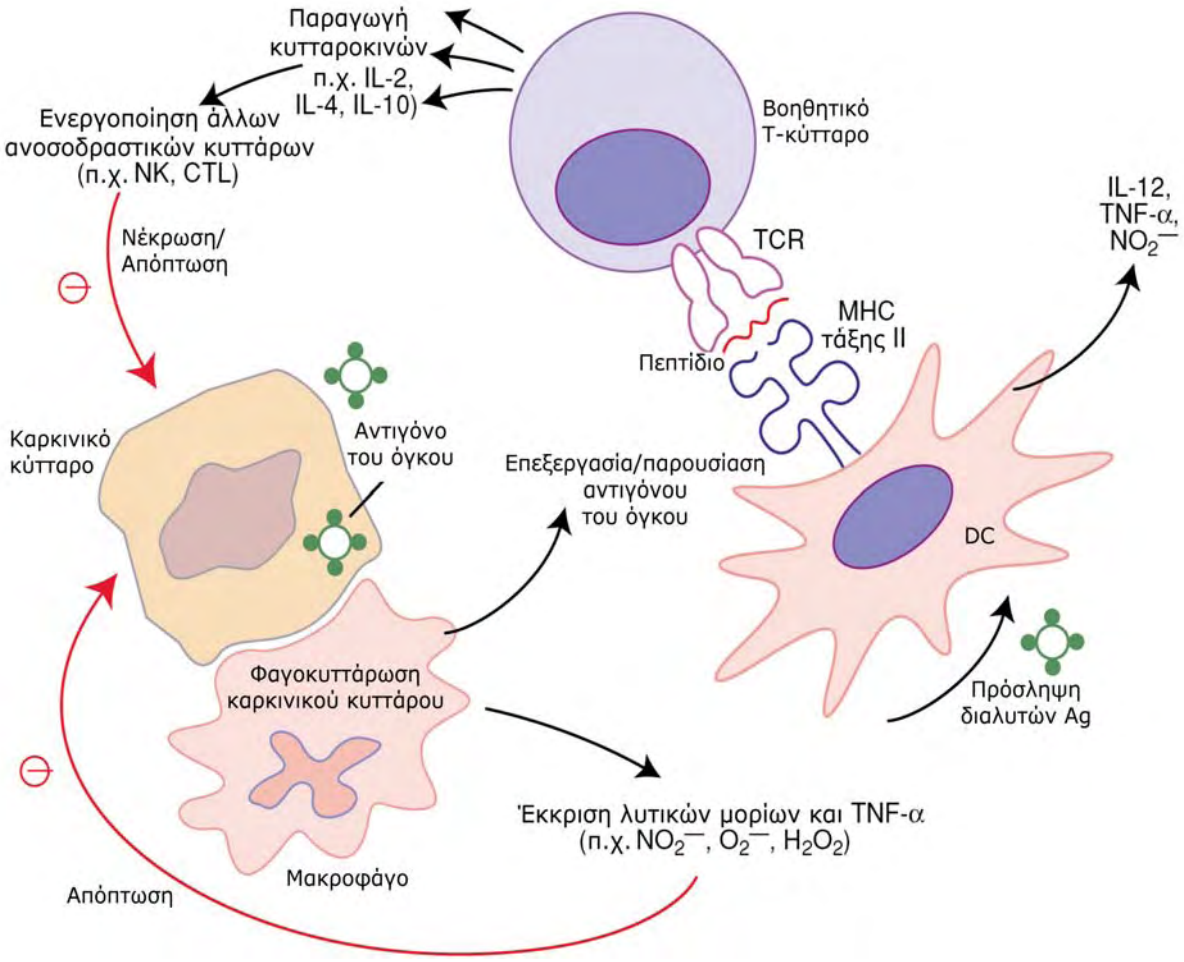
γ. *Διαφυγή* (escape). Εξελισσομένης της ανοσοδιαμόρφωσης των καρκινικών κυττάρων, η ισορροπία που επιτυγχάνεται στην προηγούμενη φάση είναι δυνατό να κλείνει υπέρ της διαφυγής τους από την ικανότητα περιορισμού που διαθέτουν οι ανοσιακοί μηχανισμοί, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη αύξησή τους, τη δημιουργία και την κλινική εκδήλωση των όγκων [33].

Η παρουσία του όγκου κινητοποιεί ολόκληρο το φάσμα των φυσικών και ειδικών ανοσιακών μηχανισμών του οργανισμού (**Εικόνες 2—3**), αλλά κάθε τύπος καρκίνου, όπως και κάθε θέση εντόπισής του, φαίνεται ότι επάγει διαφορετικούς συνδυασμούς ανοσιακών απαντήσεων [34, 35]. Η αναποτελεσματικότητα όλων αυτών των απαντήσεων να ελέγξουν την εξέλιξη της νόσου, είναι συνέπεια της ικανότητας των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

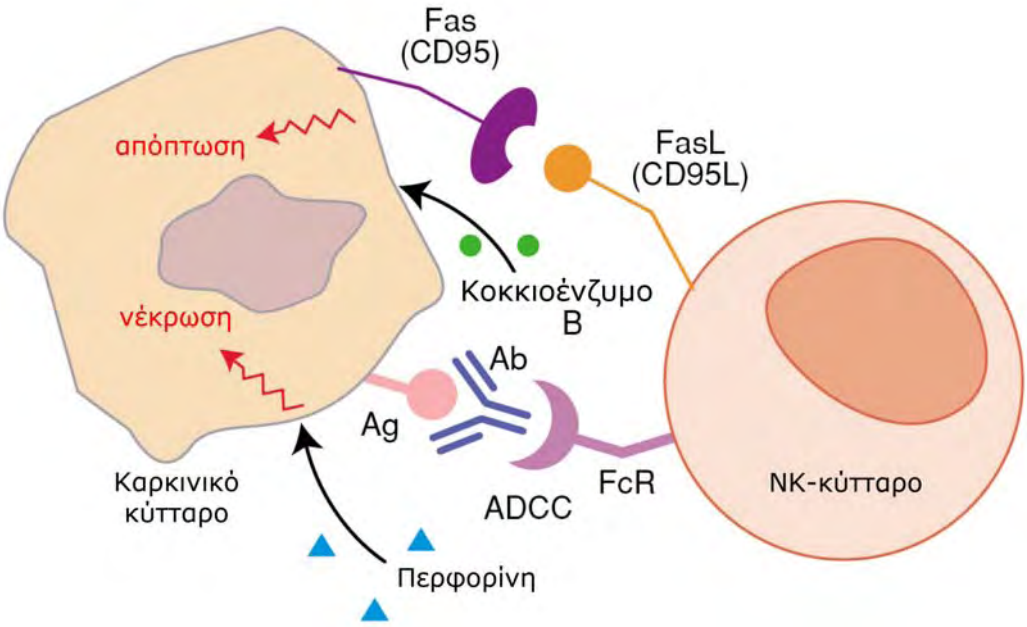
όγκων να αναπτύσσουν μια μεγάλη σειρά μηχανισμών, διά των οποίων επιτυγχάνουν τη διαφυγή τους από αυτούς [36, 37, 38, 39]. Οι μηχανισμοί αυτοί κατατάσσονται, γενικώς, στις ακόλουθες ομάδες:

α. Μεταβολές της έκφρασης των τάξης I HLA-αντιγόνων και των TAAs.
β. Διαταραχές της έκφρασης συνοδών μορίων και μορίων προσκόλλησης, τόσο από τον ίδιο τον όγκο, όσο και από τα APCs.
γ. Έκκριση διαλυτών ανοσοκατασταλτικών μεσολαβητών είτε από τα καρκινικά κύτταρα είτε από τα TILs.
δ. Επαγωγή ανεργίας ή εξάλειψης των ανοσοδραστικών Τ-κυττάρων.
ε. Επαγωγή κατασταλτικών κυττάρων.
στ. Διαταραχές της μεταβίβασης των σημάτων στα Τ-κύτταρα.
ζ. Κατανάλωση από τους όγκους προϊόντων που παράγονται από τα διηγερμένα λεμφοκύτταρα.

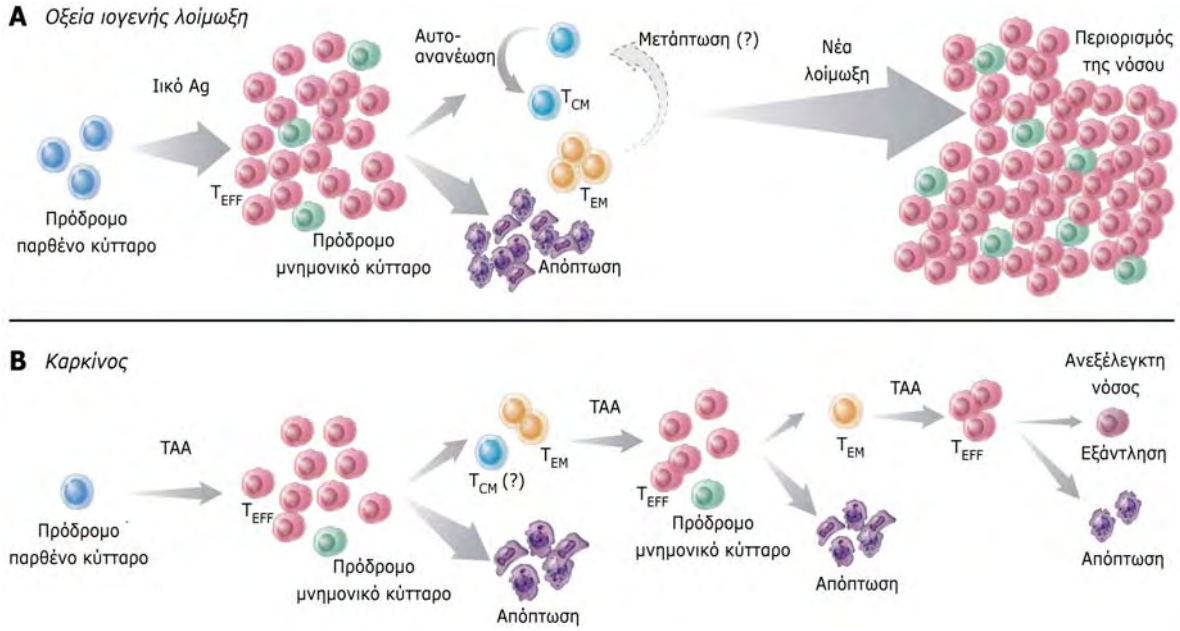


ΕΙΚΟΝΑ 2. Η βοηθητική Τ-κυτταρική και η φαγοκυτταρική απάντηση έναντι των όγκων [34].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 3: NK κυτταρική απάντηση των όγκων [34]



ΕΙΚΟΝΑ 4. Συγκριτική απεικόνηση της ανάπτυξης και της εξέλιξης της Τ-κυτταρικής μνήμης στην περίπτωση οξείας ιογενούς λοίμωξης (Α) και σε εκείνη του καρκίνου (Β) (τροποποιημένο από [42]).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1.2 Η μνημονική CD8 Τ-κυτταρολυτική απάντηση έναντι των όγκων

Η μνήμη αποτελεί βασικό γνώρισμα της ειδικής ανοσιακής απάντησης. Οι διεργασίες της Β-κυτταρικής μνήμης είναι αρκετά καλά διευκρινισμένες, ως αποτέλεσμα της σχετικά εύκολης και από μακρού μελέτης της δευτερογενούς αντισωματικής απάντησης. Αντίθετα, η διερεύνηση της Τ-κυτταρικής μνήμης άρχισε πολύ πρόσφατα και συνεχίζει να συναντά αρκετές δυσκολίες, προερχόμενες κυρίως από τα τεχνικά προβλήματα της *in vitro* μελέτης των Τ-κυττάρων. Οι περισσότερες από τις διαθέσιμες τεχνικές προϋποθέτουν *ex vivo* διέγερση των σπάνιων αντιγονοειδικών Τ-κυτταρικών κλώνων ή κάποιου άλλου είδους εμπλοκή του TcR (π.χ. σύνδεση με HLA-πολυμερή), παρεμβάσεις δηλαδή που συνεπάγονται κρίσιμες, πολλές φορές, μεταβολές των χαρακτηριστικών των Τ-κυτταρικών υποπληθυσμών, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Γι' αυτούς τους λόγους, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι η τεράστια πρόοδος που υπάρχει στο χώρο, συνοδεύεται από αρκετές ασάφειες ή ακόμη και από σύγχυση όρων και εννοιών [40, 41].

Οι περισσότερες από τις μελέτες της μνημονικής Τ-κυτταρικής απάντησης αφορούν την ανοσία έναντι παθογόνων και κυρίως έναντι των ιών, ενώ μεγάλο μέρος των γνώσεων που υπάρχουν προέρχονται από μελέτες σε πειραματόζωα. Ειδικότερα, τεράστια ερευνητική προσπάθεια έχει επενδυθεί στη διερεύνηση της CD8 Τ-κυτταρολυτικής απάντησης, στο πλαίσιο της προσπάθειας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων έναντι των ενδοκυττάριων παθογόνων. Στο πλαίσιο αυτό, η μνημονική Τ-κυτταρική απάντηση που συνοδεύει τις οξείες ιογενείς λοιμώξεις είναι, σήμερα πλέον, αρκετά διευκρινισμένη. Σε αντίθεση, πολλά κομβικής σημασίας σημεία παραμένουν σκοτεινά, σχετικά με τη διαφοροποίηση των μνημονικών CTLs υπό την επίδραση συνεχούς διέγερσης από ιικά αντιγόνα (χρόνιες λοιμώξεις), αυτοαντιγόνα ή TAA (**Εικόνα 4,** σελίδα 27).

1.2.1 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ Τ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΜΝΗΜΗΣ

Τα TcRα/β$^+$ κυτταρολυτικά CD8$^+$ Τ-κύτταρα (όπως και τα TcRα/β$^+$ βοηθητικά CD4$^+$ Τ-κύτταρα) που κυκλοφορούν στο αίμα και ανευρίσκονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα ή στους μη λεμφικούς ιστούς του οργανισμού, προέρχονται από το θύμο αδένα, όπου ωριμάζουν, εκπαιδεύονται και διαφοροποιούνται οι μυελικής προέλευσης λεμφοβλάστες. Τα CD8$^+$ Τ-κύτταρα εξέρχονται από το θύμο ως ώριμα, ικανά να αναγνωρίσουν αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται από τάξης Ι HLA-μόρια, αλλά παρθένα (naïve) κύτταρα, κύτταρα δηλαδή που ακόμη δεν έχουν έλθει σε επαφή με το αντιγόνο (inexperienced).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Τυπικά, η επαφή των παρθένων CTLs με το αντιγόνο ακολουθείται από μια τριφασική απάντηση [42]. Η πρώτη φάση της αρχικής ενεργοποίησης χαρακτηρίζεται από λογαριθμική έκπτυξη* των αντιγονοειδικών κλώνων, τα κύτταρα των οποίων μετατρέπονται, παράλληλα, σε δραστικά (effector) κύτταρα, αποκτώντας ικανότητες εγκατάστασης (homing) στους περιφερικούς ιστούς, παραγωγής δραστικών κυτταροκινών και κυτταρόλυσης. Σε μια δεύτερη φάση, επέρχεται ταχεία συρρίκνωση του αριθμού των αντιγονοειδικών δραστικών κυττάρων, λόγω απόπτωσης. Τέλος, κατά τη διάρκεια μιας τρίτης φάσης δημιουργείται ο σταθερός πληθυσμός των μνημονικών κυττάρων (**Εικόνα 4Α**, σελίδα 27), τα τρία παρακάτω βασικά χαρακτηριστικά του οποίου συνιστούν το όρισμα της Τ-κυτταρικής ανοσιακής μνήμης:

α. αυξημένη, σε σύγκριση με τον πληθυσμό των παρθένων κυττάρων, συχνότητα πρόδρομων† κυττάρων,

β. την ικανότητα να αυτοανανεώνεται (3–4 φορές ταχύτερα από τα παρθένα κύτταρα), μέσω ομοιοστατικού πολλαπλασιασμού μεσολαβούμενου από τις IL-7, IL-15 και πιθανώς IL-21, αλλά ανεξάρτητα από την παρουσία αντιγόνου [43, 44, 45], και

γ. ταχεία απάντηση στα επαναλαμβανόμενα αντιγονικά ερεθίσματα, με πολλαπλασιασμό των αντιγονοειδικών κλώνων, οι οποίοι αναπτύσσουν, παράλληλα, την ικανότητα εκδήλωσης δραστικών λειτουργιών.

1.2.2 Οι υποπληθυσμοι των μνημονικων CTLs

Τα μνημονικά CTLs αντιπροσωπεύουν έναν ανομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό, τα στοιχεία του οποίου παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, ανάλογα με τους φαινοτυπικούς τους δείκτες, τις δραστικές λειτουργίες τους και την ικανότητά τους για εγκατάσταση στους ιστούς (**Εικόνα 5**). Η πρώτη διάκριση των υποπληθυσμών των μνημονικών CTLs προτάθηκε από την ομάδα του Lanzavecchia [46, 47]. Το μοντέλο που προτείνουν οι συγκεκριμένοι ερευνητές και το οποίο, στα βασικά του τουλάχιστον σημεία, φαίνεται να επαληθεύεται από μετέπειτα μελέτες, υποστηρίζει την ύπαρξη δύο φαινοτυπικά διακριτών υποπληθυσμών μνημονικών CTLs, των T_{CM} και T_{EM}, οι οποίοι εξυπηρετούν, αντίστοιχα, δύο ξεχωριστές μνημονικές λειτουργίες.

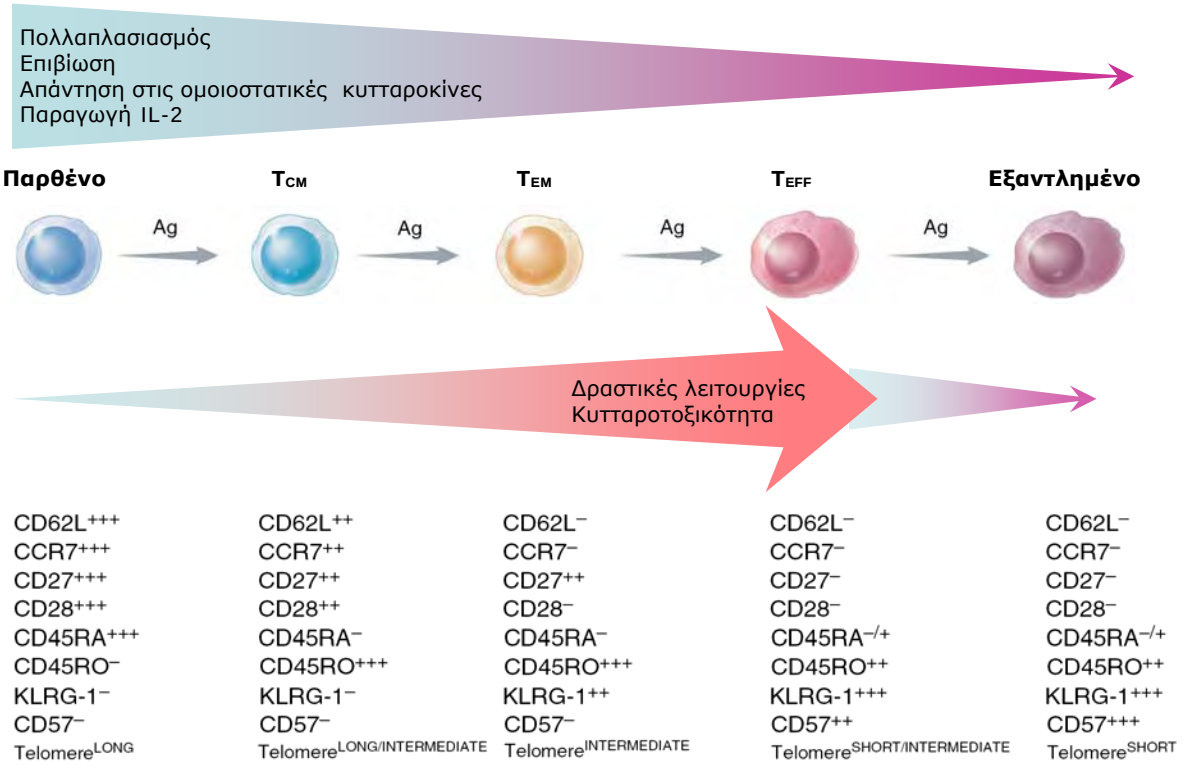
Τα T_{CM} εξυπηρετούν τη φερόμενη ως *αντιδραστική μνήμη* (reactive memory). Τα κύτταρα αυτά διατηρούν τη σταθερή μεμβρανική έκφραση των υποδοχέων CD62L (L-σελεκτίνη) και CCR7 (υποδοχέας των χημειοκινών CCL19 and CCL21), που χαρακτηρίζει

* Υπολογίζεται ότι από κάθε πρόδρομο κύτταρο του αντιγονοειδικού κλώνου προκύπτουν περισσότερα από 10.000 θυγατρικά κύτταρα (>13 κυτταρικές διαιρέσεις) εντός διαστήματος 5–8 ημερών.

† Ο όρος *πρόδρομα (precursor) κύτταρα* δεν περιγράφει συγκεκριμένο λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό, αλλά υποδηλώνει γενικώς λεμφοκυτταρικές μορφές που διαθέτουν δυναμικό πολλαπλασιασμού.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

τα παρθένα CTLs, από τα οποία προέρχονται. Με την έκφραση αυτών των μορίων, επιτυγχάνεται η εξαγγείωσή τους μέσω των HEV και η μετανάστευσή τους στις πλούσιες σε Τ-κύτταρα περιοχές των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Τα T_{CM} μοιάζουν, επίσης, με τα παρθένα CTLs κατά το ότι δεν διαθέτουν ή έχουν πολύ μικρή ικανότητα εκδήλωσης δραστικών λειτουργιών. Σε αντίθεση όμως με τα παρθένα CTLs, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία και απαντούν εύκολα στο αντιγονικό ερέθισμα, πολλαπλασιαζόμενα και διαφοροποιούμενα σε δραστικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, εξαρτώνται λιγότερο από τη συνδιέγερση και έχουν αυξημένη έκφραση CD40L, χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να αποκρίνονται αποτελεσματικότερα στην επαφή με τα DCs και τα Β-κύτταρα. Μετά από τη διέγερση του TcR, εκκρίνουν IL-2 και, μετά τη διαφοροποίησή τους σε T_{EFF}, παράγουν μεγάλες ποσότητες IFN-γ και IL-4. Οι ιδιότητες αυτές, καθιστούν τα T_{CM} κατάλληλα για την προστασία του οργανισμού έναντι των συστηματικών αντιγονικών ερεθισμάτων.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Οι φαινοτυπικές και λειτουργικές μεταβολές των CTLs που επάγονται από τη χρόνια αντιγονική διέγερση [42].

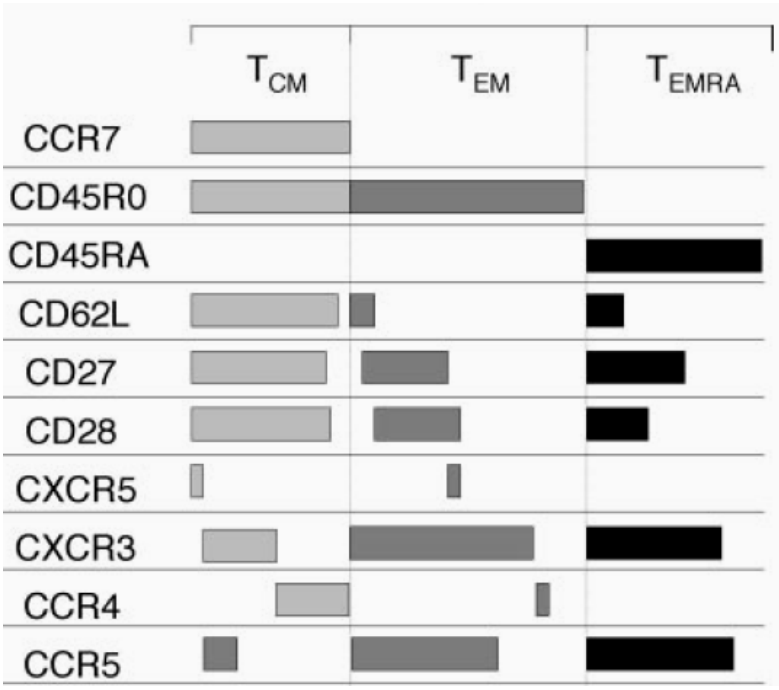
Τα T_{EM} εξυπηρετούν τη φερόμενη ως *προστατευτική μνήμη* (protective memory). Χαρακτηρίζονται από απώλεια της σταθερής έκφρασης του CCR7, από ετερογενή έκφραση του CD62L και από την έκφραση ενός συνδυασμού υποδοχέων χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης, διά των οποίων επιτυγχάνεται η μετανάστευσή τους στα περιφερικά όργανα, όπως το ήπαρ και οι πνεύμονες, καθώς και στους φλεγμαίνοντες ιστούς. Συγκρινόμενα με τα T_{CM}, διαθέτουν την ικανότητα άμεσης εκδήλωσης δραστικών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

λειτουργιών και, μέσα σε λίγες ώρες από τον αντιγονικό ερεθισμό, εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες περφορίνης, IFN-γ, IL-4 και IL-5. Οι ιδιότητες αυτές των T_{EM} τα καθιστούν κατάλληλα για την άμεση προστασία του οργανισμού έναντι των περιφερικών αντιγονικών ερεθισμάτων. Μερικά T_{EM} επανεκφράζουν τον ισότυπο των παρθένων κυττάρων CD45RA (T_{EMRA}) και είναι ικανά να αποκρίνονται στο αντιγονικό ερέθισμα με ταχεία παραγωγή IFN-γ, ενώ διαθέτουν επιπλέον μεγάλη ποσότητα περφορίνης.

Οι πληθυσμοί των T_{CM} και T_{EM} CTLs δεν είναι φαινοτυπικά ομοιογενείς. Αντίθετα, περιλαμβάνουν κύτταρα που εκφράζουν διαφορετικούς συνδυασμούς υποδοχέων κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης και συνδιεγερτικών μορίων (**Εικόνα 6**), γεγονός που ενδεχομένως αντιπροσωπεύει και διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Στο σημείο αυτό, βέβαια, πρέπει να τονιστεί ότι πολλοί από αυτούς τους δείκτες παρουσιάζουν ταχείες και παροδικές μεταβολές κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων. Για παράδειγμα, τα T_{EM}, μετά από την αντιγονική διέγερση, παρουσιάζουν παροδική αύξηση της έκφρασης των CCR7 και CXCR5 και ελάττωση του CCR5 [48]. Αντίθετα, το CCR7 εξαφανίζεται γρήγορα από τη μεμβράνη των T_{CM}, καθώς αυτά διαφοροποιούνται προς T_{EFF}. Επίσης, το CD62L εξαφανίζεται από την επιφάνεια των κυττάρων αμέσως μετά από τη διέγερση του TcR ή μετά από τη μετανάστευσή τους στους λεμφαδένες [49, 50]. Έτσι, ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των T_{CM} και T_{EM} ισχύει μόνο εφόσον τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας (resting cells).

Σημαντικές διαφορές παρουσιάζουν, επίσης τα T_{CM} και T_{EM} ως προς το δυναμικό έκπτυξης (expansion potential). Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα μνημονικά κύτταρα εμφανίζουν χαμηλό ουδό ενεργοποίησης και έντονο πολλαπλασιασμό. Παρότι, όμως, τα T_{CM} και T_{EM} διαθέτουν υψηλή απαντητικότητα στην αντιγονική διέγερση, το δυναμικό



ΕΙΚΟΝΑ 6. Η φαινοτυπική ετερογένεια των μνημονικών CTLs [46].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

έκπτυξης των T_{EM} είναι μικρότερο εκείνου των T_{CM}, ενώ πολύ μικρότερο δυναμικό έκπτυξης από όλα έχουν τα T_{EMRA}. Αυτή η μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού συσχετίζεται με ελάττωση του μήκους των τελομερών και με αύξηση της τάσης για απόπτωση. Σε σημαντικό βαθμό, οι μεταβολές αυτές αντισταθμίζονται από την αύξηση της Τα και από την αύξηση της έκφρασης των αντιαποπτωτικών μορίων που επάγονται από τη συνδιέγερση [51, 52, 53].

Γενικώς, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα T_{CM} συμπεριφέρονται ως πρόδρομα μνημονικά κύτταρα (memory stem cells), ικανά να αυτοανανεώνονται, να διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα και να τροφοδοτούν διαρκώς τη δεξαμενή των T_{EM} [54]. Πολύ ασαφέστερες είναι οι ενδείξεις αναφορικά με την αντίστροφη σχέση. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η μετατροπή των T_{EM} σε T_{CM} είναι εφικτή, χωρίς όμως ποτέ τα κύτταρα αυτά να ανακτούν το δυναμικό πολλαπλασιασμού που χαρακτηρίζει τα T_{CM}. Οι μελέτες αυτές συγκλίνουν στην άποψη ότι ο πληθυσμός των T_{EM} είναι ασταθής, επειδή είτε μεταπίπτει σε T_{CM} είτε οδηγείται εύκολα στο θάνατο [55, 56]. Αντίθετα, μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν ότι τα T_{EM} ανιχνεύονται για πολλά χρόνια μετά από την αντιγονική διέγερση [57]. Ενδεχομένως, τα T_{EM} στον άνθρωπο είτε να είναι ενδογενώς σταθερά είτε η δεξαμενή τους να συντηρείται από μια διαρκή, επαγόμενη από κυτταροκίνες διαφοροποίηση των T_{CM}. Μ' άλλα λόγια, οι σχέσεις $T_{CM} \rightarrow T_{EFF}$ και $T_{EM} \rightarrow T_{EFF}$ φαίνεται ότι είναι αρκετά καλά τεκμηριωμένες, αλλά δεν είναι ακόμη αποσαφηνισμένο κατά πόσο ισχύουν οι ακολουθίες $T_{CM} \rightarrow T_{EM} \rightarrow T_{EFF}$ και $T_{EM} \rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EFF}$.

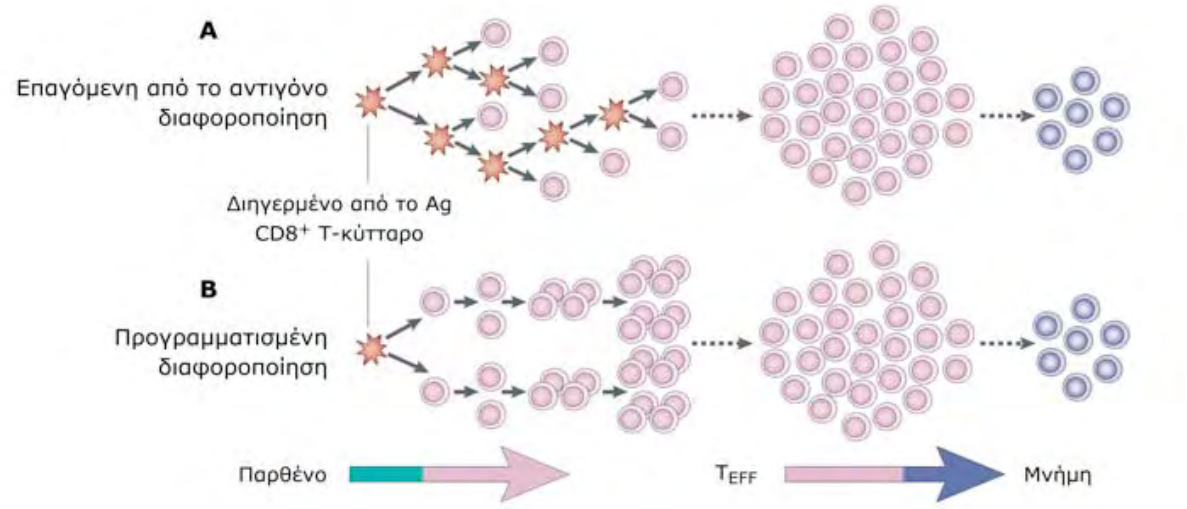
1.2.3 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ CTLs

Μελετώντας τη σχετική βιβλιογραφία, εύκολα θα μπορούσε να υποστηρίξει κανείς ότι τα ερωτήματα που έχει αναδείξει, μέχρι στιγμής, η έρευνα της Τ-κυτταρικής ανοσιακής μνήμης είναι πολύ περισσότερα από τα σημεία, στα οποία έχει δώσει οριστικές απαντήσεις [40]. Ακόμη, για παράδειγμα, παραμένει αναπάντητο το ερώτημα, αν ορισμένοι από τους φαινοτυπικά αναγνωρίσιμους υποπληθυσμούς των μνημονικών Τ-κυττάρων αντιστοιχούν σε φάσεις της διαφοροποίησής τους ή αν είναι απλώς «παραπροϊόντα» αυτής της διεργασίας. Η φύση των εξωτερικών παραγόντων και ο τρόπος, με τον οποίο αυτοί καθορίζουν την τύχη των ενεργοποιουμένων (primed) $CD8^+$ Τ-κυττάρων, καθώς και ο βαθμός κατά τον οποίο η συγκεκριμένη διαδικασία αντιπροσωπεύει προγραμματισμένο από ενδοκυττάριους μηχανισμούς γεγονός, βρίσκονται στη βάση των ερωτημάτων που εκκρεμούν. Το ενδιαφέρον, πάντως, συνεχίζεται αμείωτο, στο βαθμό που η θεραπευτική στόχευση συγκεκριμένων σημείων της διαφοροποίησης ή και η χρήση συγκεκριμένων υποπληθυσμών μνημονικών CTLs αναμένεται να επιλύσει πολλά από τα προβλήματα των εμβολιασμών έναντι των ενδοκυττάριων παθογόνων, καθώς και της ανοσοθεραπείας του καρκίνου [42, 58].

Η επαφή με το αντιγόνο αποτελεί προφανώς προϋπόθεση για την επαγωγή της διαφοροποίησης των $CD8^+$ Τ-κυττάρων. Πολλά όμως από τα επακόλουθα της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

αντιγονικής διέγερσης, όπως η έκπτυξη των κλώνων, έχει πλέον καλά τεκμηριωθεί ότι αντιπροσωπεύουν προγραμματισμένες διεργασίες, ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση του αντιγόνου [59, 60, 61] (**Εικόνα 7**). Αντίθετα, η ισχύς και ποιότητα των σημάτων που μεταβιβάζονται από τον TcR (βλέπε παρακάτω), η συνδιέγερση, οι διάφορες ομοιοστατικές κυτταροκίνες και η φλεγμονή συνιστούν εξίσου σημαντικές παραμέτρους της διαφοροποίησης των CD8$^+$ Τ-κυττάρων. Όσο ισχυρότερη είναι η αθροιστική επίδραση αυτών των παραμέτρων πάνω στο διαφοροποιούμενο CD8$^+$ Τ-κύτταρο, τόσο μεγαλύτερο είναι το δυναμικό που αποκτά, ώστε να εξελιχθεί σε αποτελεσματικά δραστικό κύτταρο. Αντίθετα, το δυναμικό διαφοροποίησής του σε μνημονικό κύτταρο προϋποθέτει μια ενδιάμεση ένταση σημάτων, πάνω από την οποία αρχίζει και πάλι να ελαττώνεται (**Εικόνα 8**) [62].



ΕΙΚΟΝΑ 7. Η προγραμματισμένη διαφοροποίηση των δραστικών και των μνημωνικών CD8+ Τ κυττάρων.

A Ο πολλαπλασιασμός τους εξαρτάται από την επαναλαμβανόμενη επαφή με το αντιγόνο. Κάθε κύτταρο που διεγείρεται από το αντιγόνο, διαιρείται και διαφοροποιείται προοδευτικά σε δραστικό και, στη συνέχεια, σε μνημονικό κύτταρο. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η αντιγονική διέγερση κάθε θυγατρικού κυττάρου είναι ουσιαστικής σημασίας, αφού η απομάκρυνση του αντιγόνου μπορεί να σταματήσει τη διαφοροποίηση. **B** Τα CD8$^+$ Τ-κύτταρα είναι εξελικτικά προγραμματισμένα να υποστούν 7-10 διαιρέσεις και να διαφοροποιηθούν σε δραστικά και μακρόβια, λειτουργικά μνημονικά κύτταρα. Το αρχικό αντιγονικό ερέθισμα πυροδοτεί αυτό το εξελικτικό πρόγραμμα, έτσι ώστε ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των CTLs να αποτελούν δεσμευτικές διεργασίες. Η συνέχιση της αντογονικής διέγερσης των θυγατρικών κυττάρων ενδέχεται να αυξάνει τον αριθμό των διαιρέσεων των ενεργοποιημένων CTLs, αλλά δεν είναι απαραίτητο να οδηγεί σε ολοκλήρωση του προγράμματος διαφοροποίησης.

ΕΙΚΟΝΑ 8. Τα διάφορα σήματα που καθορίζουν τη διαφοροποίηση των CD8+ Τ-κυττάρων και ο τρόπος που επιδρούν στη δραστική και τη μνημονική διαφοροποίησή τους [62].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

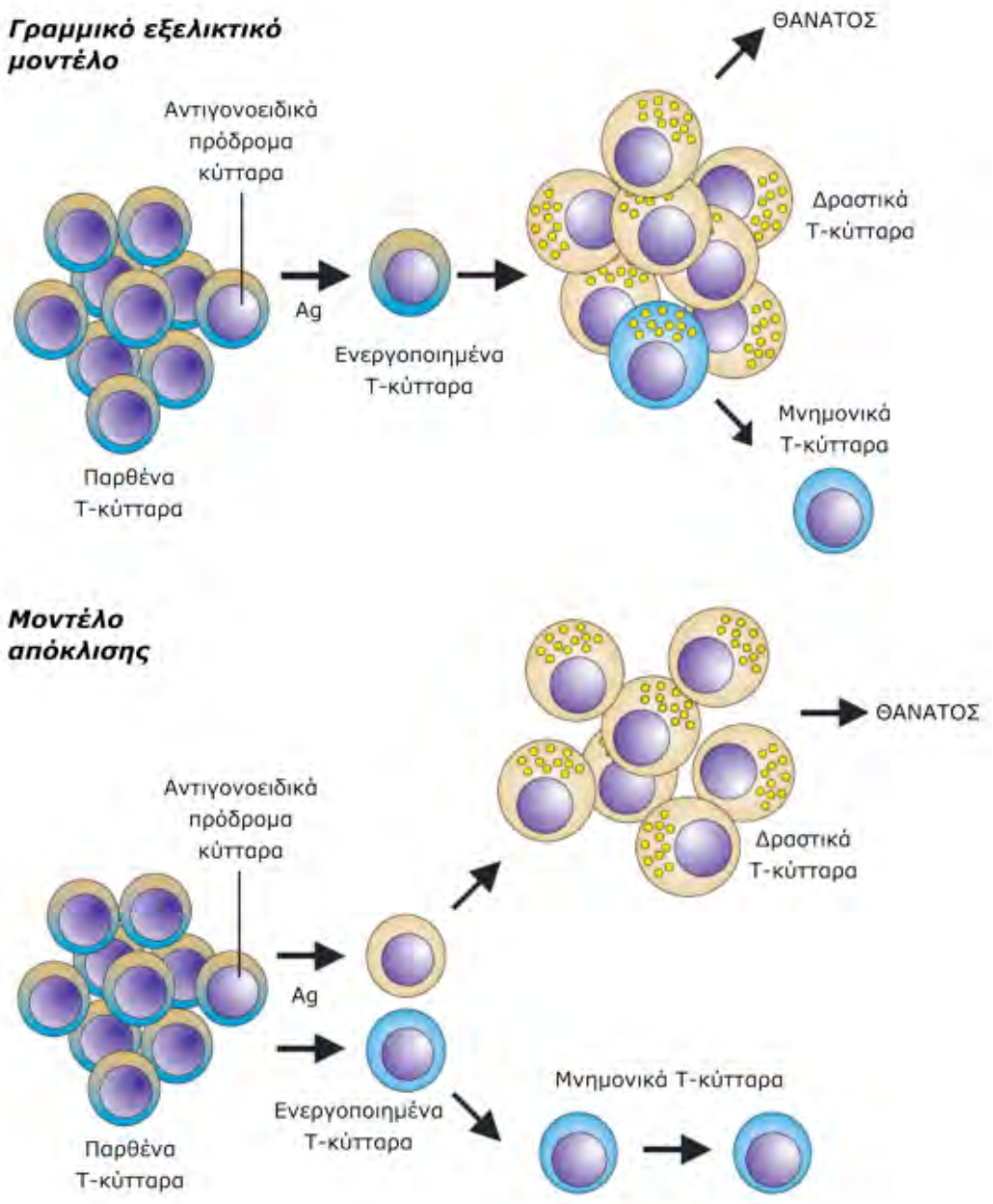
Για την περιγραφή της διαφοροποίησης των $CD8^+$ Τ-κυττάρων έχουν διατυπωθεί δύο βασικά μοντέλα (**Εικόνα 9**) [63]. Σύμφωνα με το πρώτο από αυτά, το φερόμενο ως *γραμμικό εξελικτικό μοντέλο* (linear progression model), μετά από την αντιγονική διέγερση, τα παρθένα κύτταρα διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα. Η πλειονότητα των εκπτυχθέντων αντιγονοειδικών κυττάρων αυτού του δραστικού πληθυσμού υπόκειται σε απόπτωση, ενώ ένα ποσοστό του επιβιώνει και εξελίσσεται σε μνημονικά κύτταρα. Κατά το μοντέλο αυτό, δηλαδή, τα μνημονικά κύτταρα αποτελούν άμεσους απογόνους των δραστικών.

Το δεύτερο, γνωστό ως *μοντέλο απόκλισης* (branched or divergent differentiation model), εισηγείται ότι τα δραστικά και μνημονικά κύτταρα αποτελούν δύο διακριτούς πληθυσμούς που, μετά από τη διέγερση των παρθένων κυττάρων, προκύπτουν από τον κοινό πρόδρομο ως ανεξάρτητες κυτταρικές γραμμές. Δέχεται, δηλαδή, ότι τα παρθένα κύτταρα μπορούν να εξελιχθούν κατ' ευθείαν σε μνημονικά, παρακάμπτοντας το στάδιο του δραστικού κυττάρου. Μετά την κάθαρση του αντιγόνου ο δραστικός πληθυσμός πεθαίνει, ενώ ο μνημονικός παραμένει.

Στο βαθμό που τα παραπάνω μοντέλα δεν καλύπτουν την πολυπλοκότητα της διεργασίας, οι Lanzavecchia και Sallusto [54] πρότειναν πρόσφατα ένα νέο *μοντέλο ισχύος του σήματος* (strength of signal model). Η ισχύς του σήματος που μεταβιβάζεται από τον TcR, δεν εξαρτάται μόνο από το αντιγόνο και τα συνδιεγερτικά μόρια, αλλά και από τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης των Τ-κυττάρων με τα APCs, η οποία μπορεί να ποικίλλει από μερικά λεπτά έως πολλές ώρες. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι η ισχύς του TcR-σήματος επηρεάζει καθοριστικά τη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων. $CD8^+$ Τ-κύτταρα που υποβάλλονται σε ασθενή ή ταχεία διέγερση, αρχίζουν να διαφοροποιούνται, αλλά αδυνατούν να επιβιώσουν (unfitted or neglected), επειδή δεν αποκτούν τα βασικά χαρακτηριστικά των μνημονικών κυττάρων, δηλαδή έκφραση αντι-αποπτωτικών μορίων και απαντητικότητα στις ομοιοστατικές κυτταροκίνες. Αυξανομένης της ισχύος του αντιγονικού σήματος επέρχεται η *Τ-κυτταρική ευεξία* (T-cell fitness), τα διεγειρόμενα κύτταρα δηλαδή καθίστανται ικανά να επιβιώνουν απουσία αντιγόνου και να απαντούν με πολλαπλασιασμό στα ερεθίσματα των ομοιοστατικών κυτταροκινών [64]. Σύμφωνα, λοιπόν, με το μοντέλο της ισχύος του σήματος, η ισχύς των σημάτων του TcR και των υποδοχέων των κυτταροκινών οδηγεί τα Τ-κύτταρα σε μια διαδοχή ιεραρχημένων ουδών διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα την προοδευτική εμφάνιση Τ-κυτταρικής ευεξίας, πολλαπλασιασμού, δραστικών λειτουργιών και, κατά περίπτωση, θανάτου [65]. Επειδή η διέγερση του TcR και των υποδοχέων των κυτταροκινών είναι στοχαστικά γεγονότα, όλα τα πολλαπλασιαζόμενα Τ-κύτταρα δεν δέχονται την ίδια ισχύ σήματος. Έτσι, όλα τα Τ-κύτταρα που δέχθηκαν το αντιγονικό ερέθισμα δεν θα καταλήξουν στο ίδιο στάδιο διαφοροποίησης. Αντίθετα, θα φτάσουν σε μια ποικιλία σταδίων διαφοροποίησης, από το στάδιο του δραστικού κυττάρου έως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

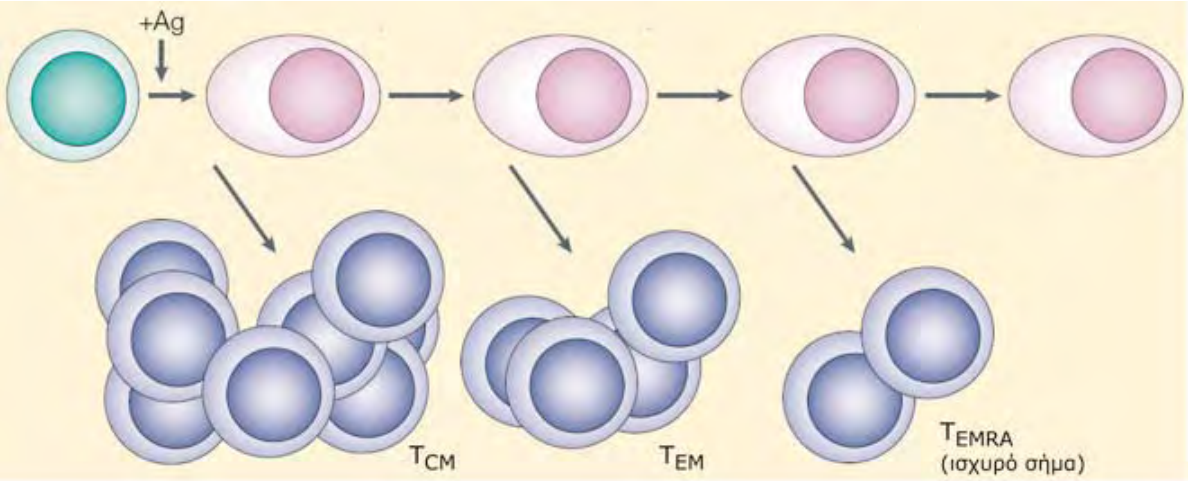
κύτταρα, των οποίων η διαφοροποίηση έχει ανασταλεί σε διάφορα ενδιάμεσα επίπεδα. Αυτά τα ενδιάμεσα κύτταρα διατηρούν την έκφραση των υποδοχέων εγκατάστασης στους λεμφαδένες, που είχαν ως παρθένα κύτταρα, ενώ αρχίζουν αλλά δεν ολοκληρώνουν τις διεργασίες αναδιαμόρφωσης των γονιδίων τους που εμπλέκονται στις δραστικές λειτουργίες. Αυτό το φάσμα των ενδιάμεσων κυττάρων, μετά από την κάθαρση του αντιγόνου, εξελίσσεται στους διακριτούς υποπληθυσμούς των T_{CM} και T_{EM}. Η εξαιρετικά μεγάλη ισχύς σήματος, όπως π.χ. εκείνη του παρατεταμένου αντιγονικού ερεθίσματος των χρονίων λοιμώξεων, προκαλεί έκπτυξη και διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων σε T_{EMRA}, τα οποία δεν διαθέτουν την Τ-κυτταρική ευελιξία που απαιτείται, ώστε να καταστούν λειτουργικά μνημονικά κύτταρα (**Εικόνα 10**, σελίδα 36).



ΕΙΚΟΝΑ 9. Τα δύο βασικά μοντέλα διαφοροποίησης των $CD8^+$ Τ-κυττάρων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Ένα ανάλογο με το παραπάνω μοντέλο της ισχύος του σήματος, το *μοντέλο Golgilocks*, έχει προτείνει η ομάδα του Ahmed [66, 67, 68]. Παραλλαγή, επίσης, του ίδιου μοντέλου αποτελεί και εκείνο που προτείνεται από τους Pearce και Shen [62]. Οι τελευταίοι, πρακτικά, συμπεριλαμβάνουν στο μοντέλο της ισχύος του σήματος, την επίδραση που φαίνεται να ασκεί πάνω στη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων, η φλεγμονή. Βασιζόμενοι σε δικά τους ερευνητικά δεδομένα, υποστηρίζουν ότι η διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων επηρεάζεται σημαντικά από εξωγενή σήματα, τα οποία μεταβάλλουν τον επιγενετικό προγραμματισμό των ενεργοποιουμένων $CD8^+$ Τ-κυττάρων. Το μοντέλο αυτό δίνει ιδιαίτερη έμφαση στον καθοριστικό ρόλο που διαδραματίζουν στην εξέλιξη της Τ-κυτταρικής μνήμης, οι συνθήκες που επικρατούν τη στιγμή που αρχίζει η διέγερση των παρθένων κυττάρων.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Το μοντέλο ισχύος του σήματος.

1.2.4 Τ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΝΗΜΗ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ

Η μόνιμη παρουσία του αντιγονικού ερεθίσματος στον οργανισμό, όπως συμβαίνει στις χρόνιες λοιμώξεις και στον καρκίνο, υποχρεώνει σε συνεχή δημιουργία T_{EFF}, πολλές φορές καθόλη της διάρκεια της ζωής. Ο Fearon [69] υποστηρίζει ότι η ικανότητα των μνημονικών $CD8^+$ Τ-κυτταρικών κλώνων να συντηρούν τη συνεχή παραγωγή T_{EFF}, κατά τη διάρκεια περιόδων μόνιμης αντιγονικής διέγερσης, ακολουθεί ένα πρόγραμμα κλωνικής έκπτυξης που εξελίσσεται σε δύο διαδοχικές φάσεις. Η πρώτη φάση λαμβάνει χώρα κυρίως στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και μεσολαβείται από τη σύνδεση του TcR και του CD27, ενώ η δεύτερη εξαρτάται από την IL-2 και λαμβάνει χώρα κυρίως στους περιφερικούς μη λεμφικούς ιστούς. Από την TCR/CD27-εξαρτώμενη φάση δημιουργείται μια δεξαμενή μη διαφοροποιουμένων, αλλά αυτοανανεούμενων, κλωνικά εκπτυσσομένων κυττάρων. Κατά την IL-2-εξαρτώμενη φάση, η κλωνική έκπτυξη συνοδεύεται από τη δημιουργία T_{EFF}. Η ασύμμετρη διαίρεση του υποληθυσμού των αυτοανανεούμενων κυττάρων είναι η διεργασία που διατηρεί την επικοινωνία των δύο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

δεξαμενών. Σε σταθερές καταστάσεις, από κάθε κυτταρικό διπλασιασμό που συμβαίνει στην TCR/CD27-εξαρτώμενη δεξαμενή, προκύπτει ένα θυγατρικό κύτταρο που παραμένει αδιαφοροποίητο και ένα άλλο που δεσμεύεται προς την κατεύθυνση της IL-2-εξαρτώμενης τελικής διαφοροποίησης. Το σχήμα αυτό συνοδεύεται από αλλαγή της $CD8^+$ Τ-κυτταρικής απάντησης προς την κατεύθυνση αφενός της παραγωγής IFN τύπου I και II και αφετέρου του μεταγραφικού ελέγχου της γήρανσης από πολλαπλασιασμό (replicative senescence)‡ με τη βοήθεια των Bmi-1, Blimp-1 και BCL6/BCL6b. Έτσι, παρά τη γήρανση των κυττάρων, εξασφαλίζεται η επιβίωση των αντιγονοειδικών κλώνων καθόλη τη διάρκεια της χρόνιας αντιγονικής διέγερσης.

Είναι προφανές ότι το παραπάνω σχήμα διαφοροποίησης μπορεί να ισχύει σε καταστάσεις συνεχούς μεν, αλλά ελεγχόμενης αντιγονικής διέγερσης (π.χ. λανθάνουσες ιογενείς λοιμώξεις). Η τύχη και η ακολουθία των διεργασιών, σε περιπτώσεις που η ανοσιακή απάντηση δεν επιτυγχάνει τον έλεγχο της βλάβης, όπως στις χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις και στον καρκίνο, είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί από οποιοδήποτε μοντέλο. Μια μεγάλη σειρά, περισσότερο ή λιγότερο άμεσων ερευνητικών δεδομένων υποδεικνύει ότι, σε αυτές τις τελευταίες καταστάσεις στον καρκίνο, παρατηρούνται διάφορες διαταραχές («αλλοιώσεις») της Τ-κυτταρικής μνήμης, που αφορούν τη δυνατότητα των μνημονικών CTLs να αναπτύσσουν λειτουργικότητα, το βαθμό αυτής της λειτουργικότητας, την ικανότητά τους για ανεξάρτητο από το αντιγόνο και μεσολαβούμενο από κυτταροκίνες ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό τους, την ικανότητα πολλαπλασιασμού και, τελικά, τη δυνατότητά τους να εξυπηρετούν την άμυνα του οργανισμού.

Ο μεγαλύτερος όγκος των σχετικών ερευνητικών δεδομένων προέρχεται από μελέτες σε ιογενείς λοιμώξεις, ενώ οι εγκυρότερες από τις πληροφορίες, που αφορούν τον καρκίνο, είναι έμμεσες και έχουν σχέση με την επιτυχία διαφόρων πρωτοκόλλων παθητικής ανοσοθεραπείας (adoptive immunotherapy). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η κλινική αποτελεσματικότητα της παθητικής ανοσοθεραπείας συσχετίζεται θετικά με το μήκος των τελομερών [70] και με το βαθμό της ικανότητας *in vivo* πολλαπλασιασμού των χορηγουμένων CTLs [71, 72]. Επίσης, οι Gattinoni et al [73] έχουν δείξει ότι η επαναλαμβανόμενη *in vitro* διέγερση των CD8+ Τ-κυττάρων με πεπτίδια του TAA gp100 συνοδεύεται από προοδευτική μείωση της λειτουργικότητάς τους και της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται. Όσον αφορά την απάντηση στα TAA, η γήρανση των μνημονικών CTLs από πολλαπλασιασμό [74, 75] και οι συνέπειες του φαινομένου της ανοσοεπικράτησης (immunodominance) έχουν απασχολήσει ιδιαίτερα τους ερευνητές, χωρίς όμως να έχει διαμορφωθεί ακόμη κάποια σαφής άποψη.

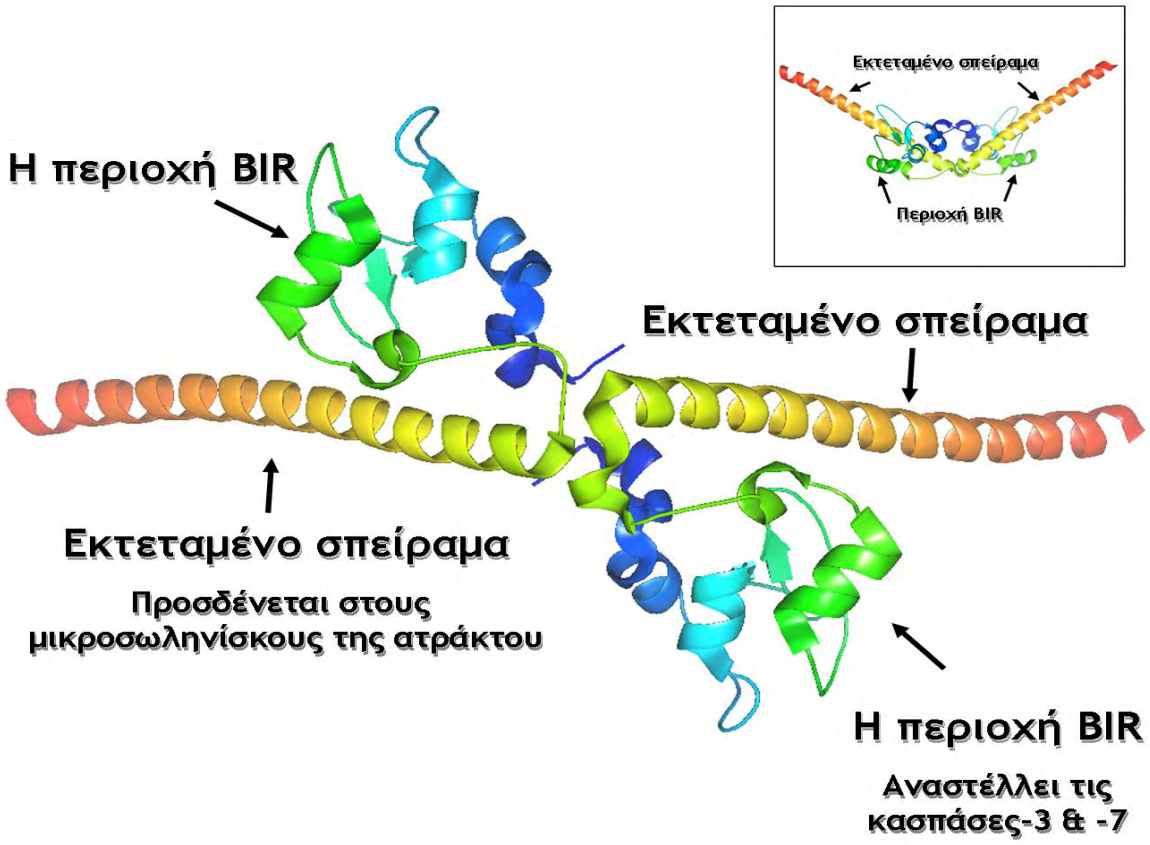
‡ Ως γήρανση από πολλαπλασιασμό (replicative senescence) φέρεται η αδυναμία των κυττάρων να διαιρούνται, μετά από έναν ορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1.3 Η σαρβιβίνη ως αντιγόνο των όγκων

Το γονίδιο της σαρβιβίνης έχει μέγεθος 14,7 kb και εντοπίζεται στην περιοχή q25 του χρωμοσώματος 17. Αποτελείται από 3 εσώνια και 7 εξόνια (4 κανονικά και 3 κρυπτικά), ενώ ανοδικά του εξονίου 1 εντοπίζεται η ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου, που περιλαμβάνει το στοιχείο TATA και μια αλληλουχία 200 nt πλούσια σε GC [76]. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι μέσω εναλλακτικού ματίσματος δημιουργούνται 4 διαφορετικοί υπότυποι της σαρβιβίνης πέραν του τυπικού: η σαρβιβίνη-2B (165 aa), η σαρβιβίνη-ΔEx3 (137 aa), η σαρβιβίνη-3B (120 aa) και η σαρβιβίνη-2α (74 aa).

Η πρωτεΐνη σαρβιβίνη που αποτελεί την τυπική μορφή έκφρασης του γονιδίου, συντίθεται από τα εξόνια 1, 2, 3 και 4, έχει μέγεθος 16,5 kD και αποτελείται από 142 aa. Έχει βρεθεί κρυσταλλογραφικά ότι δρα με τη μορφή ομοδιμερούς συμπλόκου [77, 78] (**Εικόνα 11**). Η ένωση του ομοδιμερούς γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ δύο αντιπαράλληλων β-φύλλων, τα οποία σχηματίζονται από τα αμινοξέα 94–99 [77]. Ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών, η λειτουργία των οποίων συνίσταται στην αναστολή της απόπτωσης και την προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης και ονομάζονται IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) [79]. Οι IAPs χαρακτηρίζονται από μια ή περισσότερες επαναλήψεις μιας συγκεκριμένης πρωτεϊνικής περιοχής, που



ΕΙΚΟΝΑ 11. Η δομή της σαρβιβίνης, σε ομοδιμερή μορφή, από δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες. Διακρίνονται οι δύο σημαντικότερες δομικές και λειτουργικές περιοχές της, η περιοχή BIR και το εκτεταμένο C-τελικό σπείραμα [77].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ονομάζεται BIR (baculoviral IAP repeat). Η σαρβιβίνη φέρει μόνο μια τέτοια περιοχή, που είναι υπεύθυνη για την αντιαποπτωτική δράση της, μια περιοχή δέσμευσης ψευδαργύρου (zinc finger domain), καθώς και μια εκτεταμένη α-έλικα στο C-τελικό τμήμα του μορίου της. Η περιοχή BIR έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει τη δράση των κασπασών [79, 80], μόρια τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο μονοπάτι της απόπτωσης στο κύτταρο. Στόχο της σαρβιβίνης αποτελούν κυρίως οι κασπάσες 3 και 7 [81, 82], ενώ υπάρχουν και ενδείξεις για αναστολή της κασπάσης 9 [83], οι οποίες, όμως, δεν έχουν επιβεβαιωθεί ακόμα.

Πέρα όμως από την αλληλεπίδραση της σαρβιβίνης με τις κασπάσες, γεγονός που εξηγεί τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της, έχει βρεθεί πως μια ποσότητά της εντοπίζεται εντός του πυρήνα. Η αναλογία, μάλιστα, κυτταροπλασματικής:πυρηνικής πρωτεΐνης είναι της τάξεως του 6:1 [84]. Είναι, επίσης, γνωστό πως η σαρβιβίνη μπορεί να δημιουργεί σύμπλοκα με τα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων ή με την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση Cdk4 [85, 86], γεγονός που υποδεικνύει εμπλοκή της σαρβιβίνης στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι μπορεί να προσδεθεί στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου [87] και τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων [88], κυρίως μέσω του εκτεταμένου σπειράματος της C-τελικής περιοχής της [77]. Η συσχέτιση αυτή της σαρβιβίνης με τη μιτωτική άτρακτο θεωρείται ότι σταθεροποιεί το μιτωτικό μηχανισμό και βοηθά στην ομαλή ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης [89]. Λόγω, λοιπόν, αυτής της διπλής αλληλεπίδρασης (αναστολή της απόπτωσης και σταθεροποίηση του μιτωτικού μηχανισμού), επικράτησε η άποψη ότι η σαρβιβίνη ευοδώνει σε ρυθμιστικό επίπεδο τη σύνδεση μεταξύ απόπτωσης και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου [90].

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 κ.λπ.) [91, 92], ενώ στην πλειοψηφία των ενήλικων ιστών δεν υπάρχει ανιχνεύσιμη έκφρασή του [76]. Επιπρόσθετα, πειράματα με ποντίκια που στερούνταν το γονίδιο της σαρβιβίνης, απέδειξαν ότι είναι απολύτως απαραίτητη κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη [93].

Η τυπική ισομορφή της σαρβιβίνης υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους νεοπλασιών (λεμφώματα, καρκίνος του μαστού, του οισοφάγου, του εγκεφάλου, της μήτρας, σαρκώματα, μελανώματα κ.ά.) [91]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η υπερέκφραση της σαρβιβίνης αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και επιπλέον ενισχύει την αντίστασή τους έναντι των χημειοθεραπευτικών παραγόντων [90]. Σε πολλές, μάλιστα, περιπτώσεις, τα επίπεδα έκφρασής της σχετίζονται με την επιθετικότητα του όγκου [94, 95, 96]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση, σε μελέτες δειγμάτων από ορθοπρωκτικές νεοπλασίες, ότι η έκφραση της σαρβιβίνης αυξάνεται με τη μετάβαση από αδενώματα χαμηλής δυσπλασίας σε καρκινώματα υψηλής δυσπλασίας [97].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Επίτοποι της σαρβιβίνης που αναγνωρίζονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα [99].

HLA	Πεπτίδιο	Αλληλουχία
HLA-A1	Sur 93T2*	FTELTLGEF
	Sur 92 – 101	QFEELTLGEF
	Sur 47Y10*	PTENEPDLAQ
	Sur 38Y9*	MAEAGFIHY
HLA-A2	Sur 18 – 28	RISTFKNWPFL
	Sur 86 – 96	FLSVKKQFEEL
	Sur 95 – 104 (Sur 9)	ELTLGEFLKL
	Sur 96 – 104 (Sur 1)	LTLGEFLKL
	Sur 1M2*	LLGEFLKL
	Sur 95 – 104 (Sur 9)	ELTLGEFLKL
	Sur 96 – 104 (Sur 1)	LTLGEFLKL
	Sur 95 – 104	ELTLGEFLKL
	Sur 5 – 14	TLPPAWQPFL
	Sur 61 – 69	FKELEGWEP
	Sur 104 – 113	LDRERAKNKI
	Sur 104 L2 I9*	FLELEGWEI
HLA-A3	Sur 112 – 120	KIAKETNNK
	Sur 112 – 121	KIAKETNNKK
	Sur 5K9*	TLPPAWQPK
	Sur 54L2*	LLQCFFFK
	Sur 18K10	RISTFKNWPK
HLA-A11	Sur 53 – 62	DLAQCFFCFK
	Sur 54 – 62	LAQCFFCFK
	Sur 112 – 120	KIAKETNNK
HLA-A24	Sur 2B 80 – 88	AYACNTSTL
HLA-B35	Sur 46 – 54	CPTENEPDL
	Sur 51 – 59	EPDLAQCFF
	Sur 46Y9*	CPTENEPDY
	Sur 51Y9*	EPDLAQCFY

* Τροποποιημένα πεπτίδια με αντικατάσταση αμινοξέων

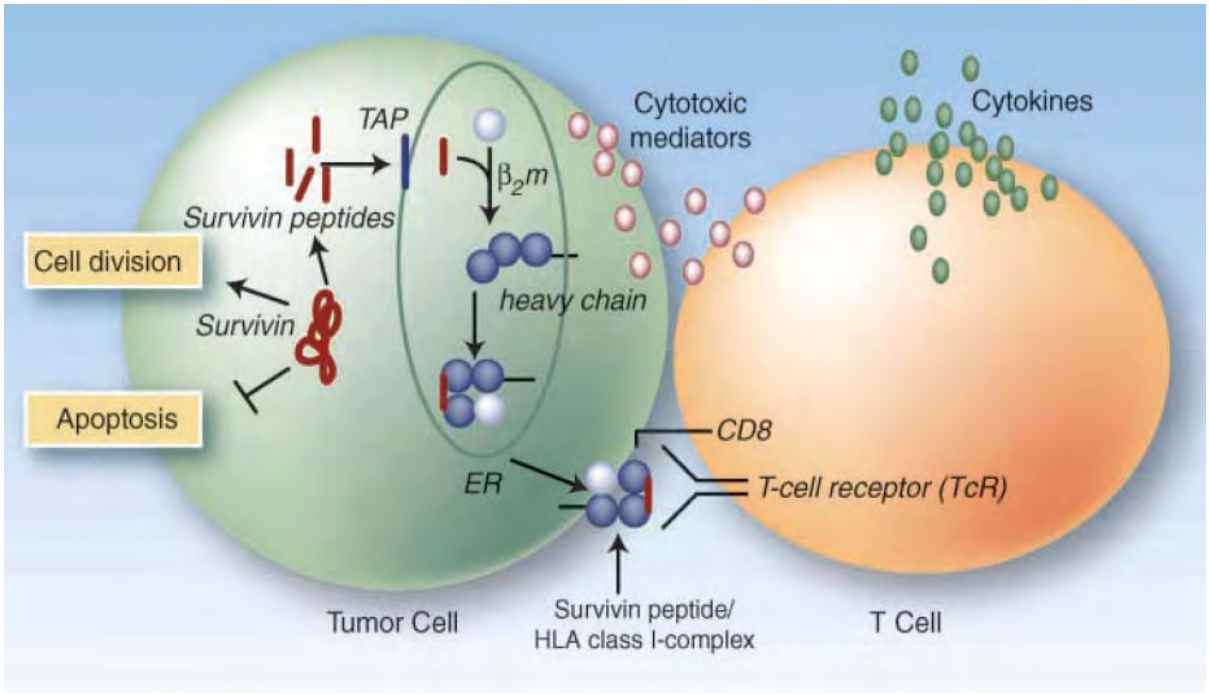
Ως αντιγόνο των όγκων, η σαρβιβίνη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ανοσοθεραπευτικών προσπαθειών έναντι του καρκίνου. Εκτός από την υπερέκφρασή της, ο βιολογικός ρόλος της (αναστολή της απόπτωσης και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου) την καθιστά απαραίτητη για την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου, με αποτέλεσμα η έκφρασή της να μην αναστέλλεται κατά την πορεία της νόσου. Στο πλαίσιο αυτό, η Τ-κυτταρική απάντηση έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης έχει εκτεταμένα μελετηθεί [98, 99].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Ανοσιακή κυτταρική απάντηση έναντι της σαρβιβίνης έχει ανιχνευτεί σε ασθενείς με καρκίνο αλλά όχι σε υγιείς [100]. Σε αρκετές ερευνητικές προσπάθειες εντοπίστηκαν HLA-A2 ή -A24-περιορισμένες αυτόματες CD8 T απαντήσεις έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης και της σαρβιβίνης-2B κατά τις οποίες ειδικά CD8 T κυτταρολυτικά κύτταρα ήταν ικανά να σκοτώσουν καρκινικά κύτταρα (τα τελευταία εξέφραζαν σαρβιβίνη και σαρβιβίνη-2B) δικαιολογώντας έτσι την τρέχουσα χρήση τους σε αντικαρκινικά εμβόλια. Εν τούτοις, υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες για την συχνότητα των CTLs, ειδικών για τα παραπάνω πεπτίδια, ο βιολογικός ρόλος των οποίων δεν έχει μέχρι στιγμής περιγραφεί λεπτομερώς, παρά το γεγονός ότι η παρουσία τους έχει συνδυαστεί με την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας [101].

Οι θεραπείες με σαρβιβίνη, αναμένεται να ασκήσουν περιορισμένη τοξικότητα για τους φυσιολογικούς ιστούς, δεδομένου ότι εκφράζεται σε μικρές ποσότητες σε φυσιολογικά κύτταρα, και να είναι αποτελεσματική στην εξάλειψη των μηχανισμών βιωσιμότητας των κυττάρων που είναι αντικείμενο εκμετάλλευσης από τα καρκινικά [102]. Η σαρβιβίνη παράγεται κανονικά σε τέτοιες μικρές ποσότητες και από τόσα λίγα κύτταρα ώστε να μην είναι αναγνωρίσιμα από το ανοσοποιητικό σύστημα, και ως εκ τούτου να προκαλείται ανοχή [103].

Στον πίνακα 2 φαίνονται τα πεπτίδια (φυσικά και τροποποιημένα) της σαρβιβίνης που έχει μέχρι τώρα διαπιστωθεί ότι αναγνωρίζονται από τα Τ-κύτταρα και επάγουν κυτταρολυτική απάντηση (**Εικόνα 12**), κυρίως σε ασθενείς με μελάνωμα [104, 105] και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία [106, 107].

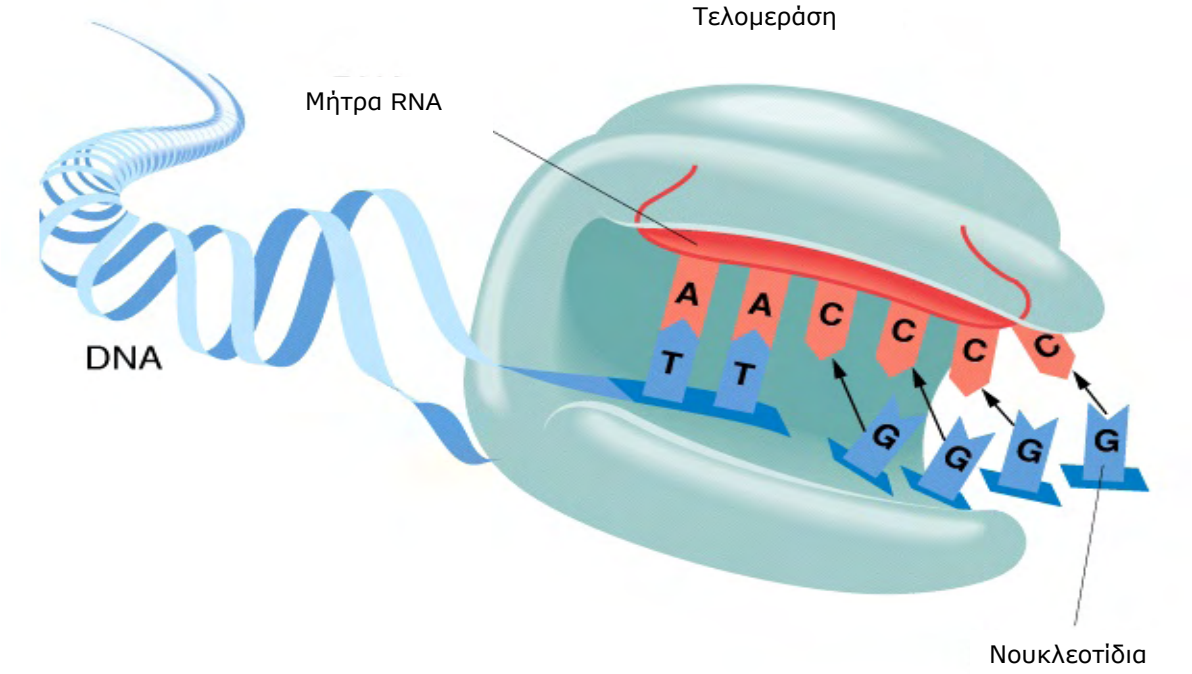


ΕΙΚΟΝΑ 12. Επεξεργασία και παρουσίαση της σαρβιβίνης στον TcR του $CD8^+$ κυτταρολυτικού Τ-κυττάρου [98].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1.4 Η τελομεράση ως αντιγόνο των όγκων

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο απαραίτητο για τη σύζευξη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών TTAGGG, από πολλαπλές επαναλήψεις των οποίων αποτελούνται τα τελομερή. Κατ' αυτό τον τρόπο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση του μήκους των τελομερών και, κατά συνέπεια, στη σταθερότητα των κυττάρων. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τις ακόλουθες υποομάδες: (α) Την TERC, ένα μόριο RNA αποτελούμενο από 451 νουκλεοτίδια [108], (β) την hTERT, μια πρωτεϊνική υπομονάδα με καταλυτική δράση [109], και (γ) διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την τελομεράση [110, 111]. 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 13**). Πρακτικά, δημιουργεί αντίγραφα του πλαισίου των 6 νουκλεοτιδίων TTAGGG.



ΕΙΚΟΝΑ 13: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της τελομεράσης.

Το γονίδιο της TERC εντοπίζεται στη θέση 3q26.3, έχει έκταση περίπου 4 kb και βρίσκεται σε ένα μόνο αντίγραφο [112], ενώ το γονίδιο της hTERT εντοπίζεται στην περιοχή p15.33 του χρωμοσώματος 5 και έχει έκταση 37,2 kb [113]. Το γονίδιο της hTERT αποτελείται από 15 ιντρόνια και 16 εξόνια, το μέγεθος των οποίων ποικίλλει από 62 μέχρι 1354 bp, και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 127 kD, που αποτελείται από 1132 αμινοξέα. Μελέτες σε μοριακό επίπεδο ανέδειξαν μια ποικιλία προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της hTERT, τόσο σε φυσιολογικά, όσο και σε καρκινικά κύτταρα [114].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

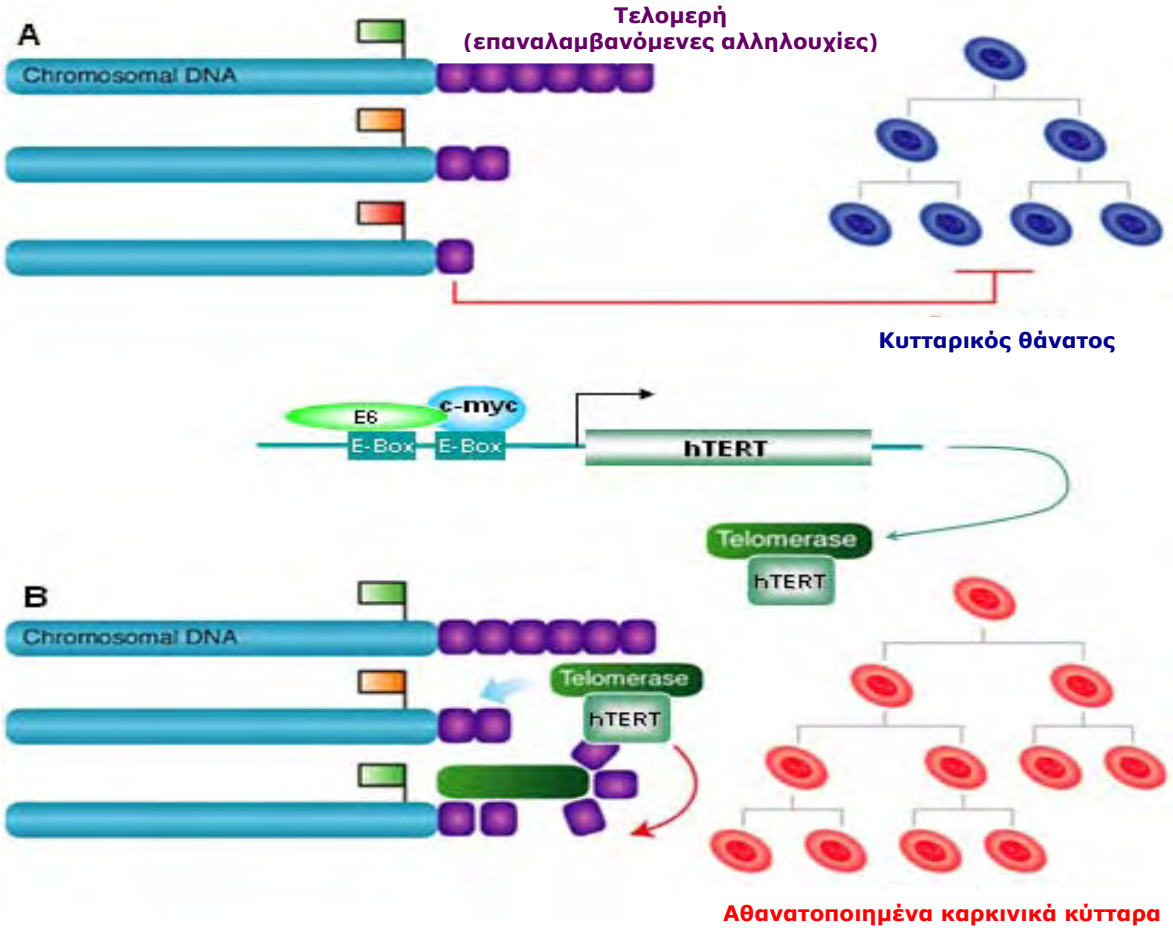
Η ρύθμιση της τελομεράσης επιτυγχάνεται μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας και περιλαμβάνει την έκφραση του γονιδίου της τελομεράσης, μετα-μεταφραστικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών [115]. Πολλά πρωτο-ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως τα *c-Myc, Bcl-2, p21^{WAF1}, Rb, p53, PKC* και *Akt/PKB*, συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα, στο μηχανισμό ρύθμισης της Τa [116]. Έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσοτικής έκφρασης του mRNA του γονιδίου της hTERT και της Τa, που υποδηλώνει ότι η Τa ρυθμίζεται και σε επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου της hTERT [117]. Ο χαρακτηρισμός του υποκινητή (promoter) του γονιδίου της hTERT βοήθησε στην αναγνώριση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων με θετική ή αρνητική ρυθμιστική δράση [118]. Ενίσχυση του γονιδίου (gene amplification) 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 Τa [119].

Η Τa 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. Εξαίρεση αποτελούν οι έντονα πολλαπλασιαζόμενοι ιστοί, όπως τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα γαμετικά κύτταρα, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, οι ινοβλάστες και τα κύτταρα των κρυπτών του εντέρου [120].

Στα σωματικά κύτταρα, το μήκος των τελομερών, 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 14**), συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην αθανατοποίηση των κυττάρων [121]. Υπάρχουν επαρκή στοιχεία που δείχνουν ότι τα βραχέα 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 (checkpoints), 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 [122]. Η πλειοψηφία των κυττάρων (85–90%) που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

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 [123].



ΕΙΚΟΝΑ 14. Ρύθμιση του μήκους των τελομερών στα σωματικά (A) και καρκινικά κύτταρα (B)

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 (replicative senescence). 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 [124, 125, 126]. Παράλληλα, φαίνεται ότι η έκφραση της hTERT, ελέγχεται από μηχανισμό παλίνδρομης ανατροφοδότησης [127].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

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 [128].

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Επίτοποι της hTERT που αναγνωρίζονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα [134].

hTERT πεπτίδια	Αλληλουχία	HLA	Τ-κύτταρα
p540	ILAKFLHWL	HLA-A2	$CD8^+$
p572	RLFFYRKSV	HLA-A2	$CD8^+$
p865	RLVDDFLLV	HLA-A2	$CD8^+$
p988	DLQVNSLQTV	HLA-A2	$CD8^+$
p324	VYAETKHFL	HLA-A24	$CD8^+$
p461	VYHFVRACL	HLA-A24	$CD8^+$
p973	KLFGVLRLK	HLA-A3	$CD8^+$
p672	RPGLLGASVLGLDDI	HLA-DR1,-7,-15	$CD4^+$
p766	LTDLQPYMRQFVAHL	HLA-DR4,-11,-15	$CD4^+$

Η hTERT αποτελεί ένα ευρέως εκφραζόμενο TAA [129] 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, συνδεόμενα με τάξης I/II MHC-μόρια και μπορούν να επάγουν ανοσολογικές αποκρίσεις μεσολαβούμενες από Τ-κύτταρα 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 πεδίο εντατικής έρευνας, καθώς τα πεπτίδια αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή εμβολίων κατά του καρκίνου [130].

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 [131]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μεταγενέστερη μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια [132]. 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 Τ λεμφοκύτταρα) [131, 132, 133].

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά ανοσογονικά πεπτίδια της hTERT (**Πίνακας 3**) [134]. Οι διαφορετικοί επίτοποι του γονιδίου της hTERT συνδέονται με διαφορετικά HLA αλληλόμορφα, επάγοντας ειδικές $CD8^+$ αλλά και $CD4^+$ κυτταρικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

απαντήσεις. Διαφαίνεται ότι οι διάφοροι όγκοι μπορούν να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν συγκεκριμένα πεπτίδια της hTERT σε σύνδεση με συγκεκριμένα HLA μόρια [135]. Σε κάποιες μελέτες σε κυτταρικές σειρές, φάνηκε όμως ότι τα ειδικά CTLs έναντι του πεπτιδίου p540 της hTERT δεν μπόρεσαν να αναγνωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα που εξέφραζαν hTERT [136]. 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 [137]. 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 έχουν εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί ως «οχήματα» στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, για την ενίσχυση των ανοσιακών αποκρίσεων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Nair et al [138], 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.

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 6 από τους 10 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο νεφρού, μετά τον εμβολιασμό τους με DCs διαμολυσμένα με RNA [139]. Όσον αφορά την κλινική ανταπόκριση, αναφέρεται ότι οι 7 ασθενείς ζούσαν, μετά από παρακολούθηση 19,8 μηνών. Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν και σε μια ακόμη μελέτη, όπου ανιχνεύτηκαν ειδικές $CD8^+$ και $CD4^+$ Τ-κυτταρικές απαντήσεις, σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Σε μια άλλη μελέτη, ο εμβολιασμός με το πεπτίδιο p540 της hTERT ενεργοποίησε ειδική CTL-απόκριση, στους 4 από τους 7 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο μαστού ή προστάτη και οδήγησε σε μερική υποχώρηση του όγκου, σε έναν ασθενή [140].

Στη μελέτη των Brunsvig et al χορηγήθηκε σε 24 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, εμβόλιο που περιλάμβανε συνδυασμό πεπτιδίων της hTERT (GV1001:p611–626 και HR2822:p540–548) [141]. Ειδική ανοσιακή απάντηση έναντι του GV1001, αναγνωρίστηκε συνολικά σε 13 ασθενείς και έναντι του HR2822 σε 2 ασθενείς. 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 μια ακόμη πρόσφατη μελέτη, ο εμβολιασμός 21 ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ανέδειξε την ικανότητα του πεπτιδίου p572 της hTERT, να ενεργοποιεί ειδικές $CD8^+$ ανοσιακές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

αποκρίσεις στην πλειοψηφία των ασθενών (στο 76,2% μετά το δεύτερο εμβολιασμό και στο 90,9% μετά τον έκτο εμβολιασμό) [142].

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 [143].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

2

ΥΛΙΚΟ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

2.1 Ασθενείς και Υγιείς Δότες

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 20 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του πνεύμονα (17 άνδρες, 3 γυναίκες) της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας) και 5 υγιείς δότες ιδίας ηλικίας (**Πίνακας 4 και 5**). Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη πραγματοποιήθηκε HLA τυποποίηση με PCR-SSP, και PCR-SSO και διαπιστώθηκε η παρουσία τουλάχιστον ενός από τα αλλήλια των μορίων ιστοσυμβατότητας HLA-A2 ή/ και HLA-A24. Η ανίχνευση CD8 Τ-κυτταρολυτικών κλώνων, όπως περιγράφεται στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς κατά την διάγνωση της νόσου, ενώ σε 5 από τους 9 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (αρ. 12, 14, 17, 19, 20) επαναπροσδιορίστηκε η συχνότητα ανίχνευσης pCTLs, 3 εβδομάδες μετά από 3-6 κύκλους θεραπείας βασισμένη σε πλατίνα. Επίσης, σε όσους ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση έγινε συλλογή καρκινικού ιστού, όταν αυτό ήταν δυνατό. Σε όλες τις περιπτώσεις που περιλαμβάνονται στη μελέτη, έγινε από γιατρό της Πνευμονολογικής Κλινικής σχετική ενημέρωση των ασθενών, οι οποίοι συγκατέθεσαν ενυπογράφως, σύμφωνα με τη Συνθήκη του Ελσίνκι.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων.

Αριθμός Δότη	Φύλο	HLA	Ηλικία (έτη)
N#1	Άνδρας	A2	55
N#2	Άνδρας	A2	54
N#3	Άνδρας	A24	54
N#4	Άνδρας	A2/24	60
N#5	Άνδρας	A2	57

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Αριθμός ασθενούς	Φύλο	HLA	Ηλικία (έτη)	Ιστολογικός τύπος	TNM	Στάδιο νόσου
1	Άνδρας	A2/24	74	ADC	T2N2M0	IIIA
2	Άνδρας	A2	75	NSCLC	T4N0M0	IIIB
3	Άνδρας	A24	73	SCC	T4N2M0	IIIB
4	Άνδρας	A24	45	ADC	T2N2M0	IIIA
5	Άνδρας	A2	81	ADC	T2N1M0	IIB
6	Άνδρας	A2	69	SCC	T2N0M0	IB
7	Γυναίκα	A24	59	ADC	T2N2M0	IIIA
8	Γυναίκα	A2	47	ADC	T1N0M0	IA
9	Άνδρας	A2	67	SCC	T1N0M0	IA
10	Άνδρας	A2	70	SCC	T2N0M0	IB
11	Άνδρας	A2	80	SCC	T2N0M0	IB
12	Άνδρας	A2/A24	59	SCLC	T2N1M0	IIB
13	Άνδρας	A2	56	SCLC	T4N2M1	IV
14	Άνδρας	A24	71	SCLC	T4N2M1	IV
15	Άνδρας	A24	74	SCLC	T3N0M0	IIB
16	Γυναίκα	A2	54	SCLC	T1N3M0	IIIB
17	Άνδρας	A24	74	SCLC	T4N2M0	IIIB
18	Άνδρας	A2	70	SCLC	T2N2M0	IIIA
19	Άνδρας	A2	63	SCLC	T2N3M0	IIB
20	Άνδρας	A2	71	SCLC	T4N3M0	IIIB

2.2 Πεπτίδια και HLA-πολυμερή

Χρησιμοποιήθηκαν 9μερή πεπτίδια, γνωστής ικανότητας σύνδεσης με τα -A2, ή -A24, που παρασκευάστηκαν με τη μεθοδολογία F-moc σε λυοφιλοποιημένη μορφή και σε καθαρότητα >90% (Abgent, San Diego, USA). Τα πεπτίδια διαλύονταν σε DMSO σε συγκέντρωση 10 mg/mL και διατηρούνταν στους –20°C μέχρι τη χρήση τους. Ως πεπτίδια ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτίδια σαρβιβίνης (Surv.A2), σαρβιβίνης-2B (Surv.A24), και τελομεράσης (hTERT.A2 και hTERT.A24) και ως πεπτίδια-μάρτυρες τα EBV-πεπτίδια (BMLF1.A2 και EBNA3C.A24). Όλα τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν, είναι δυνητικά προϊόντα επεξεργασίας από το φυσιολογικό πρωτεόσωμα (**Πίνακας 6**) και επιλέχθησαν με βάση την βιβλιογραφικά επιβεβαιωμένη ικανότητα να επάγουν αυτόματες ανοσιακές απαντήσεις [144].

HLA-πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αντιγονοειδικών CD8-Τ κυττάρων σε μικτούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς και την απεικόνιση της ειδικότητας των CTLs. Πρόκειται για τεχνητά HLA μόρια που αποτελούνται από τέσσερα ή περισσότερα πανομοιότυπα HLA μόρια τάξης Ι, καθένα από τα οποία παρουσιάζει το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

πεπτίδιο ενδιαφέροντος, τα οποία συνδέονται μέσω βιοτίνης σε μόριο αβιδίνης. Στο σύμπλεγμα προσδένεται φθοριόχρωμα συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη.

Τα HLA πολυμερή έχουν μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία και κατά πολύ μεγαλύτερη συνάφεια με τον αντίστοιχο TcR από το άθροισμα της συγγένειας των μονομερών που το αποτελούν. Ως αποτέλεσμα, η μη ειδική σύνδεση είναι πολύ χαμηλή και το όριο ανίχνευσης κυμαίνεται από 0,01% έως 0,04% των CD8 Τ κυττάρων για το περιφερικό αίμα [145]. Για τους λόγους αυτούς CD8 Τ κύτταρα τα οποία συνδέονται με τα πολυμερή θεωρείται ότι αντιστοιχούν με αντιγονοειδικούς Τ πληθυσμούς που ανιχνεύονται άμεσα με κυτταρομετρία ροής. HLA-πολυμερή παρασκευάστηκαν για καθένα από τα παραπάνω πεπτίδια (συνολικά 6), προτυπώθηκαν για κυτταρομετρική χρήση, όπως περιγράφεται από τους Karanikas et al [146], από το Ludwig Institute for Cancer Research (Brussels, Belgium) και προσφέρθηκαν ευγενώς από τον Prof. P. Coulie. Τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων ελέγχου ήταν συνδεδεμένα με το φθοριόχρωμα φυκοερυθρίνη (PE), ενώ τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων-μαρτύρων ήταν συνδεδεμένα με φθοριόχρωμα αλλοφυκοκυανίνη (**Πίνακας 6**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Πεπτίδια και HLA-πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Αντιγόνο	Πεπτίδιο	HLA-πολυμερές
Σαρβιβίνη	LTLGEFLKL	HLA-A2-PE
Σαρβιβίνη-2β	AYACNTSTL	HLA-A24-PE
hTERT	ILAKFLHWL	HLA-A2-PE
hTERT	VYAETKHFL	HLA-A24-PE
BMLF1	GLCTLVAML	HLA-A2-APC
EBNA3C	RYSIFFDYM	HLA-A24-APC

2.3 Καρκινικές γραμμές και EBV μετασχηματισμένα Β κύτταρα

Ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και κύτταρα τροφοί στις καλλιέργειες των CTLs χρησιμοποιήθηκαν καρκινικές γραμμές και EBV μετασχηματισμένα Β κύτταρα, κατάλληλου HLA, που είχαν συλλεχθεί από τον Αν.Καθ. Βάιο Καρανίκα στο Austin Research Institute (Melbourne, Australia). Η καλλιέργεια και η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και των EBV μετασχηματισμένων Β κυττάρων (EBV Β-κύτταρα) περιγράφεται στην παράγραφο 3.7, και τα χαρακτηριστικά τους στον πίνακα 7.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Καρκινικές γραμμές και EBV B κύτταρα.

Γραμμή	Προέλευση	HLA-αλλήλια	Τρόπος Ανάπτυξης	Χρόνος Διαίρεσης
GERL	Μελάνωμα	A1/ A2	Προσκολλημένα	40-45 ώρες
SKLU	Καρκίνος Πνεύμονα	A24/24	Προσκολλημένα	50 ώρες
DAJU 2.7	Μελάνωμα	A1/ A2	Προσκολλημένα	40-45 ώρες
DAJU EBV	EBV B κύτταρα	A1/ A2	Σε εναιώρημα	40-45 ώρες
ROSI EBV	EBV B κύτταρα	A24/ A24	Σε εναιώρημα	60-70 ώρες

2.4 Ορός

Για τις καλλιέργειες των κλώνων χρησιμοποιήθηκε ορός ανθρώπινης προέλευσης (HS), ο οποίος παρασκευάστηκε στο εργαστήριο (βλέπε παράγραφο 3.1), ενώ για την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων και των EBV B κυττάρων χρησιμοποιήθηκε βοδινός ορός (FBS). Οι παρτίδες του HS παρασκευάστηκαν από πλάσματα που συλλέχθηκαν στο Δρακοπούλειο Κέντρο.

2.5 Αναλώσιμα υλικά

Για την διεκπαίρωση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστηρία, μονοκλωνικά αντισωμάτα και υλικά που περιγράφονται στους πίνακες 8- 12.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες κλώνων

Κυτταροκίνη	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
IL-2	Recombinant Human IL-2	202-IL	R&D Sustems
IL-4	Recombinant Human IL-4	204-IL	R&D Sustems
IL-7	Recombinant Human IL-4	207-IL	R&D Sustems

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων της ενδοκυττάριας χρώσης κυτταροκινών

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
IL-2	FITC	340448	BD Biosciences, Eu
IL4	PE	559333	BD Biosciences
IL10	PE	559337	BD Biosciences
IFNg	FITC	340449	BD Biosciences

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά των επιφανειακών αντιγόνων που μελετήθηκαν

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
CD3	ECD	IM2705U	BD Biosciences, USA
CD4	PE	A07751	BD Biosciences
CD8	FITC	A07758	BD Biosciences
CD28	FITC	1236	immunotech
CD45	ECD	A07714	Beckman Coulter, USA
CD45RA	FITC	A07786	Beckman Coulter, USA
CD45RO	ECD	IM2712U	Beckman Coulter, USA
CD57	FITC	IM0466U	Beckman Coulter, USA
CCR7	APC	FAB197A	R&D Systems, USA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Πίνακας 11: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
1-μέθυλο-τρυπτοφάνη	1-Methyl-DL-tryptophan 97%	860646	Sigma-Aldrich, Germany
2-μερκαπτεθανόλη	2ME, 50mM	31350-010	Gibco, USA
BFA	Fast Immune Brefeldin A solution	347688	BD Biosciences, USA
DMSO	Dimethylsulfoxide	D5879	Sigma-Aldrich, Germany
DNάση	Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, 100 mg/mL	DN25	Sigma-Aldrich, Germany
EDTA	UltraPure EDTA, 0,5M	15575-038	Gibco, USA
Kit Luminex	Fidis Human Extracellular Protein	MXHB0001	Diagnostic Solutions, Australia
Kit αλληλούχισης	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	4336917	Applied Biosystems
Kit ανάλυσης TCR	IOTest Beta Mark	IM3497	Beckman Coulter, USA
Kit εκχύλισης RNA	Rnase Free Dnase Set	79254	Qiagen, Eu
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QIAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Eu
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	PCR Purification Kit	28106	Qiagen, Eu
Kit μαγνητικού διαχωρισμού CD8	CD8 positive selection kit, EasySep	18053	Stem Cell Techn, Canada
Kit μαγνητικού διαχωρισμού PE	Positive Selection Human PE Selection Kit, EasySep	18051	Stem Cell Techn, Canada
Kit HLA τυποποίησης (PCR-SSP)	Protrans SSP kits, Protrans, HLA-A alleles	200070	Protrans, Germany
Kit HLA τυποποίησης (PCR-SSO)	Tepnel, Lifecodes kit, HLA-A alleles	628410-50	Gen-Probe, USA
SYBR Green	platinum SYBR Green qPCR, Supermix-UDG	11733-046	Invitrogen, Eu
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, Eu
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Αναστολέας RNασών	RNAasin Rnase Inhibitor, 2,500 U/mL	27632304	Promega, Eu
Αντίστροφη Μεταγραφάση	M-MLV reverse transcriptase	28025-013	Invitrogen, Eu
Απορρυπαντικό TritonX	TritonX	X-100	Sigma-Aldrich, Germany
Βοδινός ορός	Heat inactivated FBS, Gibco	12319018	Invitrogen, Eu
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	161-0433	BioRad, USA
Διάλυμα $CaCl_2$	Calcium Chloride 10%	-	DEMO S.A, Greece
Διάλυμα HBSS	HBSS	14175-053	Gibco, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer,	15581-028	Invitrogen, Eu

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Πίνακας 11: *(συνέχεια)*

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Διάλυμα TRI	TRI Reagent Solution	AM9738	Ambion, USA
Διάλυμα PBS	10x PBS	70013-065	Gibco, USA
Διάλυμα αμινοξέων	MEM aminoacids	11140-035	Gibco, USA
Διάλυμα αντιβιοτικών	PSG	10378-016	Gibco, USA
Διάλυμα διαπερατότητας	Fixation/permeabilization solution	00-5521	eBioscience, USA
Διάλυμα διαχωρισμού	Robosep Buffer, EasySep	20104	Stem Cell Techn, Canada
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, USA
Διάλυμα τρυψίνης	Trypsin, 0.25% (1x) with EDTA 4Na, liquid	25200-056	Invitrogen, Eu
Εκκινητής θυμιδίνης	Oligo dt 15 primer	C110A	Promega, Eu
Ηπαρίνη	Heparin Leo	-	LEO Pharma, Denmark
Θρεπτικό μέσο	Iscoves (IMDM)	21980-065	Gibco, USA
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805	Invitrogen, Eu
Νερό ελεύθερο Rnασών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, Eu
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, Eu
Τρυβλία με άγαρ	Gelose Count Tact	43501	bioMérieux, France
Τυχαίοι εκκινητές	Primer Random p(dN) ROCHE	14292421	Roche, Eu
Φικόλη	Ficoll Histopaque	1077-1	Sigma-Aldrich, Germany
Χλωροφόρμιο	Acid phenol Chloroform	9720	Ambion, USA
Χρώμιο 51	$Na_2{}^{51}CrO_4$	NEZ03002MC	Perkin Elmer, Greece
Χρωστική	Trypan Blue	15250-061	Gibco, USA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Πίνακας 12: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους

Αναλώσιμα	**Όνομα προϊόντος**	**Αρ.Καταλόγου**	**Προέλευση**
Πλάκα μέτρησης Neubauer	Counting chamber Neubauer	3390054	Fischer Scientific, Eu
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510	Bioline, Israel
Βαμβακορόρος στυλεός	Sterile cotton swabs, Portagerm	41999	Copan, Italy
Γυάλινες πιπέτες Pasteur	Pasteur glass pipette	3411020	Hirschmann, USA
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, Eu
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125	Nalgene, Denmark
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, USA
Ξύστρο	Cell scraper	3010	Costar, Eu
Πιάτο Petri	Cell Culture Dish, 100 mm x20 mm	430167	Corning, USA
Πιάτο Petri	Cell Culture Dish,60mmx15mm,	430196	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας F96	96 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates,	3596	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M24	24 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates	3524	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M48	48well Cell Culture Cluster, flat bottom	3548	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M6	6 well Cell Culture Cluster	3516	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας U96	96well Cell Culture Cluster, round bottom	3799	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας V96	96well Cell Culture Cluster, V- bottom	3894	Corning, USA
Πιπέτα μεταφοράς 3 mL	3 mL transfer pipet, Polyethylene, Individually packaged,sterile	357575	BD Falcon, USA
Ρύγχη Robosep	Robosep tip racks	3520105	Stem Cell Techn, Canada
Ρύγχη πιπέτας 10 μL	10 μL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 μL, με φίλτρο	100 μL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 μL	1000 μL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL	200 μL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Πίνακας 12: *(συνέχεια)*

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Ρύγχη πιπέτας 200 μL, με φίλτρο	200 μL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 μL, με φίλτρο	30 μL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σύστημα φιλτραρίσματος 250 mL	250 mL Filter System	430767	Corning, USA
Σύστημα φιλτραρίσματος 500 mL	500 mL Filter System	430769	Corning, USA
Σωληνάρια πολυστυρενίου 5 mL	FACS tube, EasySep	3520105	Stem Cell Techn, Canada
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes- sterile,	430791	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 50 mL	50 mL centrifuge tubes- sterile	430291	Corning, USA
Φιαλίδιο χρώσης	Titertube, microtubes bulk	223-9391	BioRad, USA
Φιαλίδιο ψύξης 2 mL	2 mL self-standing Cryogenic Vials, round bottom, sterile	431386	Corning, USA
Φίλτρο 100 μm	Cell strainer, 100 μm	352360	BD Falcon, Eu
Φλάσκες ακτινοβόλησης	Irradiation flasks, 25 cm^2 Tissue culture flask	831810	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	175 cm^2 flask	431080	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	75 cm^2 cell culture flask	430641	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	25 cm^2 cell culture flask	430639	Corning, USA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3 ΜΕΘΟΔΟΙ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

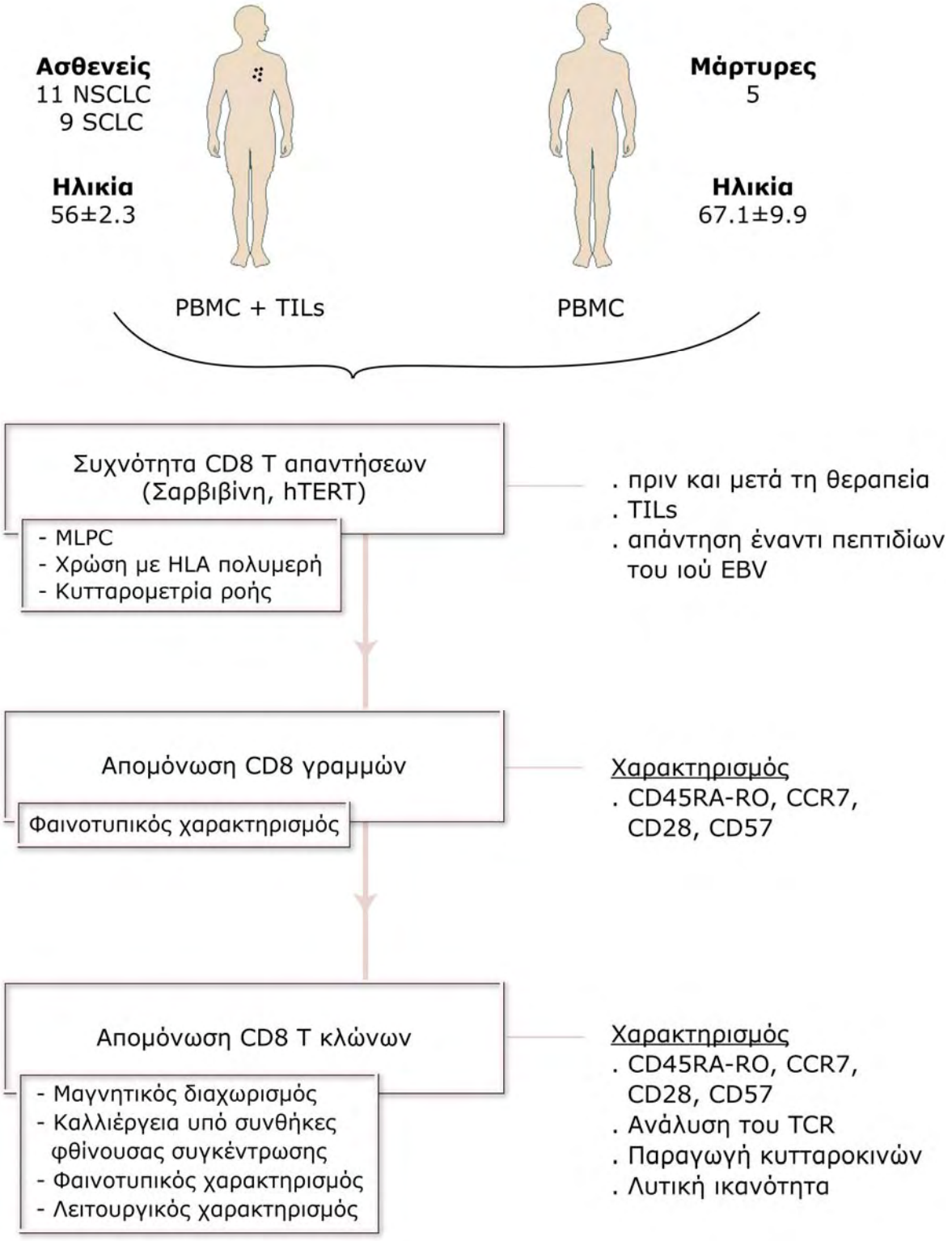
Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε υλικό από 20 ασθενείς και 5 μάρτυρες. Από τους ασθενείς απομονώθηκαν PBMCs κατά τη διάγνωση και ένα χρόνο μετά τη θεραπεία, και TILs σε όσους υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Από τους μάρτυρες απομονώθηκαν PBMCs από περιφερικό αίμα (βλέπε παράγραφο 3.2). Σε όλα τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων υπολογίστηκε η συχνότητα των αντιγονοειδικών CTLs έναντι πεπτιδίων των πρωτεϊνών της σαρβιβίνης, της σαρβιβίνης-2B και της τελομεράσης, καθώς και των πεπτιδίων ελέγχου με τη μέθοδο του MLPC (βλέπε παράγραφο 3.9.1). Από τη διαδικασία του MLPC απομονώθηκαν CD8 γραμμές και χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά με βάση εξωκυττάριους δείκτες που καθορίζουν το στάδιο διαφοροποίησης. Στις CD8 γραμμές ασθενών και μαρτύρων πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες απομόνωσης κλώνων (βλέπε παράγραφο 3.11) και οι κλώνοι που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και λειτουργικά (**Εικόνα 15**).

Ο χαρακτηρισμός περιελάμβανε την πλήρη αλληλουχία της β αλυσίδας του TCR (βλέπε παράγραφο 3.13), και την κυτταρομετρική ανάλυση για εξωκυττάριους δείκτες που καθορίζουν το στάδιο διαφοροποίησης (βλέπε παράγραφο 3.14). Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός αφορούσε την ικανότητα των CTL να παράγουν κυτταροκίνες έπειτα από ειδική διέγερση και να σκοτώνουν κύτταρα στόχους τα οποία παρουσιάζουν το πεπτίδιο που αναγνωρίζουν. Ο έλεγχος παραγωγής κυτταροκινών πραγματοποιήθηκε με ενδοκυττάρια χρώση και μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία (βλέπε παράγραφο 3.15.1-2). Η λυτική ικανότητα των CTL ελέχθηκε με τη δοκιμασία της απελευθέρωσης ^{51}Cr (βλέπε παράγραφο 3.15.3). Με την ίδια μέθοδο υπολογίστηκε και η συγγένεια του TCR των CTL ασθενών και μαρτύρων (βλέπε παράγραφο 3.15.4).

Συμπληρωματικά στις μεθόδους αυτές θα περιγραφούν στη συνέχεια τεχνικές που αφορούν την παρασκευή και προετοιμασία υλικών που ήταν απαραίτητα στη μελέτη, ο χειρισμός των οποίων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο. Οι τεχνικές αυτές αφορούσαν

- την παρασκευή του ορού που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις δοκιμασίες
- τη μεθοδολογία απομόνωσης γραμμών καρκινικών κυττάρων
- την καλλιέργεια των κυττάρων στόχων
- την ακτινοβόληση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις δοκιμασίες σαν κύτταρα στόχοι ή τροφοί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 15: Πλάνο μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την προσέγγιση της ερευνητικής υπόθεσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.1 Παρασκευή ορού από πλάσμα

Οι παρτίδες του ορού παρασκευάστηκαν από πλάσμα που προήλθε από κέντρα αιμοδοσίας και αποθηκεύθηκε στους -20 ºC. Το πλάσμα είχε ελεγχθεί για HBV, HCV, HIV, HTLVI, HTLVII και σύφιλη και ήταν γνωστής ομάδας αίματος. Αρχικά παρασκευάζονταν μία ποσότητα ορού για κάθε ομάδα αίματος χωριστά (PS), από τουλάχιστον δύο ασκούς της κάθε ομάδας (A, B, O και AB).

Οι ασκοί αφέθηκαν σε θερμοκρασία 4 ºC για 24 ώρες και την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (37 ºC, ~30 λεπτά) για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του κάθε ασκού τοποθετήθηκε σε μπουκάλια 250 mL και προστέθηκε χλωριούχο ασβέστιο (Calcium Chloride 10%) σε αναλογία 1/27. Ακολούθησε επώαση (37 ºC, 1-2 ώρες) μέχρι να παρατηρηθεί πήξη του υλικού. Με τη χρήση ξέστρου από βαμβάκι πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του ορού από το ινωδογόνο, το οποίο μετατρέπεται σε ινώδες και σχηματίζει το πήγμα. Ο ορός που αποσπάστηκε με τη διαδικασία αυτή συγκεντρώθηκε σε φιαλίδια 50 mL, αφού πέρασε από φίλτρο 100 μm. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (1800 rpm; 10 λεπτά) , συγκέντρωση του ορού σε μπουκάλι 1000 mL και επώαση σε υδατόλουτρο (56 ºC; 30 λεπτά) με συχνή ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε άμεσα σε παγωμένο νερό και αποθηκεύθηκε στους 4 ºC μέχρι να διαπιστωθεί η στειρότητα της διαδικασίας.

Για τον έλεγχο της στειρότητας λήφθησαν από κάθε PS λήφθηκαν δύο δείγματα των 500 μL. Μία σταγόνα τοποθετήθηκε για καλλιέργεια σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (Gelose Count Tact), ενώ δείγματα των 200 mL αναμίχθηκαν με 1,8 mL SF-IDc και τοποθετήθηκαν σε πλάκα καλλιέργειας M24. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (37 ºC) για 48 ώρες και ελέχθησαν για την παρουσία επιμόλυνσης. Εφόσον όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά ακολουθούσε η παρασκευή του ορού. Για την παρασκευή της κάθε παρτίδας του ορού που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αναμίχθηκαν σε μπουκάλι 1000 mL, 500 mL ορού ομάδας A, 300 mL ορού ομάδας AB, 100 mL ορού ομάδας O και 100 mL ορού ομάδας A. 100 mL της ποσότητας αυτής διαμοιράστηκαν σε 10 μπουκάλια των 125 mL. Το υλικό αυτό τοποθετήθηκε στους 4 ºC για 24 ώρες και στη συνέχεια λήφθησαν διπλά δείγματα των 500 μL από το καθένα για έλεγχο στειρότητας. Τέλος, τα μπουκάλια των 125 mL αποθηκεύθηκαν στους -20 ºC μέχρι τη χρήση τους. Για την απόψυξη ποσότητας ορού, το μπουκάλι των 125 mL τοποθετούνταν στους 4 ºC για 24 ώρες. Η ποσότητα μεταφέρονταν σε φιαλίδια 50 mL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (3500 rpm, 15 λεπτά, 4 ºC). Αφαιρούνταν ποσότητα λίπους από την επιφάνεια των σωληναρίων, το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέα σωληνάρια και επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Ο ορός μεταφερόταν σε νέο σωληνάρια 50 mL και αποθηκεύονταν στους 4 ºC.

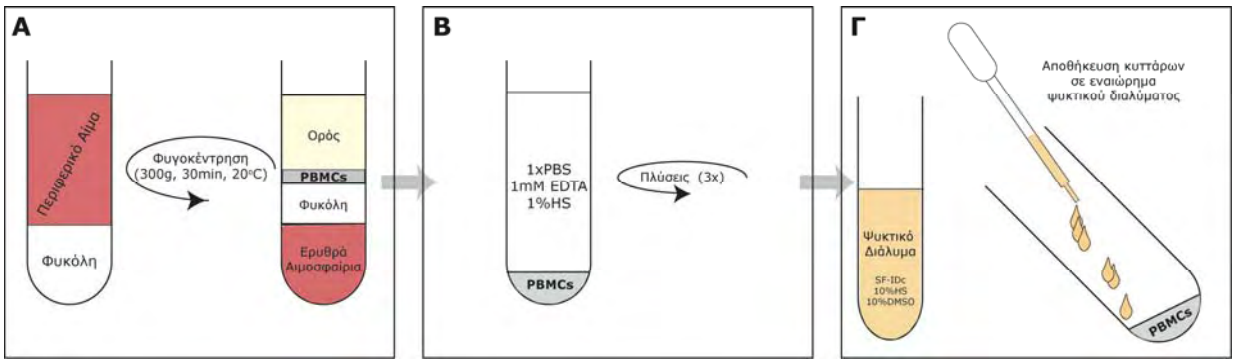
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.2 Απομονωση Μονοπύρηνων κυττάρων του Περιφερικού Αίματος

Για την αιμοληψία χρησιμοποιήθηκε ηπαρινισμένη σύριγγα, 2-5 U ηπαρίνης ανά mL αίματος, και γινόταν αιμοληψία 60-120 mL φλεβικού αίματος από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα αλλά και από υγιείς δότες. Εν συνεχεία, το ολικό αίμα μεταφέρονταν με αργή έγχυση πάνω από την στιβάδα της φικόλης, σε αναλογία 30 mL αίματος ανά 20 mL φικόλης. Η απομόνωση των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας και διαδοχικές πλύσεις (**Εικόνα 16Α**). Το ολικό αίμα εφυγοκεντρείτο στους 20 ^{o}C για 30 λεπτά στα 400 g. Μετά την πρώτη φυγοκέντριση, η στιβάδα των μονοπύρηνων συλλέγονταν και μεταφέρονταν σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο (**Εικόνα 16Β**). Η στιβάδα των PBMC εφυγοκεντρείτο 3 φορές ακόμη χρησιμοποιώντας διάλυμα 1xPBS με 1 mM EDTA και 1%HS για 8 λεπτά στους 4 ^{o}C με σταδιακή μείωση της ταχύτητας περιστροφής (370 g, 300 g και 210 g αντίστοιχα) με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος από αιμοπετάλια και φυκόλη. Στην συνέχεια, τα κύτταρα εμετρούντο με τη χρήση αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και χρωστικής Trypan Blue, και ακολούθησε η τελευταία φυγοκέντρηση (300 g, 8 λεπτά, 4 ^{o}C).

3.3 Ψύξη κυττάρων

Για τη φύλαξη των PBMCs εχρησιμοποιείτο διάλυμα 80% θρεπτικού υλικού Iscove΄s, (IDc), 10% θερμικά αδρανοποιημένο ανθρώπινο ορό (HS) και 10% DMSO. Η εναιώρηση των απομονωμένων κυττάρων στο ψυκτικό διάλυμα γινόταν με βάση τον αριθμό των κυττάρων, συνήθως 15-20 x10^{6} PBMCs/ φιαλίδιο (**Εικόνα 16Γ**) Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετούνταν σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη και μεταφέρονταν σε ψυγείο -80 ^{o}C, όπου και παρέμεναν για τουλάχιστον 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα αποθηκεύονταν, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, στους -196 ^{o}C σε δοχείο υγρού αζώτου (LN_2).



ΕΙΚΟΝΑ 16: Απομόνωση και ψύξη PBMCs

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.4 Ψύξη κυττάρων ως ίζημα

Για τη φύλαξη των PBMCs σε μορφή ιζήματος τα κύτταρα μεταφέρονταν σε ειδικό σωληνάριο και ακολουθούσαν δύο πλύσεις με διάλυμα 1xPBS με 1 mM EDTA και 1%HS (4 λεπτά σε 2000 g), ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό. Έπειτα, αφαιρούνταν το υπερκείμενο και μεταφέρονταν το ίζημα σε ψυγείο -80 ^{o}C.

3.5 Απόψυξη Κυττάρων

Για την απόψυξη, τα PBMCs τοποθετούνταν κατ' αρχήν σε υδατόλουτρο 37 ^{o}C για 2 λεπτά, αμέσως ακολουθούσε φυγοκέντρηση (400 g, 6 λεπτά, 21 ^{o}C) και επαναδιάλυση των κυττάρων σε ζεστό (37 ^{o}C) θρεπτικό μέσο 10% FBS-IDc. Τα κύτταρα παρέμεναν στο πλήρες θρεπτικό μέσο 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ανακάμψουν και να διαχυθεί το υπολειπόμενο DMSO από τις μεμβράνες τους.

3.6 TILS

Σε 2 δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε ολική ή μερική λοβεκτομή του ενός πνεύμονα, χρησιμοποιήθηκαν σε μικτή καλλιέργεια ώστε να διαπιστωθεί η δραστικότητα των τελευταίων στο περιβάλλον του όγκου. Από το υλικό του χειρουργείου λήφθηκε τμήμα καρκινικού ιστού σε φιαλίδιο 50 mL που περιείχε τουλάχιστον 30 mL διαλύματος HBSS και τοποθετήθηκε σε πάγο. Υπό άσηπτες συνθήκες μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri και εμβαπτισμένο μέσα στο HBSS διαλύθηκε σε μικρότερα τμήματα με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας και νυστεριού. Τα τμήματα ομογενοποιήθηκαν περεταίρω χρησιμοποιώντας σύριγγα 21G. Ακολούθησε διήθηση του εναιωρήματος με τη χρήση φίλτρου 100 μm πάνω από φιαλίδιο 50 mL, προσθήκη ποσότητας SF-IDc και πλύση (1300 rpm, 6 λεπτά). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επαναλήφθηκε η πλύση στις ίδιες συνθήκες. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε SF-IDc, καταμετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer, παγώθηκαν σε ψυκτικό διάλυμα (15-20 x10^{6} TILs/φιαλίδιο) και αποθηκεύθηκαν σε LN_2 μέχρι τη χρήση τους.

3.7 Καλλιέργεια καρκινικών γραμμών και EBV B κυττάρων

Οι καρκινικές γραμμές και τα EBV μετασχηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιούνταν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για την ενεργοποίηση ειδικών $CD8^{+}$ T κυτταρικών πληθυσμών και ως κύτταρα στόχοι. Αρχικά, γινόταν απόψυξη των κυττάρων (2-4 x10^{6} κύτταρα/φιαλίδιο) τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο και εναιώρησή τους σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 1% FBS, ώστε να διαλυθεί το τοξικό για αυτά DMSO τουλάχιστον 0.5% v/v. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση του αριθμού των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην πλάκα Neubauer και υπολογισμός της βιωσιμότητας του δείγματος. Ακολουθούσε πλύση των κυττάρων και τοποθέτησή τους σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

δύο φιάλες καλλιέργειας, με 1/3 και 2/3 των ανακτημένων κυττάρων αντίστοιχα. Οι φιάλες τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης (37 ^{o}C, 8% CO_2).

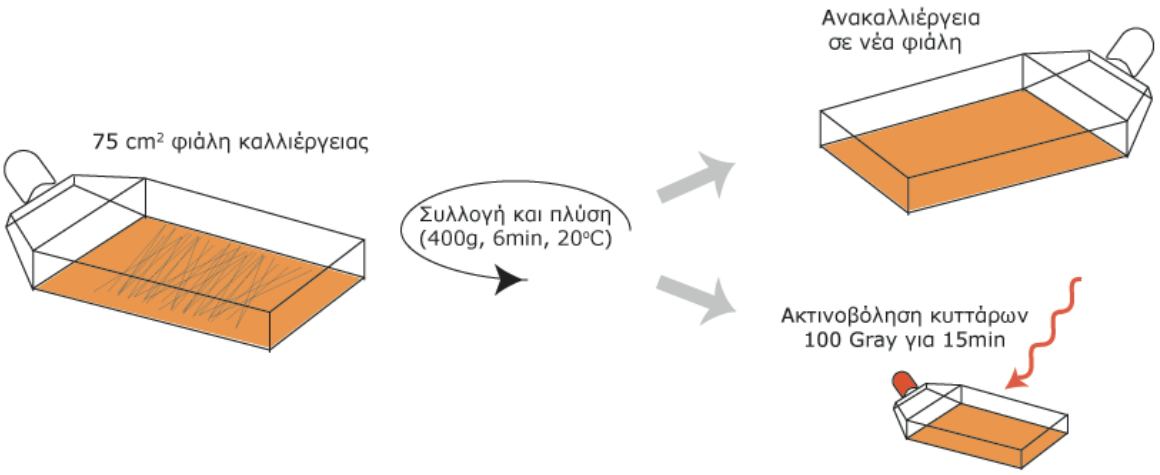
Ανάλογα με το χρόνο διαίρεσής τους οι καλλιέργειες παρατηρούνταν και όταν κάλυπταν το 80% της επιφάνειας της φιάλης, γινόταν συλλογή των κυττάρων για περαιτέρω χρήση και επανακαλλιέργεια. Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε διάλυμα, όπως τα EBV μετασχηματισμένα Β κύτταρα, γινόταν συλλογή του θρεπτικού μέσου από την φιάλη, πλύση της φιάλης με ζεστό (37 ^{o}C) PBS και φυγοκέντρηση των κυττάρων (400 g, 6 λεπτά). Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 10% FBS-IDc και μετριόταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν μέσω προσκόλλησης στο πλαστικό της φιάλης ακολουθούσε διαφορετική διαδικασία συλλογής. Αρχικά συλλεγόταν το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο 50 mL. Ακολουθούσε πλύση της φιάλης με 10 mL PBS και προσθήκη διαλύματος 2 mM EDTA-PBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά στους 37 ^{o}C, ώστε να προκληθεί αποκόλληση από την πλαστική επιφάνεια. Γινόταν ανακίνηση της φιάλης με χτύπημα από το πλάι και τα κύτταρα συλλεγόταν στο ίδιο φιαλίδιο των 50 mL. Σε κάποιες περιπτώσεις ήταν απαραίτητη η χρήση 0.25% Trypsin-Versene στο διάλυμα EDTA-PBS για να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων. Ακολουθούσε πλύση με ζεστό PBS και φυγοκέντρηση των κυττάρων (400 g, 6 λεπτά). Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 10% FBS-IDc και μετριόταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Κατάλληλος αριθμός κυττάρων συλλεγόταν για χρήση, 2-4 x10^6 κύτταρα/φιαλίδιο παγώνονταν και διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων (2 x10^6, 1 x10^6 και 0.5 x10^6) τοποθετούνταν σε νέες φιάλες για ανακαλλιέργεια. Η καλλιέργεια συνεχιζόταν μέχρις ότου σημειώνονταν μείωση του χρόνου διαίρεσης των κυττάρων κατά 10%. Στην περίπτωση αυτή η καλλιέργεια διακόπτονταν και ξεπαγώνονταν νέο φιαλίδιο.

3.8 Ακτινοβόληση Καρκινικών Γραμμών και EBV Β Κυττάρων

Ο σκοπός της ακτινοβόλησης ήταν ο κατακερματισμός του DNA, έτσι ώστε τα ακτινοβολημένα κύτταρα να χρησιμοποιούνταν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC). Μετά την πρώτη διαίρεση, τα ακτινοβολημένα κύτταρα αποπίπτουν και έτσι δεν αναπτύσσονται εις βάρος των κυττάρων καλλιέργειας. Τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ακτινοβόληση ήταν οι καρκινικές γραμμές και τα EBV Β κύτταρα που χρησιμοποιούνταν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς και ετερόλογα PBMCs που χρησιμοποιούνταν ως κύτταρα τροφοί (feeders). Αρχικά γινόταν συλλογή των κυττάρων, μετρούνταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων και ακολουθούσε πλύση (400 g, 6 λεπτά). Μετά την φυγοκέντρηση τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 62 mL 1% FBS-IDc και τοποθετούνται σε ειδική φιάλη ακτινοβόλησης. Η ακτινοβόληση των κυττάρων πραγματοποιούνταν σε μαγνητικό επιταχυντή στα 100 Gray για 15 λεπτά. Με το πέρας της ακτινοβόλησης, τα κύτταρα συλλέγονταν από τη φιάλη και μετρούνταν με τη πλάκα Neubauer. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων (6 διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από 1 x10^6/φρεάτιο) τοποθετούνταν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

σε φρεάτια πλάκας M6 και χρησιμοποιούνταν σαν δείγμα ελέγχου της θνησιμότητας των ακτινοβολημένων κυττάρων και της στειρότητας της διαδικασίας. Τα υπόλοιπα κύτταρα φυγοκεντρούνταν (400 g, 6 λεπτά) και παγώνονταν σε ψυκτικό διάλυμα με 10% FBS σε συγκέντρωση 5 x10^6/φιαλίδιο για κύτταρα που προορίζονταν για αντιγονοπαρουσιαστικά και 10 x10^6/φιαλίδιο για τα κύτταρα τροφούς (**Εικόνα 17**).



ΕΙΚΟΝΑ 17: Ακτινοβόληση κυττάρων

3.9 Προσδιορισμός αντιγονοειδικών Τ-κυττάρων

Μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο έχουν δείξει, με διάφορες μεθοδολογίες, ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων CTLs που είναι ειδικά έναντι ορισμένων από τα πεπτίδια που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη, ανέρχεται σε ~4 x10^{-7} των περιφερικών $CD8^+$ Τ-κυττάρων. Η συχνότητα αυτή δεν μπορεί να προσδιοριστεί παρά μόνο αν προηγηθεί *in vitro* διέγερση των συγκεκριμένων κλώνων [147], όπως έγινε και στη δική μας μελέτη. Στην περίπτωσή μας, όμως, οι πειραματικές συνθήκες τροποποιήθηκαν έτσι, ώστε, με την παρεμβολή ενός σταδίου ταυτόχρονου προσδιορισμού των CTLs που στρέφονται έναντι πολλαπλών πεπτιδίων, να επιτυγχάνεται, με την ίδια ακρίβεια, σημαντική οικονομία χρόνου και υλικών.

Ειδικότερα, αριθμός περιφερικών PBMCs των υπό μελέτη ατόμων, στον οποίο αναλογούσαν 2–5 x10^6 $CD8^+$ Τ-κύτταρα, διαχωρίζονταν και υποβάλλονταν σε ταυτόχρονες MLPCs. Ο αριθμός των MLPCs ήταν τέτοιος (τουλάχιστον 200), ώστε, με βάση την παραπάνω αναφερόμενη συχνότητα των αντίστοιχων κλώνων στους ασθενείς με μελάνωμα (~4 x10^{-7} των περιφερικών $CD8^+$ Τ-κυττάρων), να υπάρχει η πιθανότητα μια τουλάχιστον από αυτές να είναι θετική, δηλαδή σε μια τουλάχιστον από αυτές να αναπτυχθεί ένας ειδικός CTL-κλώνος. Η αναζήτηση θετικών MLPCs γινόταν με τη χρήση κυτταρομετρίας

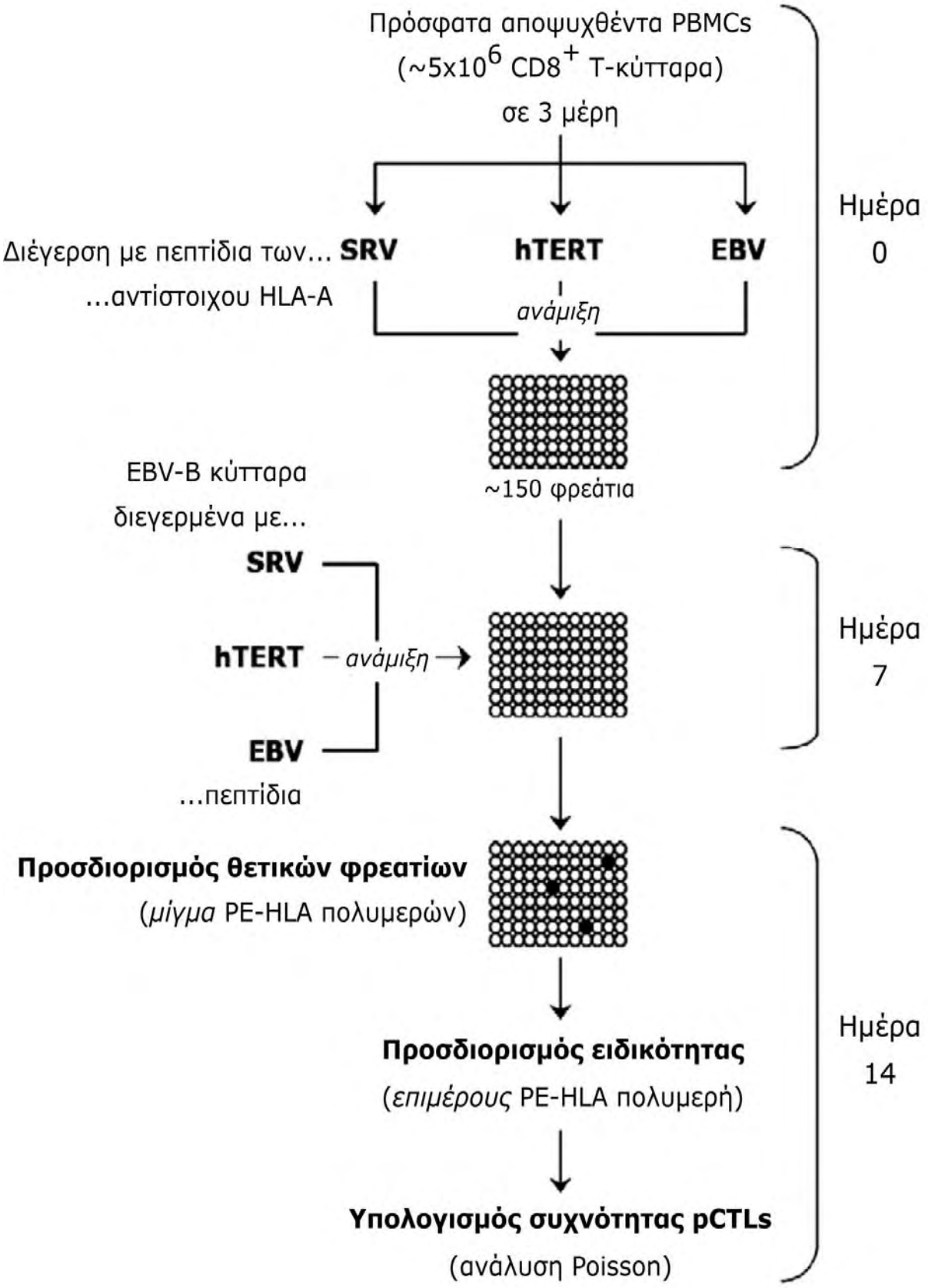
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ροής και των αντίστοιχων HLA-πολυμερών. Επισημαίνεται ότι το ζητούμενο από την κυτταρομετρική ανάλυση είναι η διάκριση των αρνητικών από τις θετικές MLPCs και ο προσδιορισμός του αριθμού των τελευταίων, ανεξαρτήτως του αριθμού των CTLs που αναπτύσσονται σε κάθε θετική MLPC. Και τούτο, επειδή η πραγματική συχνότητα των CTL-κλώνων υπολογιζόταν, στη συνέχεια, με βάση την κατανομή των σπανίων φαινομένων κατά Poisson [148]. Η αναλυτική περιγραφή της μεθοδολογικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε, έχει ως ακολούθως.

3.9.1 Μικτη λεμφοκυτταρικη καλλιεργεια (MLPCs)

PBMCs σε συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL σε θρεπτικό υλικό IDc, εμπλουτισμένο με 1% HS, υποβάλονταν σε χωριστές διεγέρσεις (60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου) με 20 μg/mL καθενός από τα πεπτίδια ελέγχου, καθώς με την ίδια ποσότητα του αντίστοιχου πεπτιδίου-μάρτυρα. Για κάθε άτομο της μελέτης, χρησιμοποιούνταν μόνο τα πεπτίδια (ελέγχου και μάρτυρα) που αντιστοιχούσαν στο HLA-αντιγόνο που εξέφραζε. Ακολουθούσε πλύση και ανάμιξη των διεγερμένων με τα ξεχωριστά πεπτίδια ελέγχου PBMCs. Το κυτταρικό μίγμα κατανέμονταν σε φρεάτια πλάκας μικροκαλλιεργειών 96 φρεατίων (ανά φρεάτιο: 2 x10^5 κύτταρα σε 0,2 mL Iscove's με 10% HS, 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4 και 10 ng/mL IL-7). Σε διαφορετικά φρεάτια και με τον ίδιο τρόπο γινόταν οι MLPCs, για τη διέγερση των οποίων χρησιμοποιούνταν τα πεπτίδια-μάρτυρες. Την 7η μέρα γινόταν επαναδιέγερση των μικροκαλλιεργειών με τη χρήση αντιγονοπαρουσιαστικού συστήματος, το οποίο αποτελείτο από EBV Β-κύτταρα που εξέφραζαν το αντίστοιχο HLA-αντιγόνο και τα οποία είχαν προεπωαστεί ξεχωριστά με καθένα από τα πεπτίδια που χρησιμοποιούνταν κατά την αρχική διέγερση των PBMCs. Για τη διέγερση αυτή των εξαλλαγμένων Β-κυττάρων χρησιμοποιούνταν οι ίδιες όπως και παραπάνω συνθήκες διέγερσης των PBMCs. Τη 14η μέρα των MLPC γινόταν ανίχνευση των ειδικών CTLs που περιέχονταν σε κάθε φρεάτιο μετά από σήμανση με τα αντίστοιχα HLA-πολυμερή και με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής σε κυτταρομετρητή FC500 Beckman-Coulter, ο οποίος διέθετε δύο πηγές Laser (488 και 633 nm). Η σήμανση γινόταν με ταυτόχρονη προσθήκη (30 λεπτά, 37 °C) σε κάθε φρεάτιο όλων των HLA-πολυμερών (ελέγχου και μαρτύρων) που αντιστοιχούσαν στα HLA-αντιγόνα κάθε ατόμου, σε τελική συγκέντρωση 5 nM βαριών αλυσίδων από το καθένα. Στις περιπτώσεις των ατόμων που εξέφραζαν συνδυασμούς HLA-αντιγόνων, το περιεχόμενο κάθε φρεατίου διαιρείτο σε ανάλογα μέρη και γινόταν χωριστά η προσθήκη των αντίστοιχων HLA-πολυμερών. Ακολουθούσε προσθήκη αντι-CD8 FITC-αντισώματος, επώαση (30 λεπτά, 37 °C), πλύση και μονιμοποίηση με 0,5% φορμαλδεϋδη (**Εικόνα 18**).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 18: Σχηματική παράσταση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της συχνότητας των ειδικών pCTLs.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

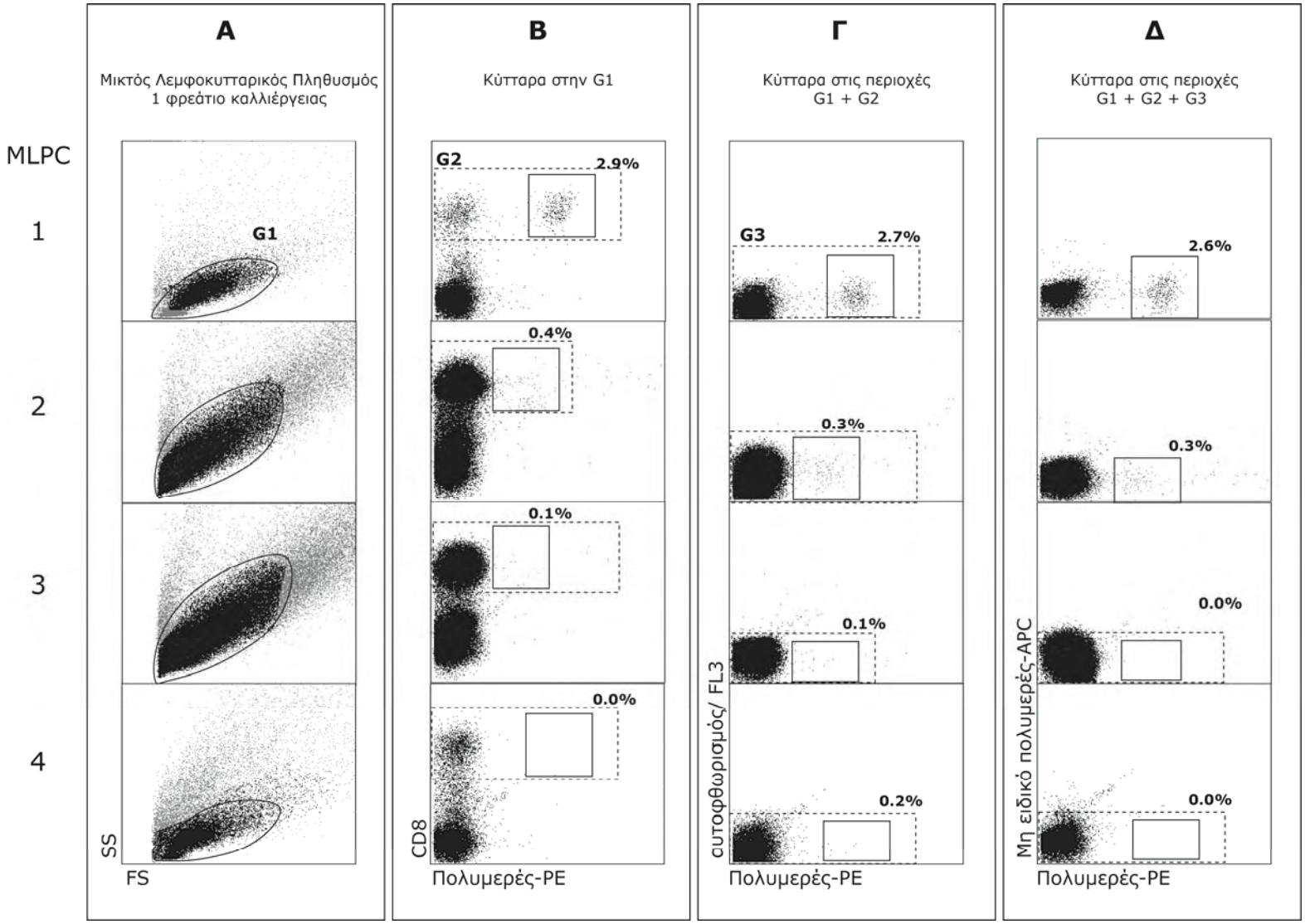
3.9.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η κυτταρομετρική ανάλυση ακολουθούσε τα παρακάτω βήματα. Κατ' αρχήν, με τη χρήση του σκεδαστικού παράθυρου, αναγνωρίζονταν τα ζώντα λεμφοκύτταρα, στην περιοχή (gate) των οποίων γινόταν η παραπέρα ανάλυση (**Εικόνα 19Α**). Προκειμένου να αξιολογηθούν οι προτεινόμενες βελτιώσεις επί του κλασικού κυτταρομετρικού προσδιορισμού των ειδικών Τ-κυττάρων, αρχικά γινόταν ανίχνευση των θετικών για τα PE-HLA-πολυμερή μεταξύ του συνόλου των $CD8^+$ κυττάρων (**Εικόνα 19Β**). Με αυτή την προσέγγιση, όμως, ανάμεσα στα ειδικά έναντι των πεπτιδίων ελέγχου CTLs, συνυπολογίζονται σήματα αυτοφθορισμού, καθώς και άλλα $CD8^+$ κύτταρα, με τα οποία μπορούν να συνδέονται τα HLA-πολυμερή, όπως π.χ. τα NK-κύτταρα που συνδέονται με τα HLA-πολυμερή μέσω των υποδοχέων KIR. Για τον αποκλεισμό των σημάτων αυτοφθορισμού από τις μετρήσεις, τα συνολικά $CD8^+$ σήματα του προηγούμενου προσδιορισμού αναλύονταν ως προς το σήμα εκπομπής του PE, με το οποίο είναι σημασμένα τα HLA-πολυμερή, και το σήμα εκπομπής ενός άλλου φθοριοχρώματος που είναι το ίδιο σχεδόν με εκείνο του PE, όταν διεγείρεται από την ίδια πηγή Laser, αλλά με το οποίο στα πειράματά μας δεν γινόταν καμιά σήμανση (άδειο κανάλι). Στις μετρήσεις μας χρησιμοποιείτο το σήμα εκπομπής του PE (~620 nm), που συλλέγεται από το κανάλι FL3 του συγκεκριμένου οργάνου. Μόνο τα αρνητικά για το άδειο κανάλι σήματα θεωρούνταν $CD8^+$ κύτταρα (**Εικόνα 19Γ**). Στη συνέχεια, για τον αποκλεισμό των μη ειδικά συνδεομένων με τα HLA-πολυμερή κυττάρων, αυτά τα τελευταία $CD8^+$ κύτταρα αναλύονταν έναντι του μίγματος των PE-HLA-πολυμερών και ενός APC-HLA-πολυμερούς-μάρτυρα, του ίδιου HLA-μορίου (**Εικόνα 19Δ**). Τα σήματα, που συνέπιπταν με τη διαγώνιο του αντίστοιχου στικτογράμματος, αποκλείστικαν ως αρνητικά.

Στις περιπτώσεις που, με την παραπάνω διαδικασία, σε μια ή περισσότερες MLPCs ανιχνεύονταν ειδικά $CD8^+$ Τ-κύτταρα, θετικά για το μίγμα των PE-HLA-πολυμερών, η κυτταρομετρική ανάλυση επαναλαμβανόταν, για καθεμιά από αυτές, με τη χρήση κάθε PE-HLA-πολυμερούς χωριστά, ώστε να προσδιοριστούν οι MLPCs που ήταν θετικές για κάθε συγκεκριμένο πεπτίδιο. Σε όλες τις περιπτώσεις, υπολογιζόταν η μέση ένταση φθορισμού (MFI) των θετικών για το HLA-πολυμερές ειδικών $CD8^+$ Τ-κυττάρων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

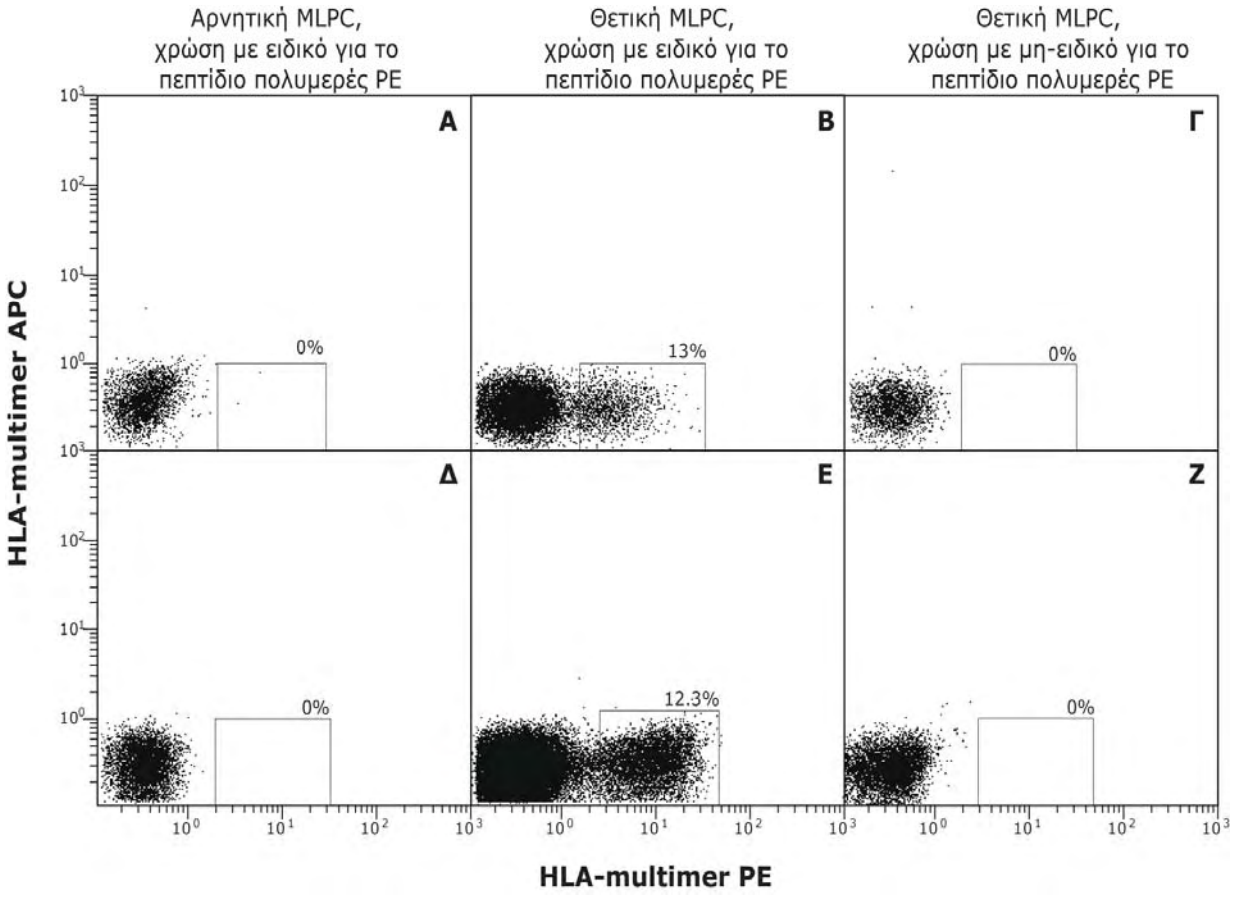
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 19. Κυτταρομετρικός προσδιορισμός των ειδικών έναντι των υπό έλεγχο πεπτιδίων CTLs με τη χρήση HLA-πολυμερών

Τα διαγράμματα αναφέρονται στην κυτταρομετρική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές MLPCs (1-4). **Α.** Προσδιορισμός της περιοχής (gate) των ζώντων λεμφοκυττάρων. **Β.** Προσδιορισμός $CD8^+$/HLA-πολυμερές$^+$ πληθυσμού. Με αυτό τον τρόπο, για παράδειγμα στην MLPC 1, ο πληθυσμός των HLA-πολυμερές$^+$ κυττάρων προσδιορίζεται στο 2,9% του συνόλου των $CD8^+$ κυττάρων. **Γ.** Αποκλεισμός αυτοφθορισμού. **Δ.** Προσδιορισμός κυττάρων που δεν συνδέονται με το μη ειδικό πολυμερές.

Πιο συγκεκριμένα, τα HLA πολυμερή ήταν σχεδιασμένα να ανιχνεύουν μόνο ειδικούς, έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης και της τελομεράσης, CD8 Τ-κυτταρικούς πληθυσμούς που ενδεχομένως να υπήρχαν στις υπό εξέταση MLPCs. Οι πληθυσμοί αυτοί σημάνθηκαν ειδικά με το αντίστοιχο HLA πολυμερές ((**Εικόνα 20Β και 20Ε**) και όχι με μη ειδικό πολυμερές του ιδίου φθωριοχρώματος (διαφορετικό πεπτίδιο, ίδιο φθωριόχρωμα) (**Εικόνα 20Γ και 20Ζ**). Συνεπώς, σε MLPCs που δεν εντοπίστηκαν θετικοί πληθυσμοί δεν παρατηρήθηκε σήμανση με τα αντίστοιχα πολυμερή (αρνητικές MLPCs) (**Εικόνα 20Α και 20Δ**).



ΕΙΚΟΝΑ 20. Κυτταρομετρικός προσδιορισμός των ειδικών έναντι των υπό έλεγχο πεπτιδίων CTLs.

Τα στικτογράμματα Α–Ζ αναφέρονται σε MLPCs έπειτα από σήμανση με Surv.A2-PE, hTERT.A2-PE, MAGE3.A2 και ενός APC-HLA-πολυμερούς-μάρτυρα (EBV πεπτίδιο). **Α**: Αρνητική MLPC για το πολυμερές της σαρβιβίνης (Surv.A2-PE). **Β**: Θετική MLPC ως προς το Surv.A2-PE πολυμερές (ο θετικός πληθυσμός εντοπίστηκε σε μη-σχετιζόμενο με την ηλικία υγιή δότη, ο οποίος δεν συμπεριλήφθηκε στην ομάδα των μαρτύρων αυτής της μελέτης). **Γ**: Στην ίδια θετική MLPC του στικτογράμματος Β, προσθέθηκε μη-ειδικό πολυμερές (MAGE3.A2-PE). **Δ**: Αρνητική MLPC για το πολυμερές της τελομεράσης (hTERT.A2-PE). **Ε**: Θετικός πληθυσμός ως προς το hTERT.A2-PE πολυμερές. **Ζ**: Στον θετικό πληθυσμό του στικτογράμματος Ε, προσθέθηκε μη-ειδικό πολυμερές (MAGE3.A2-PE).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.9.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

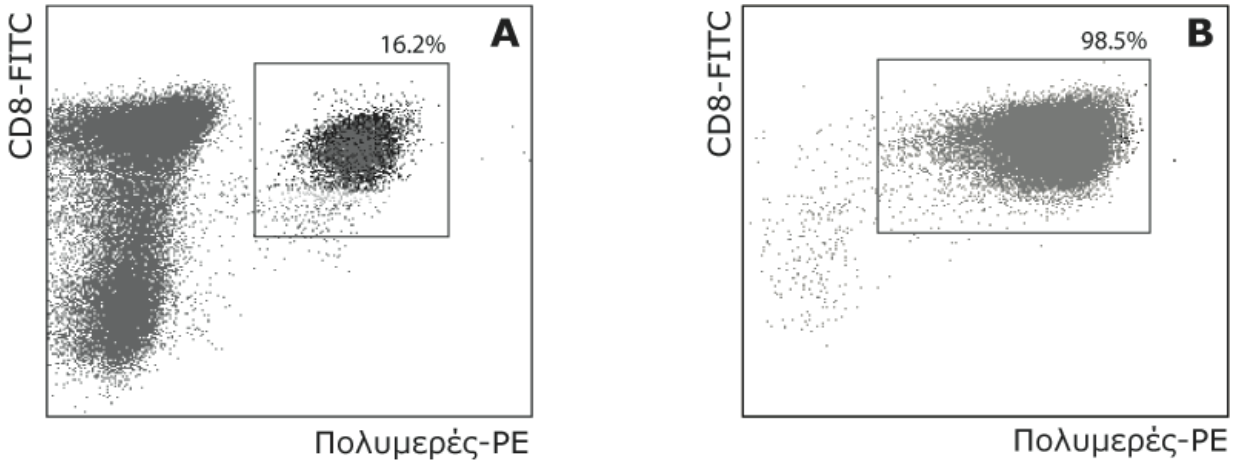
Με βάση τον αριθμό των MLPCs, που ανευρίσκονταν θετικές για ειδικά CTLs, υπολογιζόταν ο πραγματικός αριθμός των έναντι κάθε πεπτιδίου κυκλοφορούντων ειδικών CTLs, σύμφωνα με την κατανομή Poisson [147], ως ακολούθως:

$$P(x;\ m) = (e^{-m})\ (m^{x})\ /\ x!$$

όπου e είναι η βάση των φυσικών λογαρίθμων (περίπου 2,71828), m είναι ο μέσος παρατηρούμενος αριθμός CTLs (δηλαδή, θετικών MLPCs), x είναι ο αναμενόμενος (πραγματικός) αριθμός θετικών MLPCs και $P(x;\ m)$ είναι η ακριβής πιθανότητα να υπάρχουν *x* CTLs, όταν ο παρατηρούμενος αριθμός θετικών MLPCs είναι *m*.

3.10 Καλλιέργεια και ανάπτυξη CD8 T γραμμών

Ως CD8 T γραμμή αναφέρεται ένας μικτός πληθυσμός κυττάρων που περιλαμβάνει τα ειδικά για το πεπτίδιο κύτταρα, μαζί με άλλους πληθυσμούς, όπως $CD4^+$ T κύτταρα, $CD8^+$ T κύτταρα άλλης ειδικότητας, NK κύτταρα, κ.ά. (**Εικόνα 21A**). Σκοπός της καλλιέργειας αυτής ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός του ειδικού CD8 T κυτταρικού πληθυσμού μόνο. Για το σκοπό αυτό οι κυτταρικές γραμμές που προέκυπταν από την διαδικασία του MLPC επαναδιεγείρονταν με το ειδικό πεπτίδιο παρουσία όλων των παραγόντων που ευνοούν την ανάπτυξη των CD8 T κυττάρων.



ΕΙΚΟΝΑ 21: Απεικόνηση ειδικής CD8 T γραμμής και ειδικού CD8 T κλώνου

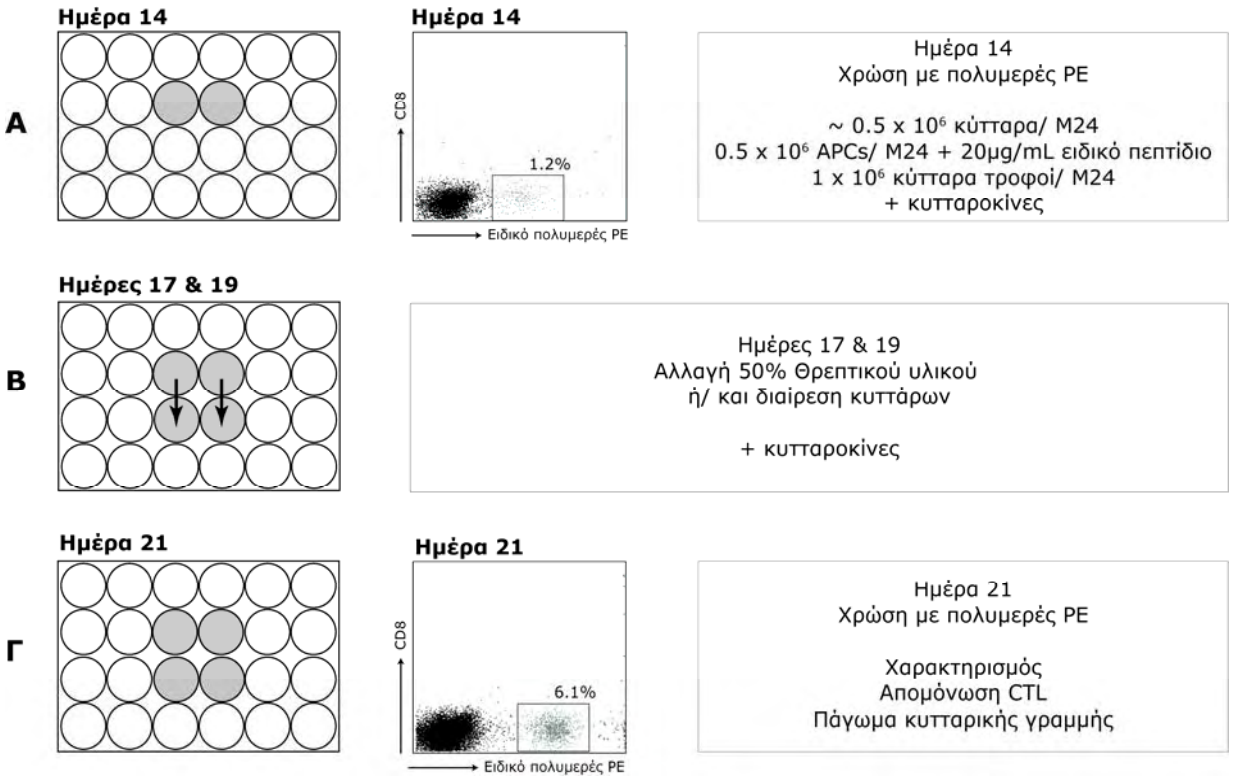
A. CD8 T γραμμή είναι ένας μικτός πληθυσμός κυττάρων που περιλαμβάνει τον ειδικό για το πεπτίδιο πληθυσμό, μαζί με άλλους πληθυσμούς όπως $CD4^+$, NK, δενδριτικά κύτταρα κ.α., **B**. CD8 T κλώνος είναι μόνο ο ειδικός για το πεπτίδιο κυτταρικός πληθυσμός, δεν υπάρχουν άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί.

Πιο αναλυτικά, οι γραμμές χρησιμοποιούνταν είτε απευθείας από την καλλιέργεια του MLPC, την ημέρα 14, είτε ξεπαγώνονταν από το υγρό άζωτο με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Τα κύτταρα μετρούνταν και τοποθετούνταν σε φρεάτια ανάλογα με τον αριθμό τους (4-6 $x10^5$ κύτταρα/M24 φρεάτιο ή 1.5-3 $x10^5$ κύτταρα/ M48 φρεάτιο). Στη συνέχεια αποψύχονταν τα ακτινοβολημένα κύτταρα που χρησιμοποιούνταν ως APC.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιούνταν δύο συστήματα αντιγονοπαρουσίασης, εναλλάξ σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης: ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα ή ακτινοβολημένα EBV B μετασχηματισμένα κύτταρα κατάλληλου HLA. Τα κύτταρα διεγέρτες μετρούνταν και τοποθετούνταν σε φιαλίδια 15 mL σε 1% HS-IDc με μέγιστη συγκέντρωση $6x10^6$ κύτταρα/mL. Ακολουθούσε η προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20 μg/mL και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (22 ^oC). Τα κύτταρα αναδεύονταν κάθε 15 λεπτά. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρούνταν και επιλεγόταν ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια (10-20 $x10^4$ κύτταρα/M24 φρεάτιο ή 0.5-1 $x10^4$ κύτταρα/M48). Ακολουθούσε πλύση (400 g, 6 λεπτά, 21^oC), επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο 10%HS-IDc και προσθήκη κυτταροκινών (40 U/mL IL-2, 20 ng/mL IL-4, 20 ng/mL IL-7 και 200 μM 1MW). Τέλος, τα κύτταρα διεγέρτες προσθέτονταν στην κυτταρική γραμμή και τα πιάτα τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης (37 ^oC, 8% CO_2) (**Εικόνα 22Α**).

Την 3^η και 5^η ημέρα μετά τη διέγερση γινόταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 20 U/mL IL-2 και 100 μM 1MW) ή και διαίρεση των μικροκαλλιεργειών ανάλογα με την ανάπτυξη των κυττάρων (**Εικόνα 22Β**). Την 7^η ημέρα συλλέγονταν μία μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιούνταν χρώση με το ειδικό και με μη ειδικό MHC-πολυμερές για να διαπιστωθεί το ποσοστό του ειδικού πληθυσμού στην καλλιέργεια. Στη συνέχεια οι κυτταρικές γραμμές συλλέγονταν, μετρούνταν και είτε παγώνονταν (2-6 $x10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο) είτε χρησιμοποιούνταν για περεταίρω αναλύσεις, όπως ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και η απομόνωση των CD8 Τ κυτταρικών κλώνων (**Εικόνα 22Γ**).



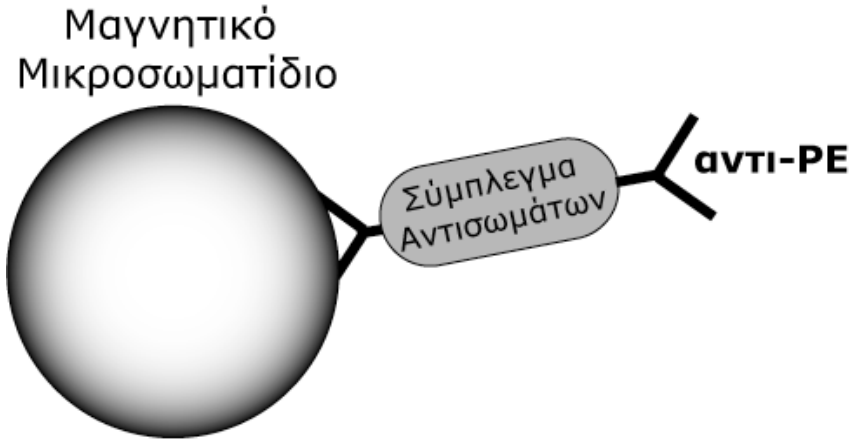
ΕΙΚΟΝΑ 22: Σχηματική απεικόνηση της καλλιέργειας μιας κυτταρικής γραμμής, και κυτταρομετρική ανάλυση του ειδικού για το πολυμερές CD8 πληθυσμού τις ημέρες 14 και 21 της λεμφοκυτταρικής καλλιέργειας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.11 Απομόνωση CD8 κλώνων

Οι ειδικοί CTL κλώνοι απομονώνονταν από το γενικότερο πληθυσμό της καλλιέργειας (**Εικόνα 21Α**) με μαγνητικό διαχωρισμό και στη συνέχεια καλλιεργούνταν υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης. Με τον μαγνητικό διαχωρισμό επιτυγχάνεται αύξηση της καθαρότητας του πληθυσμού επιλέγοντας αντισώματα έναντι ειδικών, για τον συγκεκριμένο πληθυσμό, επιφανειακών μορίων. Τα επιλεγμένα αντισώματα βρίσκονται συνδεδεμένα με μαγνητικά μικροσωματίδια και με αυτό τον τρόπο μπορούν να διαχωρίσουν τα κύτταρα σε δύο πληθυσμούς: στον θετικό πληθυσμό για το δείκτη που συνδέεται στους μαγνήτες (θετικό κλάσμα) και στον αρνητικό πληθυσμό που δεν συνδέεται στους μαγνήτες (αρνητικό κλάσμα). Για την απομόνωση των CD8 Τ κυτταρικών κλώνων το πιο ειδικό επιφανειακό μόριο είναι ο TCR και κατ' επέκταση το καταλληλότερο αντίσωμα για να συνδεθεί με τους μαγνήτες είναι το αντίστοιχο HLA-πολυμερές (**Εικόνα 23** και **24**).

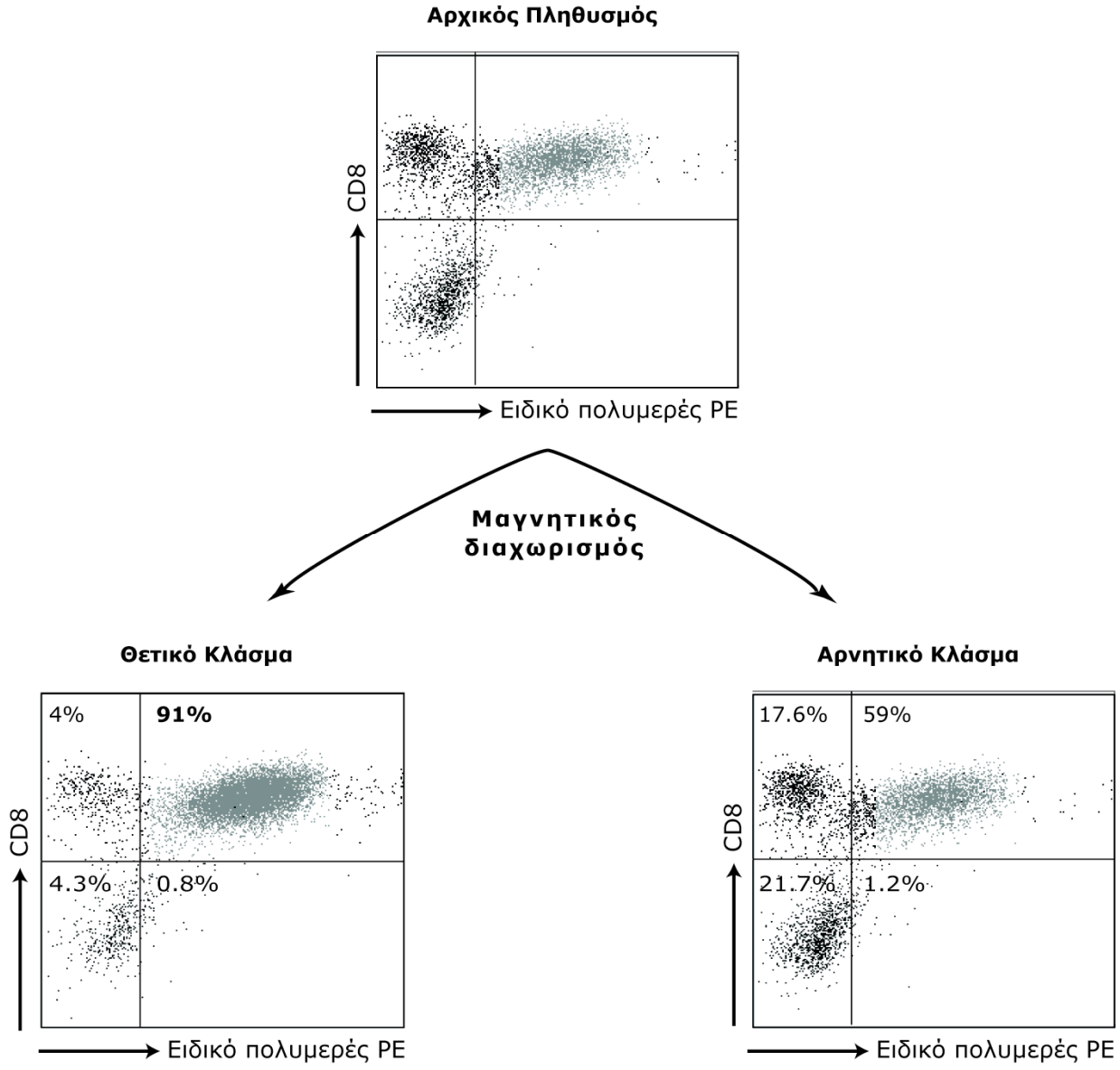
Αρχικά, οι CD8 Τ κυτταρικές γραμμές αποψύχονταν, είτε συλλέγονταν απευθείας από την καλλιέργεια. Ακολουθούσε καλλιέργεια των κυτταρικών γραμμών για μία εβδομάδα, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός τους ή/και το ποσοστό του θετικού πληθυσμού στην καλλιέργεια. Την 7^{η} ημέρα γινόταν χρώση με HLA-πολυμερές και όταν επιβεβαιωνόταν η παρουσία του θετικού πληθυσμού ακολουθούσε μαγνητικός διαχωρισμός. Τα κύτταρα συλλέγονταν σε σωληνάριο 15 mL και φυγοκεντρούνταν (400 g, 6 λεπτά). Επαναδιαλύονταν σε 0.2 mL διαλύματος χρώσης (διάλυμα PBS με 1% ανθρώπινο ορό) και ακολουθούσε χρώση με το HLA-πολυμερές για 20 λεπτά στους 37 ^{o}C και στη συνέχεια με αντίσωμα αντι-CD32 σε αναλογία 1/10 για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν (400 g, 6 λεπτά) σε διάλυμα χρώσης, επαναδιαλύονταν σε 1 mL διαλύματος διαχωρισμού και μεταφέρονταν σε σωληνάρια πολυστυρενίου 5 mL. Τα σωληνάρια μεταφέρονταν στη συσκευή διαχωρισμού ROBOSEP™ και πραγματοποιούνταν ο διαχωρισμός ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με την ολοκλήρωση του διαχωρισμού προσθέτονταν μία ποσότητα (~1-2 mL) πλήρους



ΕΙΚΟΝΑ 23: Μαγνητικό μικροσωματίδιο συνδεδεμένο με αντίσωμα αντι-PE, που θα ενωθεί με το αντίστοιχο φθωριόχρωμα του πολυμερούς, και κατ'επ'εκταση με το ειδικό CD8 κύτταρο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

θρεπτικού μέσου, αφού πρώτα καταγράφονταν οι όγκοι του θετικού και αρνητικού κλάσματος, και πραγματοποιούνταν μέτρηση των κυττάρων σε κάθε κλάσμα. Ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων (20,000-100,000 κύτταρα) από κάθε κλάσμα χρησιμοποιούνταν για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος με χρώση με HLA-πολυμερή (**Εικόνα 24**). Το αρνητικό κλάσμα παγώνονταν, ενώ το θετικό κλάσμα χρησιμοποιούνταν για την καλλιέργεια υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης.



ΕΙΚΟΝΑ 24: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρικής ανάλυσης του θετικού και αρνητικού κλάσματος, έπειτα από μαγνητικό διαχωρισμό με την χρήση του ειδικού πολυμερούς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Ο θετικά επιλεγμένος πληθυσμός φυγοκεντρούνταν (400 g, 6 λεπτά) και επαναδιαλύονταν σε κατάλληλο όγκο 10 %HS-IDc ώστε να βρεθεί σε συγκέντρωση 1 x10^6 κύτταρα/mL (**Εικόνα 25Α**). Ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις και οι αραιώσεις 10-0.1 κύτταρα/φρεάτιο τοποθετούνταν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 φρεατίων. Στις πλάκες αυτές προσθέτονταν 20 x10^3 EBV κύτταρα/φρεάτιο ως APC μετά από επώαση με το ειδικό πεπτίδιο και 1 x10^5 PBMCs/φρεάτιο ως κύτταρα τροφοί σε θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc με 100 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 100μM 1MW (**Εικόνα 25Β**). Οι πλάκες τοποθετούνταν για μία εβδομάδα σε θάλαμο επώασης (37 ^oC, 8% CO_2). Τα κύτταρα επαναδιεγείρονταν την 7^η ημέρα με τις ίδιες αναλογίες κυττάρων και κυτταροκινών (**Εικόνα 25Γ**). Από την 9^η μέχρι και την 14^η ημέρα ελέγχονταν καθημερινά το χρώμα του θρεπτικού μέσου και το μέγεθος του ιζήματος στις πλάκες μικροκαλλιέργειας. Όταν παρατηρούταν ανάπτυξη κυττάρων τα κύτταρα μεταφέρονταν σε μεγαλύτερα φρεάτια (M48 well, Corning) με 100 U/mL IL-2 και 100 μM 1MW. Ακολουθούσε χρώση με HLA-πολυμερή και εφόσον ανιχνεύονταν θετικός για το HLA-πολυμερές πληθυσμός >90% τα κύτταρα επαναδιεγείρονταν για μία εβδομάδα, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά καρκινικά κύτταρα σαν APC και EBV κύτταρα σαν κύτταρα τροφούς με 100 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 100 μM 1MW (**Εικόνα 25Δ**). Την 3^η μέχρι και την 5^η ημέρα μετά τη διέγερση πραγματοποιούνταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου ή/και διαίρεση των κυττάρων σε νέα φρεάτια. Την 7^η ημέρα επαναλαμβανόταν η χρώση με MHC-πολυμερή και εφόσον επαληθευόταν η ύπαρξη καθαρού πληθυσμού τα κύτταρα παγώνονταν ως CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος (2-6 x10^6 κύτταρα/φιαλίδιο) ή επαναδιεγείρονταν για να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση.

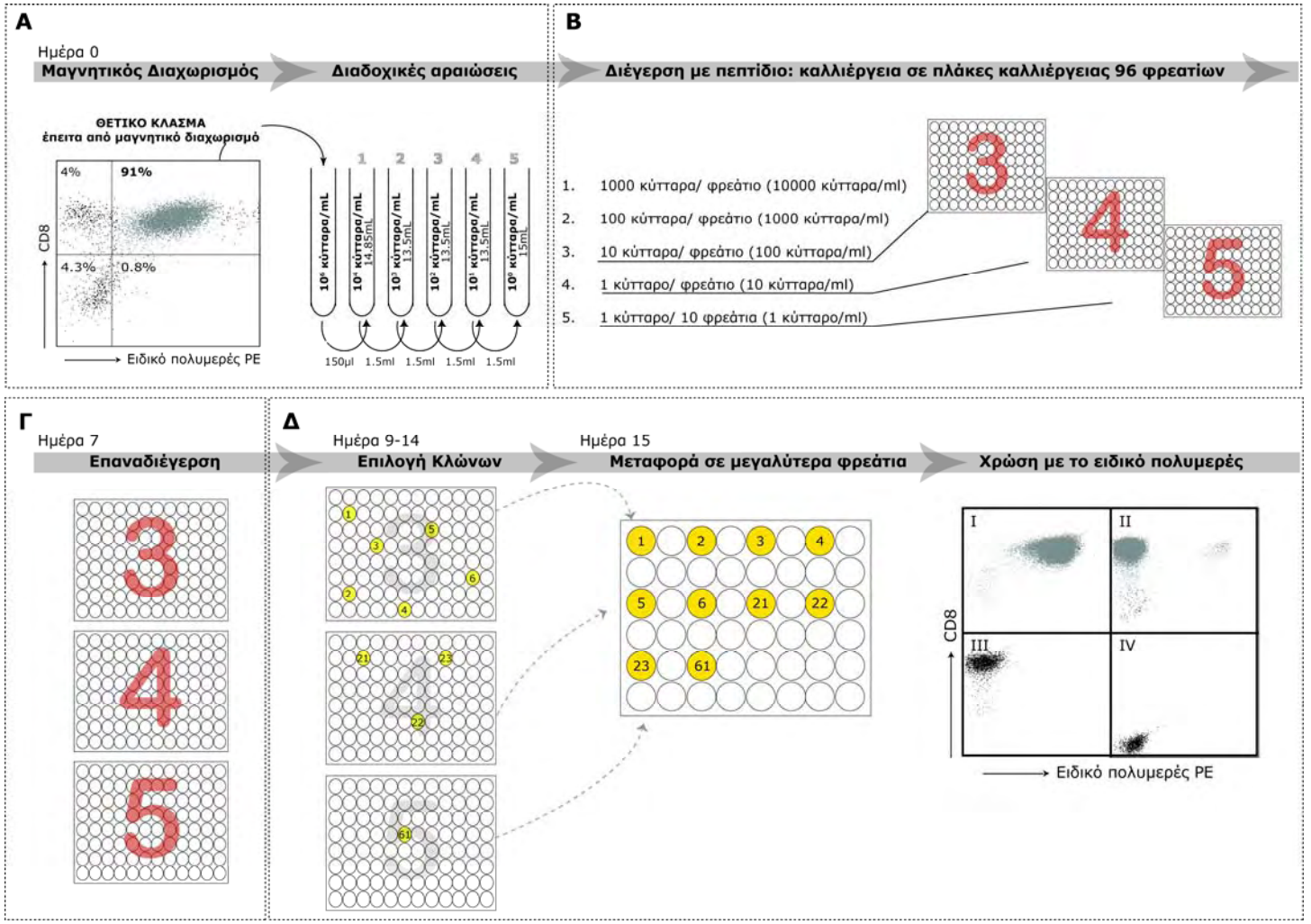
3.12 Καλλιέργεια CD8 T κλώνων

Ως CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος αναφέρεται ο πληθυσμός κυττάρων που έχει προέλθει από ένα αρχικό CD8 T ειδικό κύτταρο, ως εκ τούτου φέρει τα ίδια μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Σκοπός της καλλιέργειας αυτής ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των CTLs, ώστε να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω εφαρμογές.

Για την καλλιέργεια των κλώνων τα κύτταρα μετρούνταν και τοποθετούνταν σε φρεάτια ανάλογα με τον αριθμό τους (~0.6 x10^6 κύτταρα/M24 φρεάτιο). Στη συνέχεια αποψύχονταν τα ακτινοβολημένα κύτταρα που χρησιμοποιούνταν ως APC και κύτταρα τροφοί. Στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιούνταν δύο συστήματα αντιγονο-παρουσίασης, εναλλάξ σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης: ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα κατάλληλου HLA (APC) σε συνδυασμό με EBV B κύτταρα άσχετου HLA σαν κύτταρα τροφοί ή ακτινοβολημένα EBV B κύτταρα κατάλληλου HLA σε συνδυασμό με ακτινοβολημένα PBMCs άσχετου HLA σαν κύτταρα τροφοί. Τα κύτταρα διεγέρτες μετρούνταν και τοποθετούνταν σε φιαλίδια 15 mL σε 1%HS-IDc με μέγιστη συγκέντρωση 6 x10^6 κύτταρα/mL. Ακολουθούσε η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

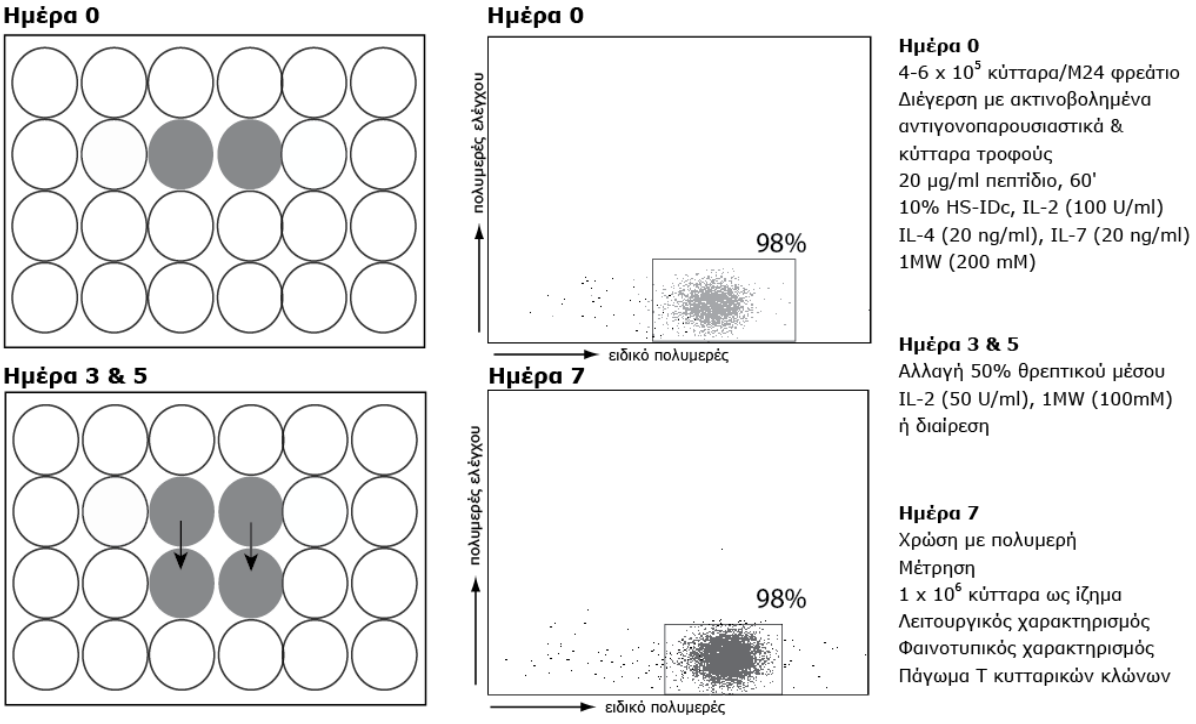


ΕΙΚΟΝΑ 25: Βήματα απομόνωσης κυτταρολυτικών κλώνων.

Α. Την ημέρα 0 πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του θετικού κλάσματος (αραιώσεις από 10000 κύτταρα/ml μέχρι 1 κύτταρο/ml **Β**. Οι αραιώσεις 100 κύτταρα/ml μέχρι 1 κύτταρο/ml τοποθετούνταν σε πλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων (πλάκες 3-5). Την ίδια μέρα ακολούθησε διέγερση των κυττάρων με το ειδικό πεπτίδιο παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και κυττάρων τροφών, και κυτταροκινών **Γ**. Τα κύτταρα επωάστηκαν για μια εβδομάδα και επαναδιεγέρθηκαν την ημέρα 7 υπό τις ίδιες συνθήκες. **Δ** Κύτταρα με υψηλό πολλαπλασιασμό, μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερα φρεάτια και εξετάστηκαν ως προς την ύπαρξη ειδικού πληθυσμού. Τα επιλεγμένα κύτταρα ήταν $CD8^+$/πολυμερές$^+$ (I), μικτοί πληθυσμοί των κυττάρων (II), ή $CD8^+$/πολυμερές$^-$ (III), και $CD8^-$/πολυμερές$^-$ πληθυσμοί (IV). Μόνο οι $CD8^+$/πολυμερές$^+$ πληθυσμοί (I) επιλέγονται για επαναδιέγερση και ανάλυση.

προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20 μg/mL και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναδεύονταν κάθε 15 λεπτά. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρούνταν και επιλεγόταν ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια (10-20 $x10^4$ APC/M24 φρεάτιο και 0.5-1 $x10^6$ κύτταρα τροφοί/M24 φρεάτιο). Ακολουθούσε πλύση (400 g, 6 λεπτά, 21 ^oC), επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc και προσθήκη κυτταροκινών. Τέλος, τα κύτταρα διεγέρτες προσθέτονταν στα φρεάτια και τα πιάτα τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης (37 ^oC, 5% CO_2).

Την 3η και 5η ημέρα μετά τη διέγερση γινόταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 50 U/mL IL-2 και 100 μM 1MW) ή και διαίρεση των κυττάρων σε νέα φρεάτια ανάλογα με την ανάπτυξή τους. Την 7η ημέρα συλλεγόταν μία μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιούνταν χρώση με το ειδικό και με μη ειδικό MHC-πολυμερές για να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου (**Εικόνα 26**). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονταν, μετρούνταν και είτε παγώνονταν (2-6 $x10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο) είτε χρησιμοποιούνταν για το λειτουργικό και φαινοτυπικό χαρακτηρισμό.



ΕΙΚΟΝΑ 26: Καλλιέργεια των CTL και κυτταρομετρική ανάλυση μετά από χρώση με ειδικό πολυμερές και πολυμερές ελέγχου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.13 Ανάλυση του ειδικού υποδοχέα των CD8 Τ κλώνων

Η ανάλυση του TCR των CD8 Τ κυτταρικών κλώνων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής και με PCR.

3.13.1 Εκχυλιση RNA και συνθεση cDNA

Η εκχύλιση RNA γινόταν με τη χρήση TRI, λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων που ήταν διαθέσιμα. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80 ^{o}C σε μορφή ιζήματος. Μόλις αποψύχονταν τοποθετούνταν απευθείας σε TRI (5-10 x 10^6 κύτταρα/mL) και ομογενοποιούνταν με ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 20 δευτερόλεπτα και εισαγωγή του δείγματος 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G. Το υλικό επωαζόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (12000 g, 10 λεπτά, 4 ^{o}C). Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο σωληνάριο και ακολουθούσε προσθήκη 100 μL χλωροφορμίου. Τα δείγματα ανακινούνταν με αναστροφή του σωληναρίου, επωάζονταν σε RT για 8 λεπτά και φυγοκεντρούνταν (12000 g, 10 λεπτά, 4 ^{o}C). Η υδάτινη φάση μεταφερόταν με προσοχή σε νέα σωληνάρια και προσθέτονταν 500 μL ισοπροπανόλη. Ακολουθούσε ανακίνηση του σωληναρίου για 10”, επώαση σε RT για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση (12000 g, 8 λεπτά, 20 ^{o}C). Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και το ίζημα επαναδιαλυόταν σε 1 mL αιθανόλη 75% (Scharlau) με αναστροφή των σωληναρίων. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν (7600 g, 5 λεπτά, 4 ^{o}C), το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα σωληνάρια παρέμεναν ανοικτά σε RT για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμιστεί η εναπομένουσα αιθανόλη. Προσθέτονταν 30 μL νερό ελεύθερο RNασών και τα δείγματα τοποθετούνταν απευθείας σε πάγο.

Μία μικρή ποσότητα RNA (2 μL) χρησιμοποιούνταν για ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση. Σαν τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNασών σε κυβέτες UVette. Στην ίδια κυβέτα τοποθετούνταν το άγνωστο δείγμα σε αραίωση 1/50 και υπολογιζόταν η συγκέντρωσή του σε ng/μL. Επαλήθευση της συγκέντρωσης και έλεγχος της ποιότητας του δείγματος για την παρουσία γενομικού DNA γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% με βρωμιούχο αιθίδιο. Εφόσον η συγκέντρωση του δείγματος υπερέβαινε τα 100ng/μL γινόταν προσαρμογή της συγκέντρωσης με νερό RNase-free και τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80 ^{o}C.

Προκειμένου να μετατραπούν τα μόρια mRNA σε συμπληρωματικά μόρια DNA (cDNA), απαιτείται η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Qiagen που περιελάμβανε: 10xRT buffer, διάλυμα dNTPs, Omniscript RT και H_2O ελεύθερο DNAσών και RNAσών. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν εξαμερή ως τυχαίοι εκκινητές και αναστολέας των RNAσών.

Τα δείγματα RNA και τα αντιδραστήρια αποψύχονταν και διατηρούνταν σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Αρχικά προετοιμάζονταν το μείγμα αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον πίνακα 13.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Αντιδραστήρια για την σύνθεση cDNA.

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
10xRT buffer	2.5
dNTP mix	2.5
RNAsin	0.31
Omniscript RT	1.25
RNase-free H_2O	4.44

Στη συνέχεια σε σωληνάρια PCR τοποθετούνταν 3.5 μL νερό με 4 μL τυχαία εξαμερή και 6.5 μL RNA. Τα σωληνάρια τοποθετούνταν στους 72 ^oC για 2 λεπτά και στη συνέχεια προσθέτονταν 11 μL μείγματος αντιδραστηρίων. Τα δείγματα επωάζονταν στους 42^oC για 60 λεπτά και στη συνέχεια για 10 λεπτά στους 65 ^oC, ώστε να επέλθει αδρανοποίηση των ενζύμων. Με το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 25 μL H_2O και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασία -20 ^oC μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.13.2 Ανάλυση του TCR με PCR

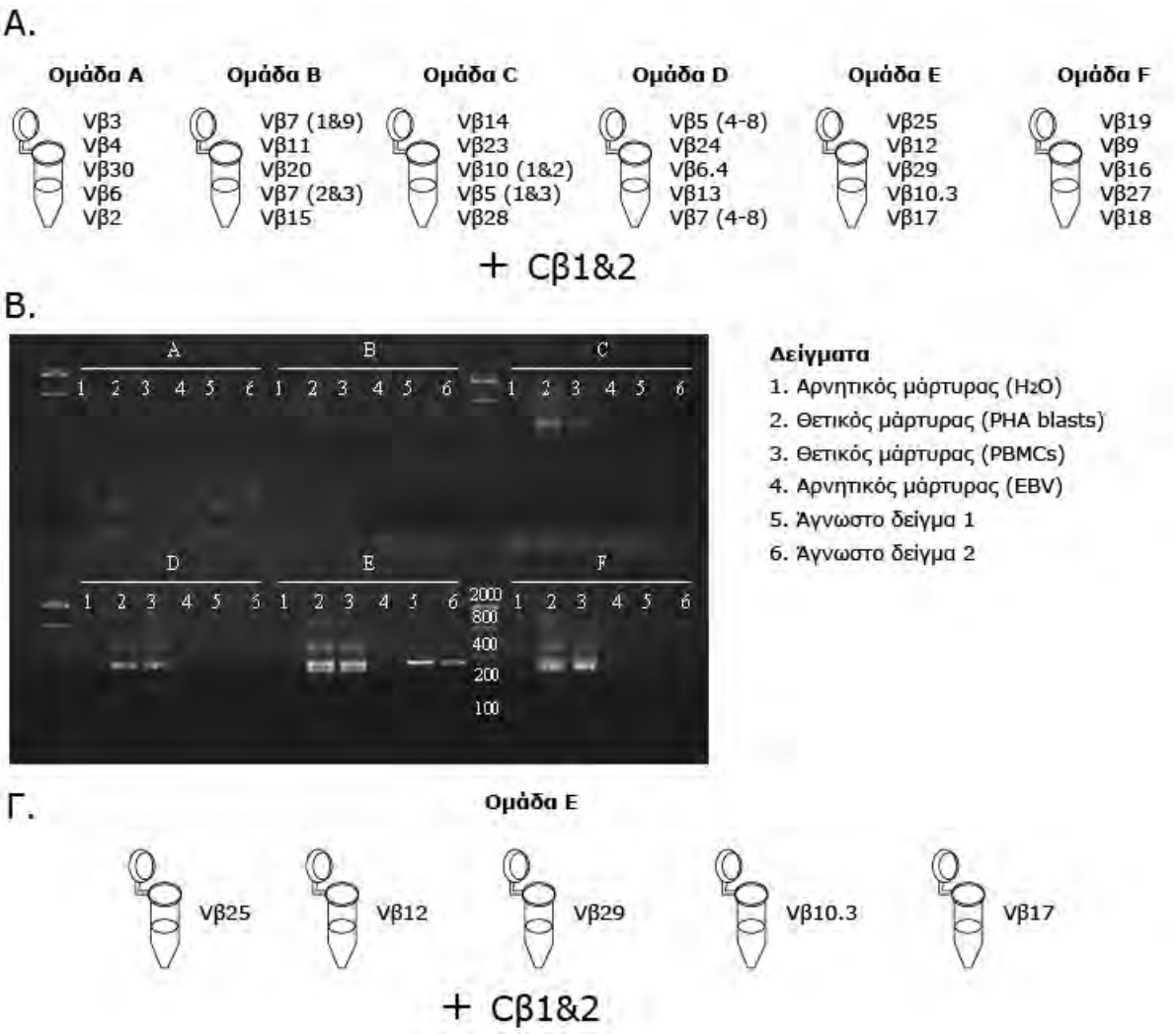
Η ανάλυση της αλυσίδας του TcR με PCR πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε η ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TcR και στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρης της β αλυσίδας. Η ταυτοποίηση της Vβ περιοχής πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο mRNA σε δείγματα κλώνων από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και υγιείς δότες ίδιας ηλικιακής ομάδας, όπου αυτό κατέστη δυνατόν. Συγκεκριμένα, συλλέγονταν 0.5-1 x10^6 κύτταρα του κλώνου και παγώνονταν σε μορφή ιζήματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε RNA και συντέθηκε cDNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε multiplex PCR ώστε να διευκρινιστεί η Vβ περιοχή του TcR (**Εικόνα 27Α**) με βάση επιλεγμένους εκκινητές (**Πίνακας 14**). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 94 ^oC για 5 λεπτά, ακολουθούμενοι από 35 κύκλους σε 94 ^oC για 45 δευτερόλεπτα, 70 ^oC για 60 δευτερόλεπτα, 72 ^oC για 90 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση 72 ^oC για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR τοποθετήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης με πυκνότητα 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (**Εικόνα 27Β**). Με βάση το μέγεθος της ζώνης και την ομάδα στην οποία ανιχνεύθηκε προϊόν επιλέγονταν στη συνέχεια συγκεκριμένοι εκκινητές και επαναλαμβάνονταν η PCR στις ίδιες συνθήκες (**Εικόνα 27Γ**). Καθώς τα κύτταρα του κλώνου έχουν προέλθει από ένα αρχικό κύτταρο και φέρουν τον ίδιο TcR στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθούσε ανιχνεύθηκε ένα μοναδικό προϊόν για κάθε κλώνο και ταυτοποιήθηκε η Vβ περιοχή του TcR.

Στο δεύτερο στάδιο της ανάλυσης του TcR πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρης της β αλυσίδας στα δείγματα όπου είχε αποκαλυφθεί η Vβ περιοχή του TcR. Αρχικά, ενισχυόταν το τμήμα Vβ-Cβ με PCR στις συνθήκες που αναφέρθηκαν και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Το προϊόν εξαγόταν από την πηκτή και καθαριζόταν με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθούσε αντίδραση Sanger με τη χρήση του BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, καθαρισμός με BigDye X-Terminator Purification Kit και αλληλούχιση του προϊόντος σε συσκευή ABI 310. Η αλληλουχία που προέκυπτε συγκρινόταν με τις γνωστές αλληλουχίες των περιοχών V-D-J-C της β αλύσου που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων ImMunoGeneTics (www.imgt.org) και διαπιστωνόταν έτσι η πλήρης σύσταση της β αλυσίδας του TCR.



ΕΙΚΟΝΑ 27: Ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TCR.

Α. Multiplex PCR με μείγματα εκκινητών που καλύπτουν τις Vβ αλυσίδες του TcR. **Β.** Απεικόνιση των προϊόντων της Multiplex PCR σε πηκτή αγαρόζης (A-F οι ομάδες των εκκινητών). Εφόσον κάθε κλώνος φέρει μία αλυσίδα Vβ αναμένεται ένα μοναδικό προϊόν (Ομάδα Ε, δείγματα 5 και 6). **Γ.** PCR για την ομάδα στην οποία ο κλώνος βρέθηκε θετικός με καθένα ζεύγος εκκινητών χωριστά. Αναμένεται ένα μοναδικό προϊόν που θα αποκαλύψει τη Vβ αλυσίδα του TcR του συγκεκριμένου κλώνου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Εκκινητές για την ανίχνευση της Vβ περιοχής του TcR

Ομάδα	Όνομα	Αλληλουχία	Μέγεθος (bp)
A	Vβ3	CCT-GGA-GCT-TGG-TGA-CTC-TGC	300
A	Vβ4	ACC-TGA-ATG-CCC-CAA-CAG-CTC	350
A	Vβ30	CCT-CCA-GCT-GCT-CTT-CTA-CTC	410
A	Vβ6 (εκτός 6-4)	GGT-ATC-GAC-AAG-ACC-CAG-GCA	450
A	Vβ2	AAG-TGA-TCT-TGC-GCT-GTG-TCC-CCA	500
B	Vβ7(1 & 9)	TGC-AGA-GAG-GCC-TAA-GGG-ATC	350
B	Vβ11	GAT-CGA-TTT-TCT-GCA-GAG-AGG-CTC	350
B	Vβ20	CAC-ATA-CGA-GCA-AGG-CGT-CGA	380
B	Vβ7(2 & 3)	GTG-TGA-TCC-AAT-TTC-AGG-TCA-TAC-TG	480
B	Vβ 15	CAG-TTT-GGA-AAG-CCA-GTG-ACC-C	500
C	Vβ14	CTG-CAG-AAC-TGG-AGG-ATT-CTG-G	310
C	Vβ23	CTC-AAT-GCC-CCA-AGA-ACG-CAC	350
C	Vβ10(1 & 2)	GGT-ATC-GAC-AAG-ACC-TGG-GAC-AT	440
C	Vβ5(1 & 3)	TGC-TCC-CCT-ATC-TCT-GGG-CA	470
C	Vβ28	GGA-GAG-AAA-GTT-TTT-CTG-GAA-TGT-GTC	500
D	5(4,5,6,7 & 8)	AGC-TCT-GAG-CTG-AAT-GTG-AAC-GCC	320
D	Vβ24	CTC-TCG-ACA-GGC-ACA-GGC-TAA-AT	350
D	Vβ 6-4	GTG-TCT-CCA-GAG-CAA-ACA-CAG-ATG-A	360
D	Vβ13	CTA-TCC-CTA-GAC-ACG-ACA-CTG-TC	470
D	Vβ7(4,6,7 & 8)	GGT-GTG-ATC-CAA-TTT-CGG-GTC-ATG	480
E	Vβ25	CAG-GCC-CTC-ACA-TAC-CTC-TCA	310
E	Vβ12	GAT-CCA-GCC-CTC-AGA-ACC-CAG	320
E	Vβ29	TTC-CCA-TCA-GCC-GCC-CAA-ACC-TAA	350
E	Vβ10(3)	CTC-TGA-GAT-GTC-ACC-AGA-CTG-AG	480
E	Vβ17	GCG-ATC-CAT-CTT-CTG-GTC-ACA-TG	480
F	Vβ19	CTC-ACT-GTG-ACA-TCG-GCC-CAA-AA	320
F	Vβ9	GCA-CAA-CAG-TTC-CCT-GAC-TTG-C	340
F	Vβ16	GAA-AGA-TTT-TCA-GCT-AAG-TGC-CTC-CC	360
F	Vβ27	CAA-AGT-CTC-TCG-AAA-AGA-GAA-GAG-GAA-T	360
F	Vβ18	CAG-CCC-AAT-GAA-AGG-ACA-CAG-TC	480

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Στις περιπτώσεις όπου από το ίδιο δείγμα αίματος ασθενούς ή υγιούς δότη είχαν προκύψει περισσότερες της μίας Τ γραμμές εκ των οποίων μία τουλάχιστον είχε ταυτοποιηθεί με την παραπάνω διαδικασία ακολούθουσε σύγκριση της Vβ αλυσίδας του TcR ανάμεσα στις γραμμές αυτές, ώστε να διαπιστωθεί εάν αφορούν τον ίδιο ή διαφορετικό κυτταρικό πληθυσμό. Οι γραμμές αυτές καλλιεργήθηκαν, ένα μέρος τους παγώθηκε ως ίζημα, απομονώθηκε RNA, έγινε σύνθεση cDNA και PCR με εκκινητές ειδικούς για τη CDR3 περιοχή της Vβ αλυσίδας. Παρουσία ειδικού προϊόντος υποδήλωνε ίδιο TcR και κατ΄ επέκταση ίδιο κυτταρικό πληθυσμό, ενώ απουσία διαφορετικό πληθυσμό CTL, ίδιας ειδικότητας.

3.13.3 Ανάλυση του TCR με κυτταρομετρια ροης

Με τη χρήση του τεστ IOTest Beta Mark (Beckman Coulter) διαπιστώθηκε η αλληλουχία της Vβ αλυσίδας του TcR για τη πλειοψηφία των δειγμάτων. Το προϊόν αυτό αποτελείται από 8 φιαλίδια που περιέχουν συνδυασμούς αντισωμάτων έναντι 24 ειδικοτήτων της αλυσίδας β του TcR, που καλύπτει το 70% των TcR του ανθρώπου. Τα κύτταρα συλλέγονταν από την καλλιέργεια (0.5-1 $x10^6$ κύτταρα) και απομακρύνονταν το θρεπτικό μέσο με πλύση με PBS. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνονταν, τα κύτταρα επαναδυαλύονταν σε 1 mL PBS και χωρίζονταν σε 10 φιαλίδια στα οποία είχαν προστεθεί τα αντισώματα του τεστ σε συνδυασμό με αντι-CD8-PC5 αντίσωμα. Ακολουθούσε χρώση στους 22 ^oC για 20 λεπτά στο σκοτάδι, πλύση με PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 0.5% FA-PBS. Η ανάλυση γινόταν με βάση τον πληθυσμό των ζωντανών $CD8^+$ κυττάρων και θεωρούνταν αποδεκτό ένα τεστ όταν το σύνολο των $CD8^+$ κυττάρων ήταν θετικό για έναν μόνο από τους 24 συνδυασμούς αντισωμάτων που αντιστοιχεί σε μία Vβ αλυσίδα του TcR.

3.14 Φαινοτυπικός Χαρακτηρισμός CD8 Τ Κυτταρων

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CTLs περιλαμβάνει την έκφραση δεικτών επιφανείας που χαρακτηρίζουν το στάδιο διαφοροποίησης τους (**Πίνακας 15**) και πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής.

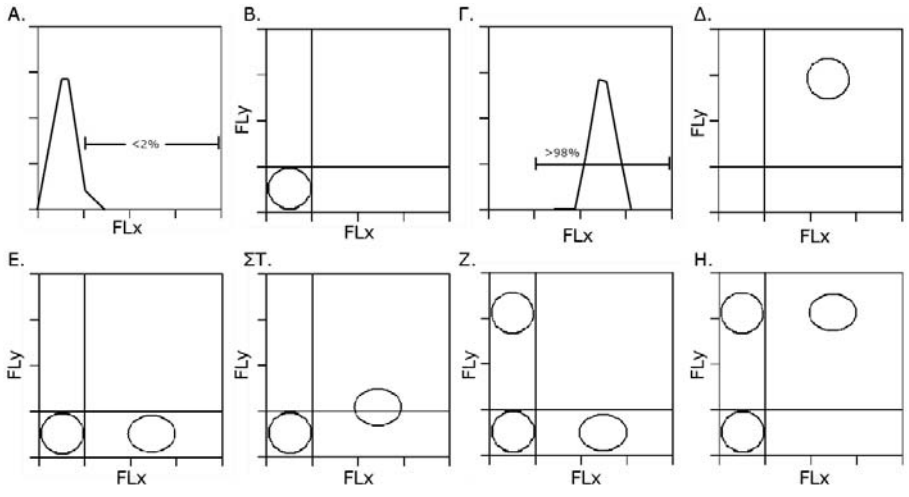
3.14.1 Σχεδιασμος Πρωτοκολλου Κυτταρομετριας Ροης

Τα πρωτόκολλα για την κυτταρομετρική ανάλυση όλων των δειγμάτων σχεδιάστηκαν από την αρχή, ώστε να εφαρμόζονται κάθε φορά στους συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και συνδυασμούς αντισωμάτων, ώστε να αποκλειστούν ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα. Το πρώτο βήμα αφορά τον καθορισμό των παραμέτρων για το συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, δηλαδή της τάσης (voltage) και της ηλεκτρονικής απόσβεσης (compensation). Για να καθοριστούν οι παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν τα εκάστοτε κύτταρα και αντισώματα συνδεδεμένα με τα φθοριοχρώματα που θέλαμε να χρησιμοποιήσουμε (FITC, PE, ECD, PC5, PC7) και μας έδιναν είτε θετικό (αντι-CD45) είτε αρνητικό φθορισμό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

(αντι-IgG1). Αρχικά, συλλεγόταν ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων (~5 x10^6 κύτταρα) και ακολουθούσε πλύση με 1% HS-PBS (1600 rpm, 5 λεπτά). Τα κύτταρα χωρίζονταν σε 10 φιαλίδια χρώσης και η πλύση επαναλαμβάνονταν στη μικροφυγόκεντρο (4000 rpm, 4 λεπτά). Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και σε κάθε φιαλίδιο προσθέτονταν αντισώματα όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 16.

Τα δείγματα επωάζονταν για 20 λεπτά στους 4 ^oC στο σκοτάδι. Στη συνέχεια προσθέτονταν διάλυμα χρώσης και ακολουθούσε πλύση (4000 rpm, 4 λεπτά). Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και το ίζημα επαναδιαλύονταν σε διάλυμα 0.5% FA-PBS και αναλύονταν στο κυτταρόμετρο. Με βάση τους ισοτυπικούς μάρτυρες (φιαλίδια 1-4) καθορίζονταν η τάση για κάθε κανάλι (FL1-FL4 αντίστοιχα), ώστε ο φθορισμός να είναι <2%. Ο συνδυασμός (φιαλίδιο 5) χρησιμοποιούνταν για να επιβεβαιώσει τη σωστή λειτουργία του πρωτοκόλλου. Με βάση τα φιαλίδια 6-9 καθορίζονταν η ηλεκτρονική απόσβεση για κάθε κανάλι (FL1-FL4 αντίστοιχα) και ο συνδυασμός των αντισωμάτων (φιαλίδιο 10) χρησιμοποιούνταν για να γίνουν μικρές τροποποιήσεις στις τιμές αυτές, ώστε οι πληθυσμοί που συνεκφράζουν δύο αντισώματα να έχουν τη σωστή κυτταρομετρική εικόνα. Σε ένα δεύτερο στάδιο δοκιμάζονταν εάν το πρωτόκολλο που είχε δημιουργηθεί μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τα υπό εξέταση επιφανειακά αντιγόνα με τη χρήση των εμπορικά διαθέστιμων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνταν στα ίδια κύτταρα τα υπό μελέτη αντισώματα σεσημασμένα με τα φθοριοχρώματα, το καθένα ξεχωριστά και στους συνδυασμούς που θέλαμε να τα χρησιμοποιήσουμε. Με βάση τα φιαλίδια αυτά πραγματοποιούνταν μικρές τροποποιήσεις στην ηλεκτρονική απόσβεση, ώστε όλοι οι πληθυσμοί να φαίνονται κάθετοι ή παράλληλοι με τους άξονες όταν απεικονίζονται σε στικτόγραμμα (**Εικόνα 28**).



ΕΙΚΟΝΑ 28: Ρύθμιση παραμέτρων κυτταρομετρικής ανάλυσης.

Α. Ρύθμιση της τάσης ώστε οι αρνητικοί πληθυσμοί σε κάθε κανάλι να έχουν φθορισμό <2% σε στικτόγραμμα **Β.** Ο συνδιασμός για δείκτη που δεν φέρουν τα κύτταρα πρέπει να δίνει αρνητικό πληθυσμό σε όλα τα κανάλια. **Γ.** Ρύθμιση της απόσβεσης ώστε οι θετικοί πληθυσμοί σε κάθε κανάλι να έχουν φθορισμό >98% σε στικτόγραμμα. **Δ.** Ο συνδιασμός για δείκτη που φέρουν τα κύτταρα πρέπει να δίνει διπλά θετικό πληθυσμό σε όλα τα κανάλια. **Ε-ΣΤ.** Ρύθμιση παραμέτρων σε πληθυσμό θετικό για το FLx και αρνητικό για το Fly. Χωρίς ρύθμιση της ηλεκτρονικής απόσβεσης (Ε), με ρύθμιση (ΣΤ). **Z-H.** Σωστή απεικόνιση των πληθυσμών έπειτα από ρύθμιση των παραμέτρων. Ολοι οι πληθυσμοί να φαίνονται κάθετοι ή παράλληλοι με τους άξονες όταν απεικονίζονται σε στικτόγραμμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των επιφανειακών αντιγόνων που μελετήθηκαν.

Αντιγόνα	Βιολογικός ρόλος	Κυτταρική κατανομή	Βιβλιογραφία
CD8	Συνυποδοχέας των τάξης I MHC μορίων	Τ κυτταρολυτικά, υποπληθυσμό των NK-κυττάρων, θυμοκύτταρα	149, 150
CD28	Ενεργοποίηση παρθένων Τ-κυττάρων, συνδέεται με τα CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2)	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (CD3+, CD4+), Ενεργοποιημένα Β-κύτταρα	151, 152
CD45	Ευοδώνει τη μεταβίβαση του μηνύματος του BcR και του TcR	Λευκοκύτταρα	153, 154
CD45RA	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (παρθένα) και Β-κυττάρων, μονοκύτταρα – μακροφάγα	154, 155**Error!**
CD45RO	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων (μνημονικά) και Β-κυττάρων, μονοκύτταρα	154, 155
CD57	Ολιγοσακχαρίτης, βρίσκεται σε πληθώρα επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών	NK κύτταρα, υποπληθυσμοί Τ κυττάρων, Β κύτταρα και μονοκύτταρα	155
CCR7	Υποδοχέας χυμοκινών για μετακίνηση στους λεμφαδένες	Υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων και Β-κυττάρων, δενδριτικά κύτταρα	156, 157

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό πρωτοκόλλου

α / α	Αντίσωμα	Διάλυμα χρώσης	α / α	Αντίσωμα	Διάλυμα χρώσης
1	10μl IgG1 –FITC	80μl	6	10μl CD45 -FITC	80μl
2	10μl IgG1 –PE	80μl	7	10μl CD45 -PE	80μl
3	10μl IgG1 –ECD	80μl	8	10μl CD45 -ECD	80μl
4	10μl IgG1 -PC5	80μl	9	10μl CD45 -PC5	80μl
5	συνδυασμός 1-4	50μl	10	συνδυασμός 6-9	50μl

Τέλος, δοκιμάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις των υπό διερεύνηση δεικτών, ώστε να αποκλειστεί η μη ειδική σύνδεση και να καθοριστεί η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιούνταν το κάθε αντίσωμα. Οι παράμετροι που προέκυπταν από τη διαδικασία αυτή αποθηκεύονταν στον αναλυτή και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.

3.14.2 CD8 T Κλωνοι

Η φαινοτυπική ανάλυση των κλώνων λάμβανε χώρα την 7η μέρα της καλλιέργειας του κλώνου. Μικρός αριθμός κυττάρων (~300,000 κύτταρα) συλλεγόταν από την καλλιέργεια και χωρίζονταν σε τρία φιαλίδια χρώσης. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις σε 1% HS-PBS (4000rpm, 4 λεπτά) ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Στο πρώτο φιαλίδιο γινόταν χρώση με τετραμερές ώστε να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου στην καλλιέργεια.

Στο δεύτερο φιαλίδιο προσθέτονταν τα αντισώματα αντι-CD45RA-FITC, CD45RO-ECD (Beckman Coulter), CCR7-PE (RD systems), και CD8-PC5 (Beckman Coulter) και στο τρίτο φιαλίδιο τα αντισώματα αντι-CD28-PE, CD57-FITC και CD8-PC5 (Beckman Coulter). Όλα τα αντισώματα προσθέτονταν σε αραίωση 1/20, εκτός από το CD45RO-ECD το οποίο προσθέτονταν σε αραίωση 1/10. Τα κύτταρα επωάζονταν στους 4 °C για 30 λεπτά και ακολουθούσε πλύση με 1% HS-PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 0.5% FA-PBS. Η ανάλυση γινόταν με βάση το $CD8^+$ πληθυσμό και μελετούνταν η συνέκφραση των μορίων CD45RO και CCR7 ή CD45RA και CCR7 στο ένα φιαλίδιο και η έκφραση των μορίων CD28 και CD57 στο δεύτερο.

Πίνακας 17. Οι συνδυασμοί των mAb που χρησιμοποιήθηκαν για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CD8 T κυτταρικών κλώνων

FITC	PE	ECD	PC5
CD8	πολυμερές		
CD45RA	CD45RO	CCR7	CD8
CD57	CD28		CD8

3.14.3 CD8 T γραμμες

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των γραμμών περιελάμβανε την έκφραση των ίδιων δεικτών επιφανείας (CD45RO, CCR7, CD57 και CD28) επικεντρώνοντας στον θετικό για το MHC-πολυμερές πληθυσμό. Η φαινοτυπική ανάλυση των γραμμών λάμβανε χώρα την ημέρα που ξεπαγώνονταν τα κύτταρα και επαναλαμβανόταν την 7η ημέρα της καλλιέργειας. Μικρός αριθμός κυττάρων (~300,000 κύτταρα/φιαλίδιο) συλλεγόταν από την καλλιέργεια και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια χρώσης. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1% HS-PBS (4000rpm, 4 λεπτά) ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Αρχικά γινόταν χρώση με τετραμερές για 20 λεπτά στους 37 ^{o}C. Στο ένα φιαλίδιο προσθέτονταν τα αντισώματα αντι-CCR7-APC (1/10, RD systems), CD45RO-ECD (1/10), CD8-PC7 (1/50, Beckman Coulter) και CD28-FITC (1/20, Immunotech) και στο δεύτερο φιαλίδιο τα αντισώματα αντι-CCR7-APC (1/10), CD45RO-ECD (1/10), CD8-PC7 (1/50) και CD57-FITC (1/20, Immunotech). Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37 °C για άλλα 30 λεπτά και ακολουθούσε πλύση με 1% HS-PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 0.5% FA-PBS. Η ανάλυση γινόταν με βάση το $CD8^{+}$ πληθυσμό και μελετούνταν η έκφραση των μορίων CD45RO, CCR7, CD28 και CD57 στον θετικό για το πολυμερές πληθυσμό.

Πίνακας 18. Οι συνδυασμοί των mAb που χρησιμοποιήθηκαν για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CD8 Τ κυτταρικών κλώνων

FITC	PE	ECD	APC	PC7
CD28	πολυμερές	CD45RO	CCR7	CD8
CD57	πολυμερές	CD45RO	CCR7	CD8

3.15 Λειτουργική ανάλυση CD8 Τ Κλώνων

Οι CD8 κυτταρολυτικοί κλώνοι μελετήθηκαν λειτουργικά όσον αφορά την ικανότητά τους να λύουν κύτταρα στόχους και να παράγουν κυτταροκίνες έπειτα από ειδική διέγερση. Η λυτική ικανότητα μελετήθηκε με τη χρήση ^{51}Cr, ενώ η ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών προσεγγίστηκε με κυτταρομετρία ροής καθώς και με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία.

3.15.1 Προσδιορισμος Κυτταροκινων – Ενδοκυτταρια Χρωση

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση μεταβολικών ουσιών που εμποδίζουν την μεταφορά των πρωτεϊνών που παράγονται έξω από το κύτταρο. Οι κυτταροκίνες συγκεντρώνονται με αυτόν τον τρόπο στο ενδοπλασματικό και κυστιδιακό δίκτυο μέσα στο κύτταρο. Αν στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιηθούν και καταστούν διαπερατά με τη χρήση ήπιων απορρυπαντικών, τα αντισώματα μπορούν να αποκτήσουν πρόσβαση σε αυτές τις θέσεις και να ανιχνεύσουν την κυτταροκίνη. Τα Τ κύτταρα μπορούν να σημανθούν ταυτόχρονα και με άλλους δείκτες και με αυτόν τον τρόπο να χαρακτηριστούν περαιτέρω.

Η διαδικασία ξεκινούσε δύο - τρεις ημέρες μετά τη τελευταία ενεργοποίηση του κλώνου. Τα κύτταρα (~1 x10^{6} κύτταρα) διατηρούνταν σε κατάσταση ηρεμίας με σταδιακή μείωση της IL-2 στην καλλιέργεια. Τα κύτταρα συλλέγονταν και ακολουθούσε πλύση, επαναδιάλυση σε 10% HS-IDc και καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια χωρίζονταν σε δύο M48 φρεάτια, ένα για την ειδική και ένα για

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

τη μη ειδική ενεργοποίηση και τοποθετούνταν στους 37 ^{o}C έως ότου ετοιμαστούν τα κύτταρα διεγέρτες.

Τα καρκινικά κύτταρα συλλέγονταν από την καλλιέργεια (2 x10^{6} κύτταρα) και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια των 15 mL σε 1% HS-IDc. Ακολουθούσε η προσθήκη του ειδικού και του μη ειδικού πεπτιδίου αντίστοιχα και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρούνταν και επιλεγόταν ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την ενεργοποίηση των CTL (αναλογία 10 CTL:1 καρκινικό). Ακολουθούσε πλύση (400 g, 6 λεπτά, 21 ^{o}C), επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc και προσθήκη 10 U/mL IL-2. Τα καρκινικά κύτταρα προσθέτονταν στα CTL και επωάζονταν για 60 min στους 37 ^{o}C, 8% CO_2. Κύτταρα διεγέρτες τοποθετούνταν επίσης σε ξεχωριστά φρεάτια για να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Μετά την επώαση προσθέτονταν η ουσία μπρεφελντίνη (BFA, BD) σε αραίωση 1/500 και τα κύτταρα παρέμεναν στο θάλαμο επώασης για άλλες 18 ώρες.

Την επόμενη μέρα τα κύτταρα συλλέγονταν σε φιαλίδια χρώσης και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (4000 rpm, 4 λεπτά) ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επαναδιαλυόταν σε διάλυμα χρώσης και η πλύση επαναλαμβανόταν στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και το ίζημα επαναδιαλυόταν σε ειδικό διάλυμα που προκαλούσε οπές στην μεμβράνη των κυττάρων και τοποθετούνταν για 20 λεπτά στους 4 ^{o}C. Στην συνέχεια προσθέτονταν το διάλυμα πλύσης και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (4000 rpm, 4 λεπτά). Τα κύτταρα διαλύονταν σε διάλυμα πλύσης και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια για τη χρώση με τις διαφορετικές κυτταροκίνες. Η πλύση επαναλαμβάνονταν στις ίδιες συνθήκες και στο διάστημα αυτό προετοιμάζονταν για τη χρώση δύο συνδυασμοί χρωμάτων: ο πρώτος περιελάμβανε τα αντισώματα αντι-CD69-PC5 (1/10), CD8-PC7 (1/10), CD45-ECD (1/10), IFN-g-FITC (1/5, BD), IL-4-PE (1/5, IO Test) και ο δεύτερος τα αντισώματα αντι-CD69-PC5 (1/10), CD8-PC7 (1/10), CD45-ECD (1/10), IL-2-FITC (1/40), IL-10-PE (1/5). Ακολουθούσε επαναδιάλυση των κυττάρων στο μίγμα των αντισωμάτων και επώαση για 30 λεπτά στους 4 ^{o}C. Τέλος, τα κύτταρα πλένονταν με διάλυμα πλύσης (4000 rpm, 4 λεπτά), επαναδιαλύονταν σε διάλυμα χρώσης και αναλύονταν στο κυτταρόμετρο.

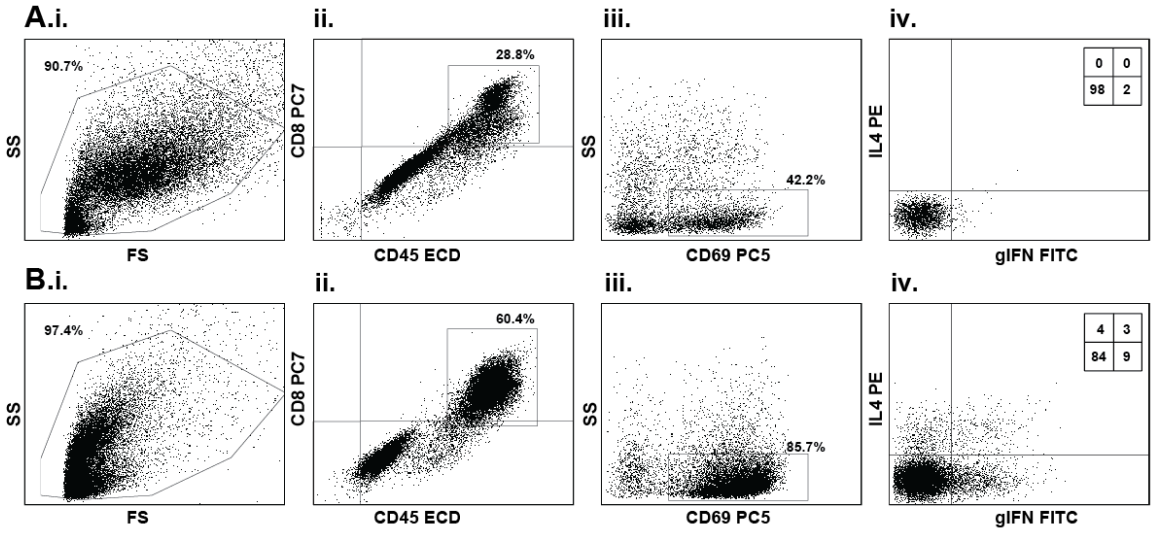
Η ανάλυση πραγματοποιούνταν στον $CD8^{+}$ $CD45^{+}$ $CD69^{+}$ πληθυσμό και ελεγχόταν η έκφραση των κυτταροκινών από τα κύτταρα του κλώνου που ενεργοποιήθηκαν ειδικά σε σχέση με την μη ειδική διέγερση (**Εικόνα 29**).

3.15.2 Προσδιορισμος Κυτταροκινων - Μικροσφαιριδιακη Κυτταρομετρια

Η ικανότητα των κλώνων να παράγουν κυτταροκίνες επαληθεύθηκε και μετρήθηκε ποσοτικά με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία. Χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο αυτή το kit Human Extracellular Protein Buffer Reagent Kit (FIDIS) και αναλυτής Luminex100.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Η διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων ήταν όμοια με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης, με τη διαφορά πως τα CTLs επωάζονταν για 18 ώρες με τα APC κύτταρα απουσία BFA. Με τον τρόπο αυτό οι κυτταροκίνες που παράγονταν εκκρίνονταν στο θρεπτικό μέσο. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα συλλέγονταν σε φιαλίδια 15 mL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (1600 rpm, 5 λεπτά). Το θρεπτικό μέσο συλλεγόταν και αποθηκευόταν στους -80 ^{o}C σε κλάσματα των 500 μL, ενώ τα κύτταρα μεταφερόταν σε φιαλίδια eppendorf και παγωνόταν σαν ίζημα σε LN_2. Για την ανάλυση των δειγμάτων με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία τα δείγματα αποψύχονταν και 50 μL χρησιμοποιούνταν σαν διπλότυπα για τον έλεγχο παραγωγής κυτταροκινών, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



ΕΙΚΟΝΑ 29: Κυτταρομετρική ανάλυση της ενδοκυττάριας χρώσης για την παραγωγή κυτταροκινών.

A. Μη ειδική διέγερση, **B.** Ειδική διέγερση. Αρχικά επιλεγόταν ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων (i). Γινόταν οριοθέτιση στον πληθυσμό των $CD8^+$ Τ κυττάρων (ii) και ελεγχόταν η ενεργοποίησή τους (iii) και η ικανότητά τους να παράγουν κυτταροκίνες (iv).

3.15.3 Λυτικη Ικανοτητα

Τα ενεργοποιημένα CD8 Τ κύτταρα λύουν οποιοδήποτε κύτταρο παρουσιάζει στην επιφάνειά του το ειδικό πεπτίδιο που αναγνωρίζουν, συνδεδεμένο στο σύμπλοκο MHC. Συνεπώς η λειτουργικότητα των CTLs μπορεί να καθοριστεί μετρώντας τη θανάτωση κυττάρων στόχων από τα κυτταρολυτικά Τ κύτταρα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η δοκιμασία της απελευθέρωσης ^{51}Cr. Όλα τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ενσωματώσουν, χωρίς να απελευθερώνουν αυτόματα, μέσω της αντλίας K-Na, ραδιενεργά σεσημασμένο χρωμικό άλας του νατρίου ($Na_2{}^{51}CrO_4$). Όταν αυτά τα σεσημασμένα κύτταρα θανατωθούν από τα CTLs μετά από αλληλεπίδρασή τους, το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ραδιενεργό χρωμικό άλας απελευθερώνεται στο υπερκείμενο και μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση μετρητών ακτίνων γ.

Με αυτή την τεχνική καταμετρήθηκε η λυτική ικανότητα των CTLs που απομονώθηκαν. Αρχικά, τα κύτταρα στόχοι (~2 $x10^6$/ανάλυση) συλλέγονταν από την καλλιέργεια σε φιαλίδια 15 mL και ακολουθούσε πλύση με 10% HS-IDc (1600 rpm, 6 λεπτά). Αφαιρούνταν όσο δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύονταν σε αντίστοιχο όγκο θρεπτικού μέσου 50% HS-IDc με αυτόν που αντιστοιχούσε σε 2 mCi ^{51}Cr με βάση τον χρόνο ημιζωής του. Στη συνέχεια προσθέτονταν το χρώμιο (^{51}Cr, Perkin Elmer) και τα κύτταρα επωάζονταν για 1 ώρα στους 37 ^oC, έτσι ώστε αυτό να εισέλθει στο εσωτερικό τους μέσω της αντλίας Na-Ka. Τα κύτταρα καλύπτονταν με φύλλα μολύβδου και αναδεύονταν κάθε 15 λεπτά. Ακολουθούσαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε τελικό όγκο 10 mL ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια Cr που δεν απορροφήθηκε από τα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνταν σε πλάκα Neubauer και χωρίζονταν σε δύο φιαλίδια με συγκέντρωση 5 $x10^4$/mL. Στο πρώτο προσθέτονταν το ειδικό πεπτίδιο σε συγκέντρωση 5 μg/mL ενώ στο δεύτερο δεν προσθέτονταν πεπτίδιο. Τα κύτταρα στόχοι επωάζονταν με το πεπτίδιο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διάστημα αυτό προετοιμάζονταν τα CTLs. Στην πρώτη σειρά πλάκας 96 φρεατίων σχήματος V (Corning), τοποθετούνταν 60 $x10^3$ κυτταρολυτικά/φρεάτιο και ακολουθούσαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις 3/1. Με το πέρας της επώασης προσθέτονταν τα κύτταρα στόχοι σε αναλογίες 30:1, 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1 και 0.1:1. Οι πλάκες φυγοκεντρούνταν (800rpm, 6 λεπτά), και ακολουθούσε επώαση (4 ώρες, 37 ^oC, 8% CO_2). Σε χωριστά φρεάτια τοποθετούνταν επίσης κύτταρα στόχοι τα οποία θανατώνονται πλήρως με τη χρήση απορρυπαντικού 1% TritonX-IDc (X-100, Sigma) (μέγιστη λύση) και κύτταρα στόχοι στα οποία δεν πραγματοποιούνταν καμία επέμβαση (ελάχιστη λύση). Τα δείγματα αυτά αποκάλυπταν τις τιμές της μέγιστης και ελάχιστης απελευθέρωσης χρωμίου.

Με το πέρας της 4ωρης επώασης συλλεγόταν με προσοχή το 50% του υπερκειμένου από κάθε φρεάτιο και υπολογιζόταν η λύση σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ ειδική λύση} = \frac{\text{πειραματική τιμή- ελάχιστη τιμή λύσης}}{\text{μέγιστη τιμή λύσης - ελάχιστη τιμή λύσης}} \text{ x100}$$

Θετικό θεωρούνταν ένα τεστ όταν η τιμή της ειδικής λύσης ήταν >10% και υπήρχε διαφορά τουλάχιστον 1SD ανάμεσα στα κύτταρα στόχους που επωάστηκαν με το ειδικό πεπτίδιο σε σχέση με αυτά που δεν επωάστηκαν με πεπτίδιο. Επίσης, για να θεωρηθεί έγκυρο το αποτέλεσμα απαραίτητη προϋπόθεση ήταν τα κύτταρα στόχοι να παρουσίαζαν αυτόματη απελευθέρωση ^{51}Cr <15%.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

3.15.4 Συγγενεια του TcR

Η συγγένεια του TcR για το ειδικό πεπτίδιο μελετήθηκε σε κλώνους ασθενών και υγιών ατόμων με τη χρήση ραδιενεργού ^{51}Cr. Η διαδικασία ήταν όμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά πως διατηρούνταν σταθερή η αναλογία CTL:κύτταρα στόχους και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση του ειδικού πεπτιδίου.

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα στόχοι συλλέγονταν από την καλλιέργεια και σημαίνονταν με ^{51}Cr όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Κατά τη διάρκεια της επώασης με το ^{51}Cr προετοιμάζονταν οι αραιώσεις του ειδικού πεπτιδίου. Σε φρεάτια πλάκας V96 τοποθετούνταν σε διπλά αντίγραφα θρεπτικό υλικό 1% HS-IDc που περιείχε 60000 ng/ml του πεπτιδίου που αναγνωρίζει ο ειδικός Τ κυτταρικός κλώνος. Ακολουθούσαν 11 διαδοχικές αραιώσεις 1 προς 3 αλλάζοντας τα ρύγχη κάθε τρεις διαδοχικές αραιώσεις. Στην δωδέκατη θέση τοποθετούνταν θρεπτικό υλικό χωρίς την προσθήκη πεπτιδίου. Με την ολοκλήρωση της σήμανσης με το ^{51}Cr, σε όλα τα φρεάτια με τις αραιώσεις του πεπτιδίου προσθέτονταν τα κύτταρα στόχοι σε αναλογία 5000 κύτταρα/φρεάτιο και επωάζονταν για 30 λεπτά στους 37 ^{o}C. Ακολουθούσε πλύση με 1% HS-IDc (1800 rpm, 5 λεπτά), αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10% HS-IDc. Τέλος προσθέτονταν τα CTL σε αναλογία 10:1 ως προς τα κύτταρα στόχους και τοποθετούνταν στους 37 ^{o}C, 8% CO_2 για 4 ώρες.

Με το πέρας της επώασης συλλεγόταν με προσοχή το 50% του υπερκειμένου από κάθε φρεάτιο και υπολογιζόταν η λύση σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ ειδική λύση} = \frac{\text{πειραματική τιμή - ελάχιστη τιμή λύσης}}{\text{μέγιστη τιμή λύσης - ελάχιστη τιμή λύσης}} \times 100$$

3.16 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (x ± s) και αναλύθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 11.5 για Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Student's t test και ανάλυση X^2 χρησιμοποιήθηκαν για να αποκαλύψουν στατιστικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες. Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα θεωρήθηκε $P<0,05$.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

4.1 Συχνότητα CD8 Τ-κυττάρων ειδικών για πεπτίδια της σαρβιβίνης και της τελομεράσης

Η συχνότητα ανίχνευσης κυκλοφορούντων CTLs, ειδικών για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης και της τελομεράσης, υπολογίστηκε σε όλους τους ασθενείς χωριστά, και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη συχνότητα των υγιών. Στον πίνακα 19 παρουσιάζεται, για κάθε ασθενή, ο αριθμός των CD8 κυττάρων και ο αριθμός των MLPCs που εξετάστηκαν, ο αριθμός των θετικών MLPCs που εντοπίστηκαν, και η υπολογισμένη συχνότητα ανίχνευσης των ειδικών για τα πεπτίδια pCTLs. Οι συχνότητες που συμβολίζονται με «μικρότερο από» (<) αναφέρονται στις ελάχιστες συχνότητες μέχρι τις οποίες ήταν τεχνικά εφικτός ο προσδιορισμός ειδικών κυτταρολυτικών κλώνων, και κατά τις οποίες δεν εντοπίστηκε ειδικό CD8 Τ κύτταρο στην περιφέρεια. Ειδικά pCLTs για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης και της σαρβιβίνης-2B δεν εντοπίστηκαν σε 10 από τους 13 ασθενείς που εξέφραζαν HLA-A2 και σε 7 από τους 8 ασθενείς που εξέφραζαν HLA-A24, ενώ σε κανένα υγιή μάρτυρα δεν ανιχνεύτηκε CD8 Τ-κυτταρική απάντηση έναντι των πεπτιδίων της σαρβιβίνης και του υποτύπου της. Εν τούτοις, ειδικά για τα πεπτίδια της τελομεράσης pCTLs εντοπίστηκαν σε 7 από τους 13 HLA-A2-ασθενείς και σε 2 από τους 8 HLA-A24-ασθενείς (**Πίνακας 19**, ασθενείς P#5, 10, 11, 13, 19, 20 και ασθενείς P#4, 15 αντίστοιχα). Στην ομάδα των υγιών δοτών, εντοπίστηκαν ειδικά pCTLs για το πεπτίδιο hTERT.A2 σε 2 από τους 4 δότες και για το πεπτίδιο hTERT.A24 σε 1 από τους 2 HLA-A24-δότες (**Πίνακας 20**, δείγμα N#1, N#3 και δείγμα N#5 αντίστοιχα). Τέλος, ο εντοπισμός ειδικών pCTL δεν παρουσίασε συσχέτιση ($p>0.05$) με την έκφραση των αντιγόνων στον καρκινικό ιστό των ίδιων ασθενών (**Πίνακας 21**), όπως προέκυψε από αντίστοιχη μελέτη του εργαστηρίου [158].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε τρεις ασθενείς ανιχνεύτηκαν ειδικά CTLs έναντι των πεπτιδίων της σαρβιβίνης σε συχνότητα 1.5, 15 και 15 ανά 10^7 CD8 κύτταρα (**Πίνακας 19**, P#1, P#13 και P#20 αντίστοιχα), ενώ σε έναν ασθενή προσδιορίστηκε CD8 Τ κυτταρική απάντηση για το πεπτίδιο της σαρβιβίνης-2B σε συχνότητα 1.4 ειδικά CTLs ανά 10^7 CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος (**Πίνακας 19**, δείγμα P#13). Η συχνότητα των ειδικών CTL έναντι συγκεκριμένων πεπτιδίων εξετάστηκε και σε TILs NSCLC ασθενών. Στα δείγματα TILs από 2 ασθενείς που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκαν ειδικά pCTLs που να αναγνωρίζουν κάποιο από τα υπό διερεύνηση πεπτίδια (**Πίνακας 22**)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Οι συχνότητες των κυκλοφορούντων ειδικών για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης, της σαρβιβίνης-2B και της hTERT pCTLs που προσδιορίστηκαν στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

Αριθμός ασθενούς	Αριθμός CD8-κυττάρων που εξετάστηκαν (x10^6)	Αριθμός MLPCs που εξετάστηκαν	hTERT.A2		hTERT.A24		SURV.A2		SURV.A24	
			Θετικές MLPCs	f_4	Θετικές MLPCs	f^4	Θετικές MLPCs	f^4	Θετικές MLPCs	f^4
P#1	1,5	76	0	<7,4	0	<7,4	3(?)	15,0	0	<5
P#2	6,5	192	0	<3,6			0	<2,6		
P#3	10,0	171			0	<1			0	<1
P#4	2,8	93			1	3,6			0	<3,6
P#5	3,8	272	3	7,8			0	<2,6		
P#6	6,6	184	0	<1,5			0	<1,5		
P#7	2,3	127			0	<4,2			0	<4,2
P#8	3,5	160	1	2,6			0	<2,8		
P#9	1,6	88	0	<6,3			0	<6,3		
P#10	2,8	106	12	42,0			0	<3,5		
P#11	1,6	88	1	6,3			0	<6,3		
P#12	1,4	72			0	<7,3			0	<7,3
P#13	0,8	78	1	13,0			3(?)	1,5		
P#14	7,3	260			0	<1,4			1(?)	1,4
P#15	3,4	156			1	2,9			0	<2,9
P#16	3,8	192	0	<2,6			0	<2,6		
P#17	2,9	160			0	<3,4			0	<3,4
P#18	2,0	91	0	<5,2			0	<5,2		
P#19	3,6	152	2	6,9			0	<3,4		
P#20	2,0	168	2	9,9			3(?)	15,0		

[4] ***f*:** Η συχνότητα των ειδικών για το συγκεκριμένο πεπτίδιο pCTLs (ανά 10^7 CD8-κύτταρα περιφερικού αίματος). Δεν υπάρχουν τιμές, όπου ο HLA-A φαινότυπος δεν επέτρεπε τον προσδιορισμό. Βλ. κείμενο για την επεξήγηση των "?" και "<".

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 20. Συχνότητα των κυκλοφορούντων ειδικών για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης, της σαρβιβίνης-2B και της hTERT pCTLs που προσδιορίστηκαν στα υγιή άτομα.

Αριθμός δότη	Αριθμός CD8-κυττάρων που εξετάστηκαν (x10^6)	Αριθμός MLPCs που εξετάστηκαν	hTERT.A2		hTERT.A24		SURV.A2		SURV.A24	
			Θετικές MLPCs	*f*	Θετικές MLPCs	*f*	Θετικές MLPCs	*f*	Θετικές MLPCs	*f*
N#1	8,4	192	1	1,0			0	<1		
N#2	24,0	379	0	<0,4			0	<0,4		
N#3	5,0	208	1	2,0			0	<2		
N#4	2,5	176	0	<2,3	0	<2,3	0	<2,3	0	<2,3
N#5	6,4	248			1	1,6			0	<1,6

ΠΙΝΑΚΑΣ 21. Συσχέτιση ανίχνευσης αντιγονοειδικών CTLs με την έκφραση των αντιγόνων στον καρκινικό ιστό των ασθενών.

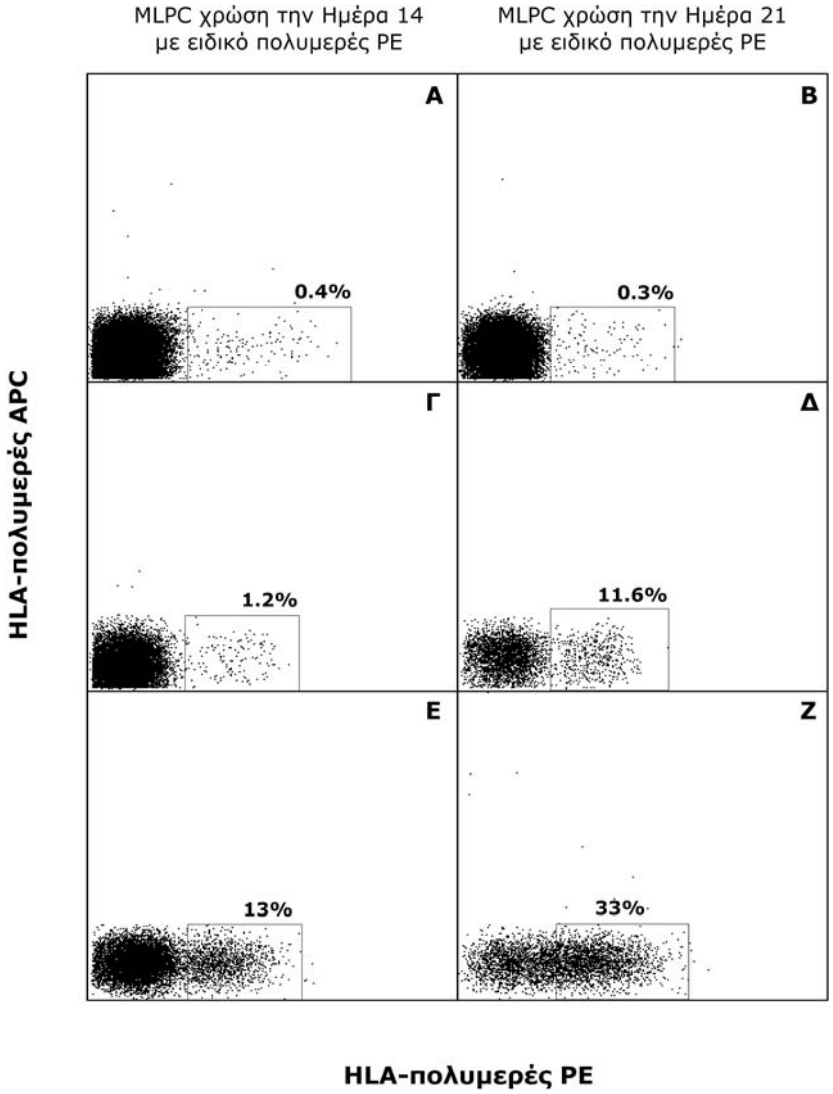
Αριθμός ασθενούς	HLA	CTL απάντηση			Έκφραση		
		Survivin	Survivin-2B	hTERT	Survivin	Survivin-2B	hTERT
P#7	A24	-	-	-	+	+	+
P#8	A2	-	-	-	+	+	+
P#9	A2	-	-	-	+	-	+
P#10	A2	-	-	+	+	+	+
P#11	A2	-	-	+	+	+	+

(+): εντοπισμός CTL απάντησης ή θετικής έκφρασης, (-): μη ανίχνευση CTL απάντησης ή αρνητικής έκφρασης

ΠΙΝΑΚΑΣ 22. Συχνότητα των ειδικών pCTLs έναντι των πεπτιδίων σε TILs ασθενών με NSCLC.

Αριθμός δότη	Αριθμός CD8-κυττάρων που εξετάστηκαν (x10^6)	Αριθμός MLPCs που εξετάστηκαν	hTERT.A2		hTERT.A24		SURV.A2		SURV.A24	
			Θετικές MLPCs	*f*	Θετικές MLPCs	*f*	Θετικές MLPCs	*f*	Θετικές MLPCs	*f*
P#7	0.7	48			0	<12			0	<12
P#8	0.5	25	0	<21			0	<21		

Σε αυτούς τους ασθενείς ωστόσο, η θετικότητα των MPLCs βασίστηκε στον εντοπισμό ειδικού πληθυσμού χαμηλής έντασης φθορισμού και χαμηλού ποσοστού των $CD8^+$ πολυμερές$^+$ κυττάρων στις μικροκαλλιέργειες (**Εικόνα 30Α**). Παρά το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα CTLs επαναδιεγέρθηκαν για άλλη μία εβδομάδα παρουσία ειδικού πεπτιδίου της σαρβιβίνης (βλέπε παράγραφο 3.10), οι κλώνοι δεν αναπτύχθηκαν, και έτσι οι συγκεκριμένες MLPCs θεωρήθηκαν αρνητικές (**Εικόνα 30Β**). Για αυτό το λόγο, ο αριθμός των συγκεκριμένων θετικών MLPCs που παρουσιάζονται στον πίνακα 19, συνοδεύεται από «ερωτηματικό» (?). Εν τούτοις, αυτό δεν συνέβη σε MLPCs διεγερμένες με το hTERT.A2 πεπτίδιο, οι οποίες ακόμη και όταν περιείχαν ειδικό $CD8^+$ πολυμερές$^+$ πληθυσμό, χαμηλού ποσοστού και χαμηλής έντασης φθορισμού, πολλαπλασιάστηκαν έπειτα από μία εβδομάδα ειδικής διέγερσης (**Εικόνα 30Γ και 30Δ**).



Εικόνα 30: Κυτταρομετρικός προσδιορισμός των ειδικών έναντι των υπό έλεγχο πεπτιδίων CTLs.

Τα στικτογράμματα A–Z αναφέρονται σε MLPCs έπειτα από σήμανση με Surv.A2-PE, hTERT.A2-PE και ενός APC-HLA-πολυμερούς-μάρτυρα (EBV πεπτίδιο). **Α, Β:** Σήμανση με Surv.A2-PE. Τα στικτογράμματα αναφέρονται σε ένα πιθανό θετικό πληθυσμό την ημέρα 14 της καλλιέργειας (Α) και μετά από μία εβδομάδα επαναδιέγερσης (Β). Τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάστηκαν και αυτή η MLPCs θεωρείτο αρνητική. **Γ, Δ:** Σήμανση με Surv.A2-PE. Σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα ενισχύθηκαν αι πολλαπλασιάστηκαν έπειτα από διέγερση, ημέρα 21 της καλλιέργειας (Δ). **Ε, Ζ:** PBMCs από μη σχετιζόμενο με την ηλικία δότη, εντοπίστηκε διακριτός αντι-Surv.A2 πληθυσμός την ημέρα 14 (Ε), ο οποίος ενισχύθηκε (x3) μετά από διέγερση (Ζ).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

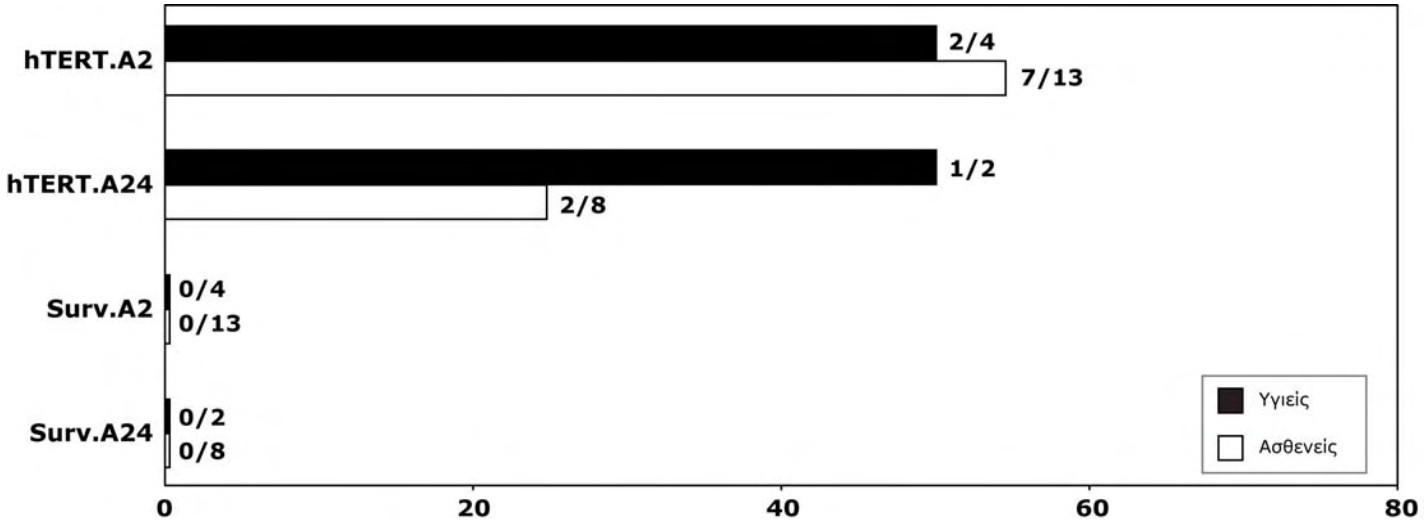
Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην συχνότητα ανίχνευσης αντιγονοειδικών pCTLs ανάμεσα σε ασθενείς με NSCLC και SCLC ($p > 0.05$). Στους ασθενείς εντοπίστηκαν ειδικά CTLs έναντι του πεπτιδίου hTERT.A2 σε 7 από τους 13 (53.8%) και έναντι του hTERT.A24 σε 2 από τους 8 ασθενείς (25%) ενώ εντοπίστηκαν ειδικοί πληθυσμοί για το πεπτίδιο Surv.A2 σε 3 από τους 13 (23%) και του πεπτιδίου Surv.A24 σε 1 από τους 8 ασθενείς (12.5%), στους οποίους όμως δεν ήταν εφικτή η ανάπτυξή και κατ'επέκταση η αξιολόγησή των ειδικών κλώνων. Αναλόγως, στους υγιείς δότες παρατηρήθηκε απάντηση μόνο έναντι πεπτιδίων της τελομεράσης, δηλαδή εντοπίστηκαν ειδικά CTLs έναντι του πεπτιδίου hTERT.A2 σε 2 από τους 4 υγιείς (50%), και έναντι του hTERT.A24 σε 1 από τους 2 υγιείς δότες (50%), τέλος σε κανένα δότη δεν εντοπίστηκαν ειδικά CTLs για το πεπτίδιο Surv.A2 και Surv.A24 (**Εικόνα 31**). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τα ποσοστά ανίχνευσης των πεπτιδίων της τελομεράσης ($p > 0.05$) ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς, ούτε ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών (NSCLC- SCLC) (**Εικόνα 32**).

Η αθροιστική συχνότητα αντιγονοειδικών pCTLs στους ασθενείς ($10.2 \pm 13.1 \times 10^{-7}$ CD8 Τ-κύτταρα του περιφερικού αίματος, όρια διακύμανσης: $2.6\text{-}9.9 \times 10^{-7}$) δεν παρατηρήθηκε υψηλότερη από την αντίστοιχη συχνότητα των υγιών δοτών ($1.5 \pm 0.5 \times 10^{-7}$ CD8 Τ-κύτταρα του περιφερικού αίματος, όρια διακύμανσης: $1.6\text{-}2 \times 10^{-7}$) (**Εικόνα 33Α)**. Η συχνότητα ανίχνευσης ειδικών για τα πεπτίδια της τελομεράσης κλώνων φάνηκε να είναι αυξημένη στους ασθενείς, η διαφορά αυτή όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (**Εικόνα 33Β)**. Η συχνότητα ανίχνευσης αντι-hTERT CD8 Τ-κυττάρων ήταν η ίδια με την αθροιστική συχνότητα που περιγράφθηκε παραπανω ($10.2 \pm 13.1 \times 10^{-7}$ CD8 Τ-κύτταρα του περιφερικού αίματος) και αυτό επειδή, τα pCTLs που εντοπίστηκαν ήταν ειδικά μόνο για τα πεπτίδια της τελομεράσης, ενώ δεν εντοπίστηκαν ειδικά CD8 Τ-κύτταρα για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης στους ασθενείς με καρκίνο και στους φυσιολογικούς δότες (**Εικόνα 33Γ**).

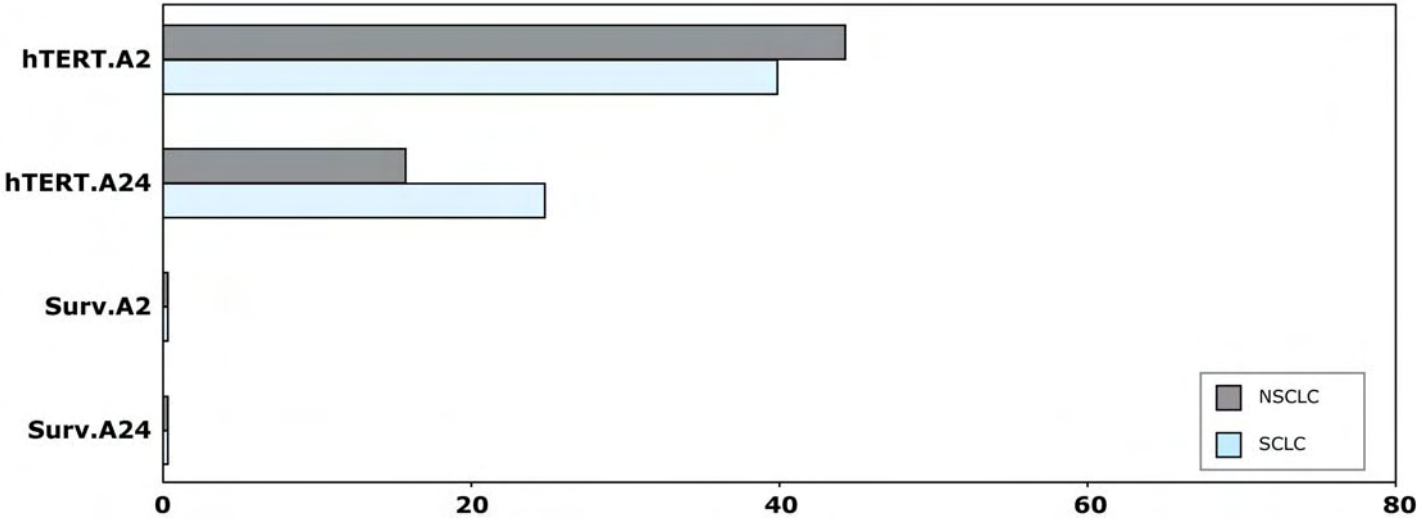
Ο προσδιορισμός της συχνότητας ανίχνευσης των κυκλοφορούντων pCTLs στηρίχτηκε στα κυτταρομετρικά χαρακτηριστικά των θετικών MLPCs, προερχόμενα από την κυτταρομετρική ανάλυση (βλέπε παράγραφο 3.9.2, εικόνα 19). Το μέσο ποσοστό των θετικών για τα πολυμερή CD8 Τ-κυττάρων (πολυμερές^{+}CD8^{+}) που αναπτύχθηκαν σε MLPCs υγιών δοτών ($1.6 \pm 0.7\%$, όρια διακύμανσης: 1.2-2.4%) φάνηκε να μη διαφέρει από το αντίστοιχο ποσοστό των πολυμερές^{+}CD8^{+} Τ-κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε MLPCs ασθενών ($1.3 \pm 1.9\%$, όρια διακύμανσης: 0.1-9.1%) (**Εικόνα 34Α**). Ομοίως, η μέση ένταση φθορισμού των HLA-πολυμερών των υγιών (13.7 ± 13.9, όρια διακύμανσης: 2-29) και των ασθενών (5.2 ± 6.5, όρια διακύμανσης: 0.2-27) φάνηκε να κυμαίνεται στις ίδιες τιμές (**Εικόνα 34Β**).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

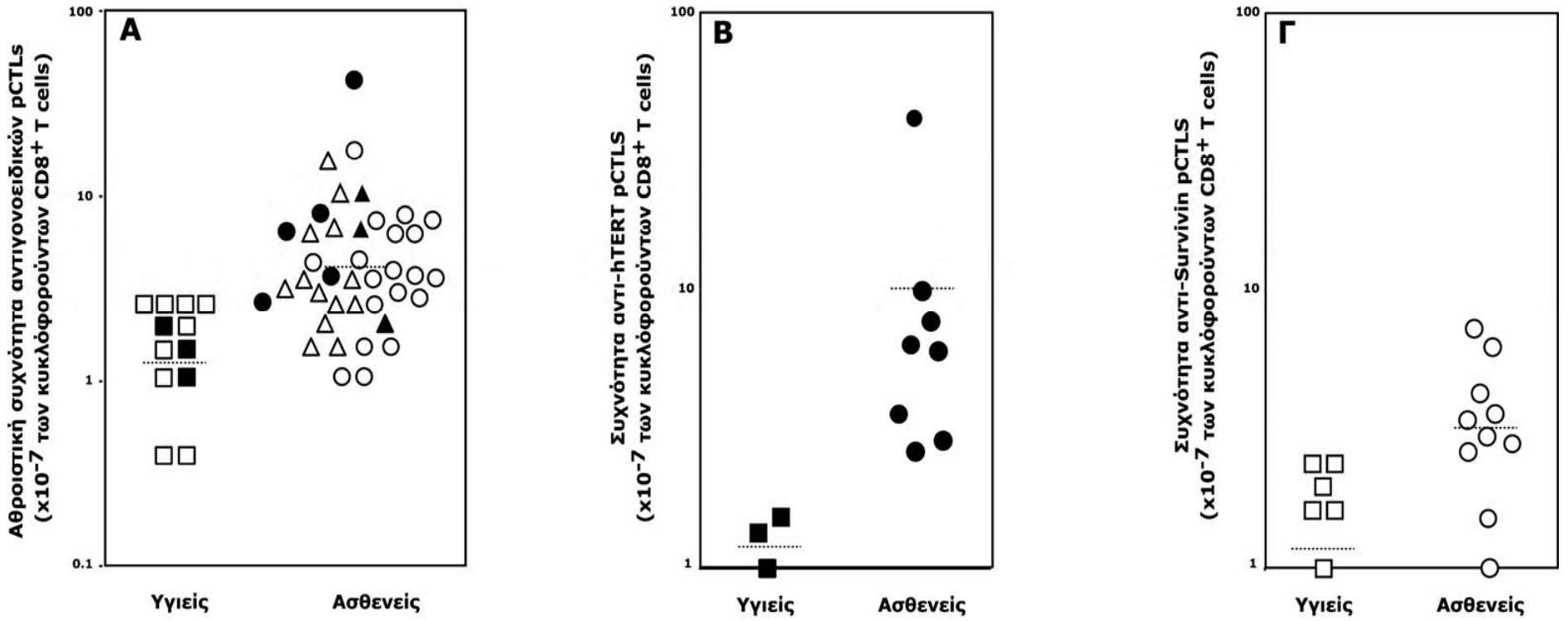


ΕΙΚΟΝΑ 31: Ποσοστό ασθενών και υγιών στους οποίους ανιχνεύτηκε CD8 Τ-κυτταρική απάντηση έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης και της hTERT.



ΕΙΚΟΝΑ 32: Η συχνότητα ανίχνευσης (%) αντιγονοειδικών pCTLs σε ασθενείς με NSCLC και SCLC.

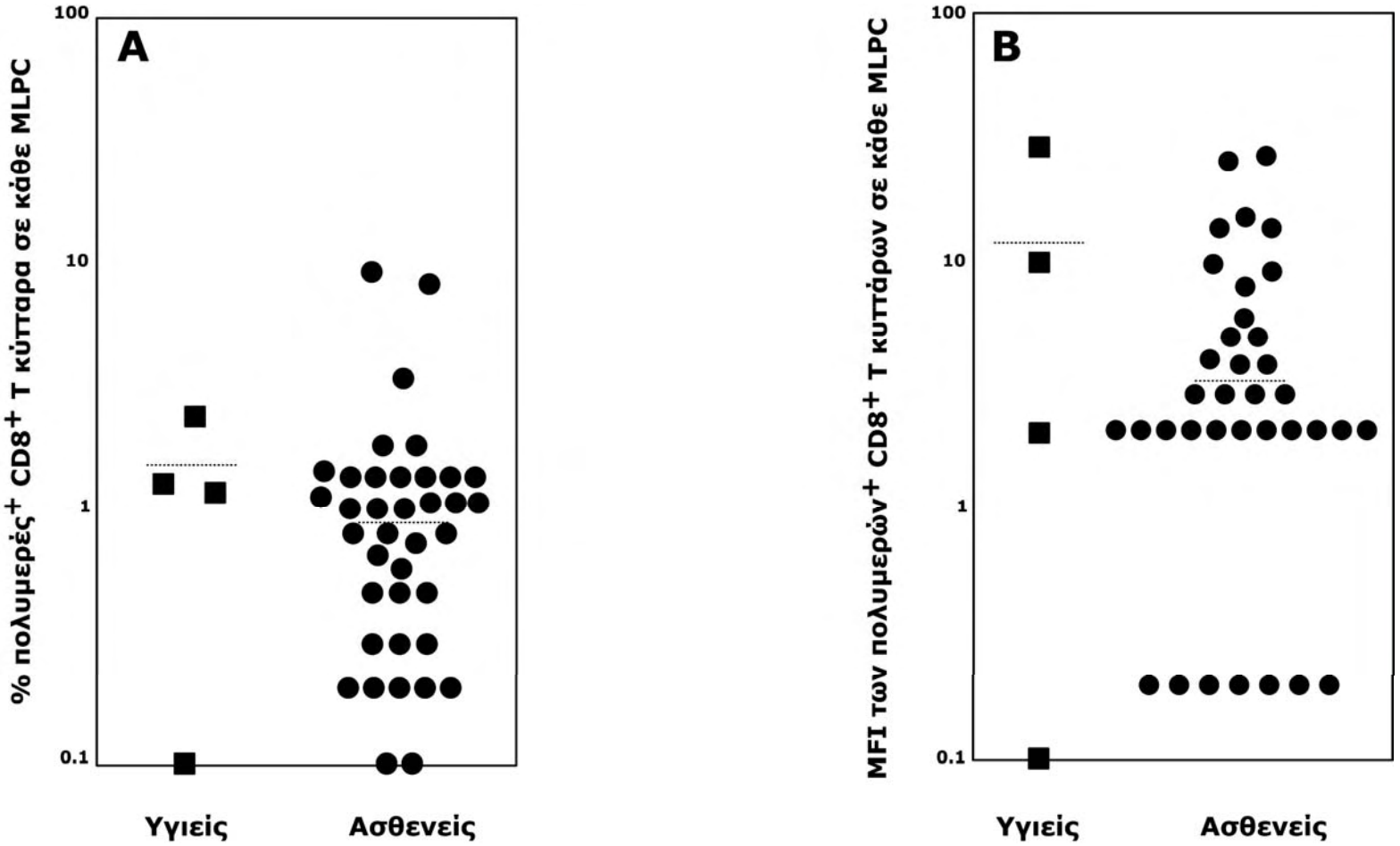
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 33: Συχνότητα ανίχνευσης αντιγονοειδικών pCTLs σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και σε υγιείς δότες.

Α. Αθροιστική συχνότητα των pCTLs (x10^{-7} CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος) ειδικών για τα πεπτίδια των αντιγόνων των όγκων που εξετάστηκαν σε υγιείς δότες (■), σε ασθενείς με NSCLC (●) και σε ασθενείς με SCLC (▲). **Β.** Συχνότητα ανίχνευσης αντι-hTERT κλώνων σε υγιείς και ασθενείς, **Γ.** συχνότητα αντι-survivin κλώνων κατα την οποία δεν ανιχνεύτηκε ειδικός CD8 κλώνος. Οι συχνότητες μέχρι τις οποίες δεν εντοπίστηκαν pCTLs συμβολίζονται με (□) στους υγιείς, με (○) και (△) στους NSCLC και SCLC ασθενείς αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 34: Κυτταρομετρικά χαρακτηριστικά των κυκλοφορούντων αντιγονοειδικών pCTLs

A: Ποσοστό των θετικών για το πολυμερές CD8 Τ-κυτταρικών πληθυσμών που εντοπίστηκαν σε κάθε θετική MLPC στους υγιείς δότες (■) και στους ασθενείς (●). **B:** Η μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity: MFI) των HLA-πολυμερών κάθε θετικής MLPC που βρέθηκε σε υγιείς (■) και σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (●). Η διακεκομμένη γραμμή αναφέρεται στον μέσο όρο τιμών της κάθε ομάδας.

4.2 Συχνότητα ειδικών CD8 Τ-κυττάρων έναντι ιικών πεπτιδίων

Ταυτόχρονα με τη μελέτη της απάντησης στα καρκινικά αντιγόνα μελετήθηκε και η παρουσία pCTLs ειδικών έναντι ιικών πεπτιδίων για να επιβεβαιώσει την ικανότητα της τεχνικής του MLPC να ανιχνεύει τη συχνότητα των αντιγονοειδικών CTL στην περιφέρεια. Όπως προέκυψε, οι ασθενείς εμφάνισαν σχεδόν ισοδύναμη ειδική αντι-EBV CTL απάντηση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός των θετικών MLPCs και η συχνότητα της απάντησης για τα πεπτίδια BMLF1.A2, και EBNA.A24 παρουσιάζονται στον πίνακα 23. Δύο ασθενείς (P#8 και P#12) (ποσοστό 10%) εμφάνισαν απάντηση έναντι ενός εκ των ιικών πεπτιδίων που εξετάστηκαν σε συχνότητα 19-45 $x10^{-7}$ CD8 Τ κύτταρα. Αντίστοιχα σε 1 από τους 5 υγιείς (ποσοστό 20%) ανιχνεύτηκε απάντηση έναντι ενός εκ των ιικών πεπτιδίων που εξετάστηκαν σε συχνότητα 27 $x10^{-7}$ CD8 Τ κύτταρα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην συχνότητα της απάντησης μεταξύ υγιών και ασθενών, ούτε συσχέτιση της απάντησης σε ιικά πεπτίδια με την απάντηση σε πεπτίδια έναντι του όγκου.

Στα δείγματα TILs εξετάστηκε η απάντηση έναντι ιικών πεπτιδίων και ανιχνεύθηκε CD8 Τ κυτταρική απάντηση έναντι του BMLF1.A2 πεπτιδίου στον ασθενή P#8 σε συχνότητα 2.1 $x10^{-7}$ των CD8 κυττάρων (**Πίνακας 24**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 23: Συχνότητα των ειδικών CTLs έναντι ιικών πεπτιδίων σε ασθενείς κατά την διάγνωση και σε υγιείς δότες

Αριθμός ασθενούς	Αριθμός CD8-κυττάρων που εξετάστηκαν ($x10^6$)	Αριθμός MLPCs που εξετάστηκαν	BMLF1.A2		EBNA.A24	
			Θετικές MLPCs	f^4	Θετικές MLPCs	f^4
P#1	0.1	8	0	<70	0	<70
P#4	0.7	24			0	<14
P#5	0.1	9	0	<80	0	<80
P#6	0.2	7	0	<40		
P#7	0.2	10			0	<55
P#8	0.5	22	22	45		
P#9	0.1	8	0	<70		
P#10	0.4	14	0	<27		
P#11	0.1	6	0	<83		
P#12	0.3	12			5	19
P#14	0.5	17			0	<21
P#17	0.3	17			0	<32
P#19	0.3	10	0	<41		
P#20	0.5	20	0	<21		

Στους ασθενείς #2, #3, #13, #15, #16, #18 δεν εξετάστηκε CD8 απάντηση έναντι των ιικών αντιγόνων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 23 ***συνέχεια*****.**

Αριθμός δότη	Αριθμός CD8-κυττάρων που εξετάστηκαν (x10^6)	Αριθμός MLPCs που εξετάστηκαν	BMLF1.A2		EBNA.A24	
			Θετικές MLPCs	f^4	Θετικές MLPCs	f^4
N#1	1	24	24	27		
N#2	0.5	7	0	<22		
N#3	0.5	19	0	<20		
N#4	0.07	5	0	<14.2	0	<14.2
N#5	0.4	15			0	<25

ΠΙΝΑΚΑΣ 24 Συχνότητα των ειδικών CTLs έναντι ιικών πεπτιδίων σε TILs ασθενών

Αριθμός δότη	Αριθμός CD8-κυττάρων που εξετάστηκαν (x10^6)	Αριθμός MLPCs που εξετάστηκαν	BMLF1.A2		EBNA.A24	
			Θετικές MLPCs	f^4	Θετικές MLPCs	f^4
P#7	0.7	5			0	<125
P#8	0.5	25	10	2.1		

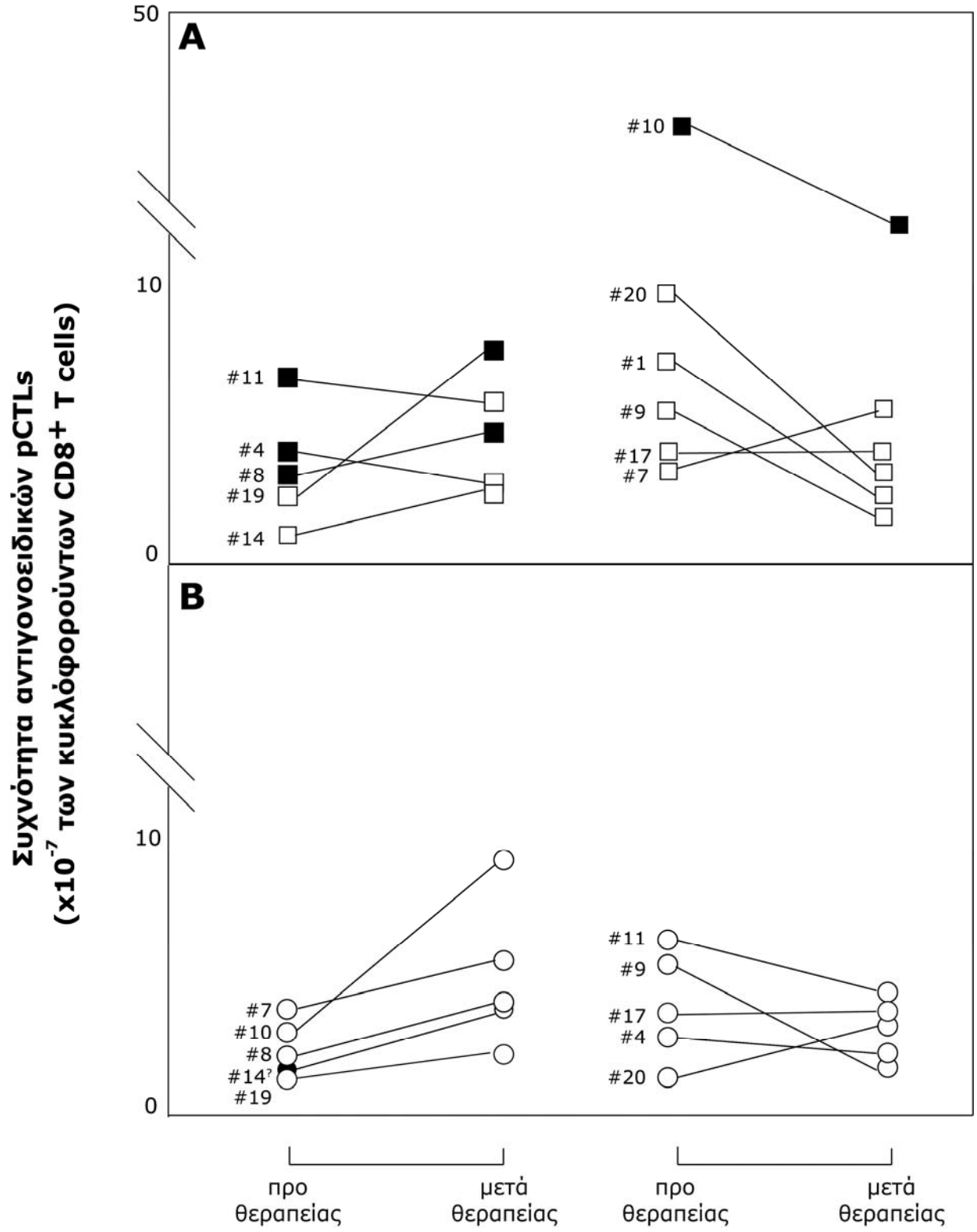
4.3 Επίδραση της θεραπείας στην συχνότητα ανίχνευσης ειδικών pCTLs

Σε 4 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και σε 7 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο, προσδιορίστηκε η συχνότητα ανίχνευσης ειδικών CTLs κατά την διάγνωση της νόσου, και επαναπροσδιορίστηκε έπειτα από θεραπεία. Παρατηρήθηκαν μικρές μεταβολές στην συχνότητα ανίχνευσης ειδικών pCTLs, χωρίς να παρουσιάζουν κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά ως προς την συχνότητα, ανάμεσα στους ασθενείς με NSCLC και SCLC πριν και μετά την θεραπεία. Ωστόσο, αξιοσημείωτη ήταν η περίπτωση του ασθενούς P#19 με SCLC όπου η συχνότητα ανίχνευσης αντι-hTERT pCTLs μετά από θεραπεία αυξήθηκε κατά 3 φορές. (**Εικόνα 35**).

4.4 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CD8 T- γραμμών

Από το σύνολο των μικροκαλλιεργειών που ελέχθησαν, 7 από τους 13 ασθενείς εμφάνισαν ειδικά pCTLs έναντι του πεπτιδίου hTERT.A2, και 2 από τους 8 έναντι πεπτιδίου hTERT.A24. Από αυτούς απομονώθηκαν 15 CD8 γραμμές, οι οποίες καλλιεργήθηκαν περεταίρω για την προσπάθεια απομόνωσης Τ κυτταρικών κλώνων. Όσον αφορά τους υγιείς, 3 CD8 Τ γραμμές απομονώθηκαν στην διαδικασία του MLPC, στις οποίες έγινε επανακαλλιέργεια και προσπάθεια απομόνωσης κλώνου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 35: Συχνότητα ανίχνευσης αντιγονοειδικών pCTLs σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα πριν και μετά την θεραπεία

A: Η συχνότητα των pCTLs (x10^{-7} CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος) ειδικών για τα πεπτίδια της τελομεράσης (■) και **B:** ειδικών pCTLs για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης (●) που εξετάστηκαν σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα πριν και μετά την θεραπεία. Οι συχνότητες κατά τις οποίες δεν εντοπίστηκαν αντιγονοειδικοί pCTLs συμβολίζονται με (□) και (○). NSCLC ασθενείς: 1, 4 και 7 – 11, SCLC ασθενείς: 14, 17, 19 και 20. 8-11: υποβλήθηκαν σε χειρουργείο, 14, 17, 20: έλαβαν χημειοθεραπεία, 1 και 19: έλαβαν χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, 4 και 7: ασθενείς με NSCLC, υποβλήθηκαν σε χειρουργείο και έλαβαν χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Οι γραμμές επιλέχθηκαν με βάση το ποσοστό του θετικού για το πολυμερές πληθυσμού στην καλλιέργεια και την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται έπειτα από ειδική διέγερση. Οι γραμμές από τους υγιείς και τους ασθενείς επανακαλλιεργήθηκαν για τουλάχιστον μία εβδομάδα και χαρακτηρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση δεικτών επιφανείας που χαρακτηρίζουν το στάδιο διαφοροποίησής τους. Οι CD8 T γραμμές χαρακτηρίστηκαν ως προς την έκφραση των δεικτών επιφανείας CD45RO, CCR7, CD57 και CD28. Έπειτα από ειδική διέγερση, 14 από τις 15 CD8 T- κυτταρικές γραμμές των ασθενών χαρακτηρίστηκαν ως $CD8^+$ $CD45RO^+$ $CCR7^-$ $CD28^+$ $CD57^-$, φαινότυπος που αντιπροσωπεύει τα δραστικά μνημονικά κύτταρα, ενώ όλες οι CD8 γραμμές των υγιών είχαν φαινότυπο κεντρικών κυττάρων μνήμης ($CD8^+$ $CD45RO^+$ $CCR7^-$ $CD28^-$ $CD57^-$ κύτταρα) (**Πίνακας 25**).

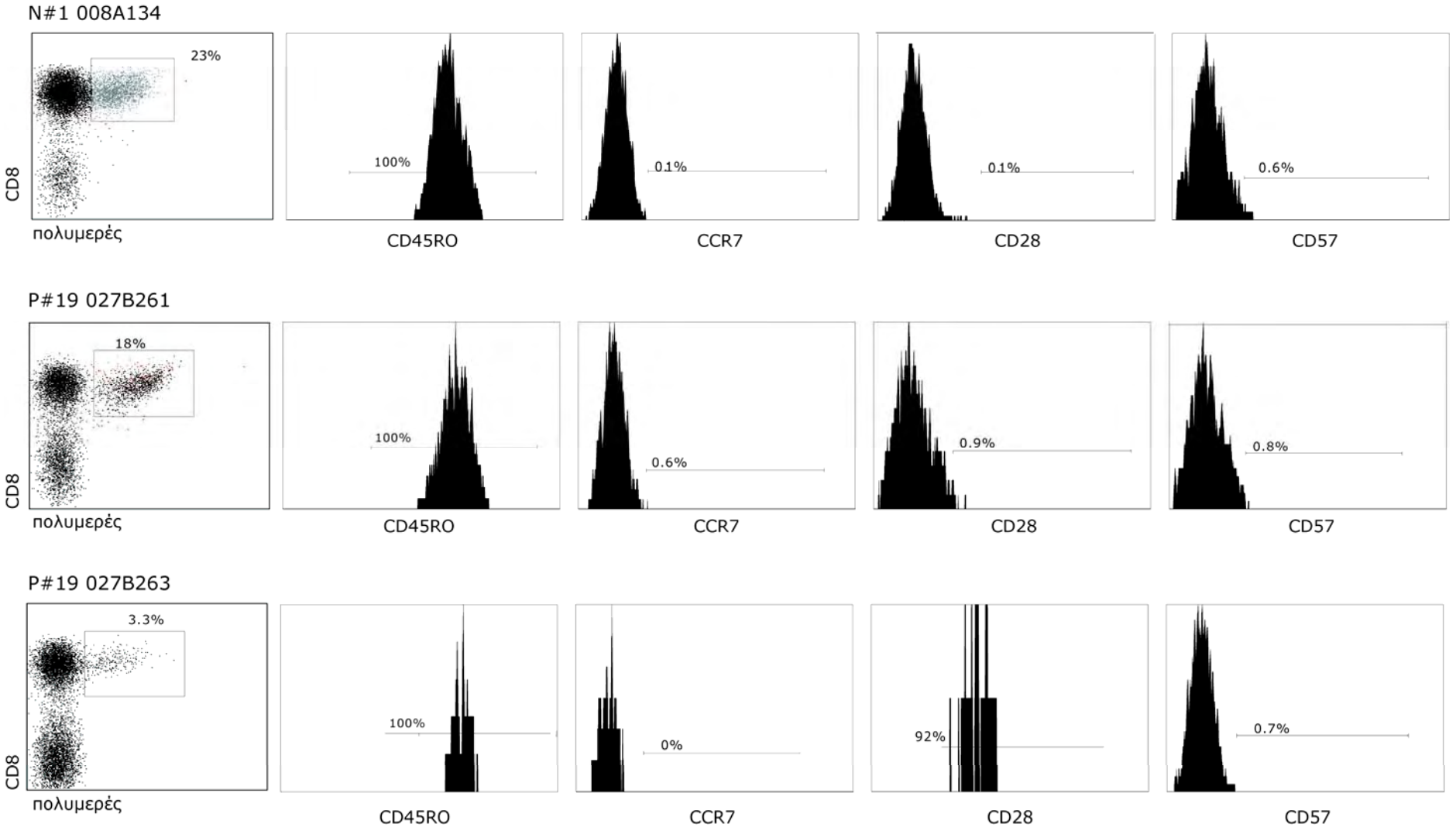
ΠΙΝΑΚΑΣ 25: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά CD8 γραμμών

Δείγμα	CD8 T-κυτταρικές γραμμές	Πεπτίδιο	CD45RO	CCR7	CD28	CD57
P#5	020A031	hTERT.A2	+	-	+	-
P#5	020A106	hTERT.A2	+	-	+	-
P#8	032B067	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A006	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A023	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A057	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A068	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A073	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A080	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A084	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A085	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A096	hTERT.A2	+	-	+	-
P#10	033A109	hTERT.A2	+	-	+	-
P#19	027B261	hTERT.A2	+	-	-	-
P#19	027B263	hTERT.A2	+	-	+	-
N#1	008A134	hTERT.A2	+	-	-	-
N#3	028B160	hTERT.A2	+	-	-	-
N#5	030A325	hTERT.A24	+	-	-	-

Ιδια χαρακτηριστικά με αυτά που παρατηρήθηκαν στις CD8 T- κυτταρικές γραμμές των υγιών έφερε η CD8 γραμμή ενός μόνο ασθενούς P#19 (P#19 027B261), στην οποία δεν παρατηρήθηκε έκφραση του CD28 έπειτα από ενεργοποίηση με το ειδικό πεπτίδιο (**Εικόνα 36**).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 36: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός με κυτταρομετρία ροής μιας CD8 γραμμής υγιούς δότη (N#1 008134) και 2 CD8 γραμμών του ασθενούς P#19 (027B261 και 027B263), ως προς τη χρώση με το ειδικό πολυμερές και την έκφραση δεικτών επιφανείας

4.5 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CD8 κλώνων

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό, οι CD8 κλώνοι απομονώθηκαν και επαναδιεγέρθηκαν με το ειδικό πεπτίδιο. Ωστόσο, δεν ήταν εφικτό να εξεταστούν οι δείκτες επιφανείας σε όλους τους κλώνους λόγω του χαμηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού έπειτα από συνεχόμενους κύκλους ενεργοποίησης. Από τις πολλαπλές προσπάθειες καλλιέργειας που έγιναν για κάθε κλώνο παρατηρήθηκε ότι διάφοροι παράγοντες επηρέασαν την ανάπτυξη των CTLs *in vitro*. Στον πίνακα 26 αναφέρονται επιλεκτικά κάποια παραδείγματα καλλιέργειας κλώνων ασθενών και υγειών δοτών. Για κάθε CTL αναφέρονται το σύστημα καλλιέργειας (tu: καρκινικά κύτταρα, EBV: EBV μετασχηματισμένα Β κύτταρα, P: PBMC άσχετου HLA) και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (x). Κλώνοι που προήλθαν από την ίδια μικροκαλλιέργεια, π.χ. P#5 020A084/1 και /13, παρουσίασαν διαφορετική δυναμική ανάπτυξης στην καλλιέργεια, όπως απεικονίζεται από το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Διαπιστώθηκε πως, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η επανακαλλιέργεια των CTL υποβαθμίζει την ποιότητα των κυττάρων καθώς η συνεχόμενη επαφή τους με το αντιγόνο είχε σαν αποτέλεσμα χαμηλό πολλαπλασιασμό αλλά και, όπως φάνηκε κυτταρομετρικά, και μικρότερη ένταση φθορισμού μετά από χρώση με το ειδικό πολυμερές. Επίσης παρατηρήθηκε πως η προέλευση του ορού είχε ιδιαίτερη σημασία για την ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς αλλαγή του ορού είχε σε κάποιες περιπτώσεις καταστροφικά αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό των CTLs. Υπήρχαν, βέβαια, κλώνοι που ανεξαρτήτως συστήματος καλλιέργειας και ορού αναπτύσσονταν σε ικανοποιητικό βαθμό, όπως οι κλώνοι P#19 027B263/20, /81, /82 και /83. Εκτός από τις συνθήκες καλλιέργειας βιολογικοί παράγοντες μπορεί να επηρέασαν την ικανότητα των CTL να πολλαπλασιάζονται, όπως τα φαινόμενα της γήρανσης λόγω αντιγραφής και της ανοσογήρανσης. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 11 CD8 γραμμές ασθενών και 1 γραμμή υγιούς δότη για την απομόνωση κλώνων. Απομονώθηκαν 3 κλώνοι από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 2 κλώνοι από υγιείς δότες, οι οποίοι αναπτύσσονταν επαρκώς και συμπεριλήφθησαν σε περαιτέρω αναλύσεις, όπως περιγράφεται παρακάτω (**Πίνακας 26**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 26: Πολλαπλασιασμός ειδικών για το πεπτίδιο της τελομεράσης (hTERT.A2) CD8 Τ-κλώνων μετά από εδικές διεγέρσεις

Ασθενής	CD8 γραμμή	CD8 κλώνος	1η Εβδομάδα Ενεργοποίησης		2η Εβδομάδα Ενεργοποίησης	
			Σύστημα Αντιγονο-παρουσίασης (APC/ τροφοί)	Ρυθμός πολλαπλασια-σμού (x φορές)	Σύστημα Αντιγονο-παρουσίασης (APC/ τροφοί)	Ρυθμός πολλαπλασια-σμού (x φορές)
P# 5	020A084	/1	tu/EBV	6.4	tu/EBV	0.0
P# 19	027B261	/13	EBV/P	9.0	tu/EBV	0.7
P# 19	027B261	/35	tu/EBV	1.9	tu/EBV	0.7
P# 19	027B261	/61	EBV/P	1.6	tu/EBV	0.0

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΙΝΑΚΑΣ 26: (*συνέχεια)*

Ασθενής	CD8 γραμμή	CD8 κλώνος	1η Εβδομάδα Ενεργοποίησης		2η Εβδομάδα Ενεργοποίησης	
			Σύστημα Αντιγονο-παρουσίασης (APC/ τροφοί)	Ρυθμός πολλαπλασια-σμου (x φορές)	Σύστημα Αντιγονο-παρουσίασης (APC/ τροφοί)	Ρυθμός πολλαπλασια-σμου (x φορές)
P# 19	027B263	/26	EBV/P	2.0	tu/EBV	2.7
P# 19	027B263	/32	EBV/P	1.1	tu/EBV	1.3
N# 1	008A134	/80	tu/EBV	3.2	EBV/P	0.5
N# 1	008A134	/81	tu/EBV	2.9	tu/EBV	1.0
N# 1	008A134	/82	tu/EBV	3.0	tu/EBV	0.0
N# 1	008A134	/83	tu/EBV	3.4	tu/EBV	0.0
N# 1	008A134	/84	EBV/P	0.2	tu/EBV	0.0
N# 1	008A134	/87	tu/EBV	0.5	tu/EBV	0.0
N# 1	008A134	/89	tu/EBV	0.5	tu/EBV	0.0
N# 1	008A134	/90	EBV/P	0.8	tu/EBV	0.0

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CD8 Τ-κυτταρικών κλώνων απαιτήθηκαν 600,000 κύτταρα. Εν τούτοις, παρά τις συνεχόμενες διεγέρσεις με διαφορετικά συστήματα αντιγονοπαρουσίασης (tu: καρκινικά κύτταρα, ίδιου HLA, ως αντιγονοπαρουσιαστικά, EBV: EBV μετασχηματισμένα κύτταρα ή P: PBMC άσχετου HLA, ως κύτταρα τροφοί) δεν κατάφεραν όλοι οι κλώνοι να αναπτυχθούν.

4.5.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ CD8 Τ ΚΛΩΝΩΝ

Η φαινοτυπική ανάλυση ως προς τους δείκτες επιφανείας των CD8 Τ-κυτταρικών κλώνων πραγματοποιήθηκε σε 3 κλώνους ασθενών και σε 2 κλώνους υγιών. Όλοι οι κλώνοι των υγιών και 2 από τους τρεις κλώνους των ασθενών χαρακτηρίστηκαν ως $CD8^+$ $CD45RO^+$ $CCR7^-$ $CD28^+$ $CD57^-$ (δραστικά μνημονικά κύτταρα), ενώ ένας κλώνος ασθενούς (P#5) φέρει τον φαινότυπο ($CD8^+$ $CD45RO^+$ $CCR7^+$ $CD28^+$ $CD57^-$) (τελικά διαφοροποιημένα δραστικά κύτταρα) (**Πίνακας 27**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 27: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κλώνων

Δείγμα	CD8 κλώνοι	Πεπτίδιο	CD45RO	CCR7	CD28	CD57
P#5	020A084	hTERT.A2	+	+	+	-
P#19	027B263/35	hTERT.A2	+	-	+	-
P#19	027B261/32	hTERT.A2	+	-	+	-
N#1	008A134/80	hTERT.A2	+	-	+	-
N#1	008A134/81	hTERT.A2	+	-	+	-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

4.5.2 ΑΝΑΛΥΣΗ TCR

Η ανάλυση της αλληλουχίας του TcR υποδοχέα των CTLs πραγματοποιήθηκε, αρχικά, με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση του IOTest Beta Mark της Beckman Coulter (**Εικόνα 37**). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε για δύο κλώνους του ασθενούς P#19 (P#19 027B261 και 027B263) και 1 κλώνο υγειούς δότη (N#21 008A134). Στον κλώνο του υγιούς δότη δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή συμπεράσματος, καθώς η τεχνική αυτή καλύπτει το 70% του ρεπερτορίου των αλυσίδων Vβ του TcR (βλέπε παράγραφο 3.13.3) (**Πίνακας 28**). Παρόλα τα μειονεκτήματα της μεθόδου, η τεχνική αυτή αποκάλυψε σημαντικές πληροφορίες για τα CTLs που προέρχονται από τα ίδια άτομα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 28 τα CTLs του ασθενή P#19 αν και έχουν την ίδια ειδικότητα, φέρουν διαφορετική Vβ αλυσίδα του TCR, συνεπώς δεν έχουν προέλθει από το ίδιο αρχικό κύτταρο, πρόκειται δηλαδή για διαφορετικούς κλώνους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 28: Προσδιορισμός της Vβ αλυσίδας του TcR με τη χρήση του IOTest Beta Mark στα CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς

CTL	Ειδικότητα	Vβ*
P#19 027B261/61	hTERT.A2	Vβ 12
P#19 027B263/23	hTERT.A2	Vβ 6

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής επαληθεύθηκαν με PCR, με τη χρήση επιλεγμένων εκκινητών που καλύπτουν το 100% του ρεπερτορίου των TcR (**Πίνακας 29**).

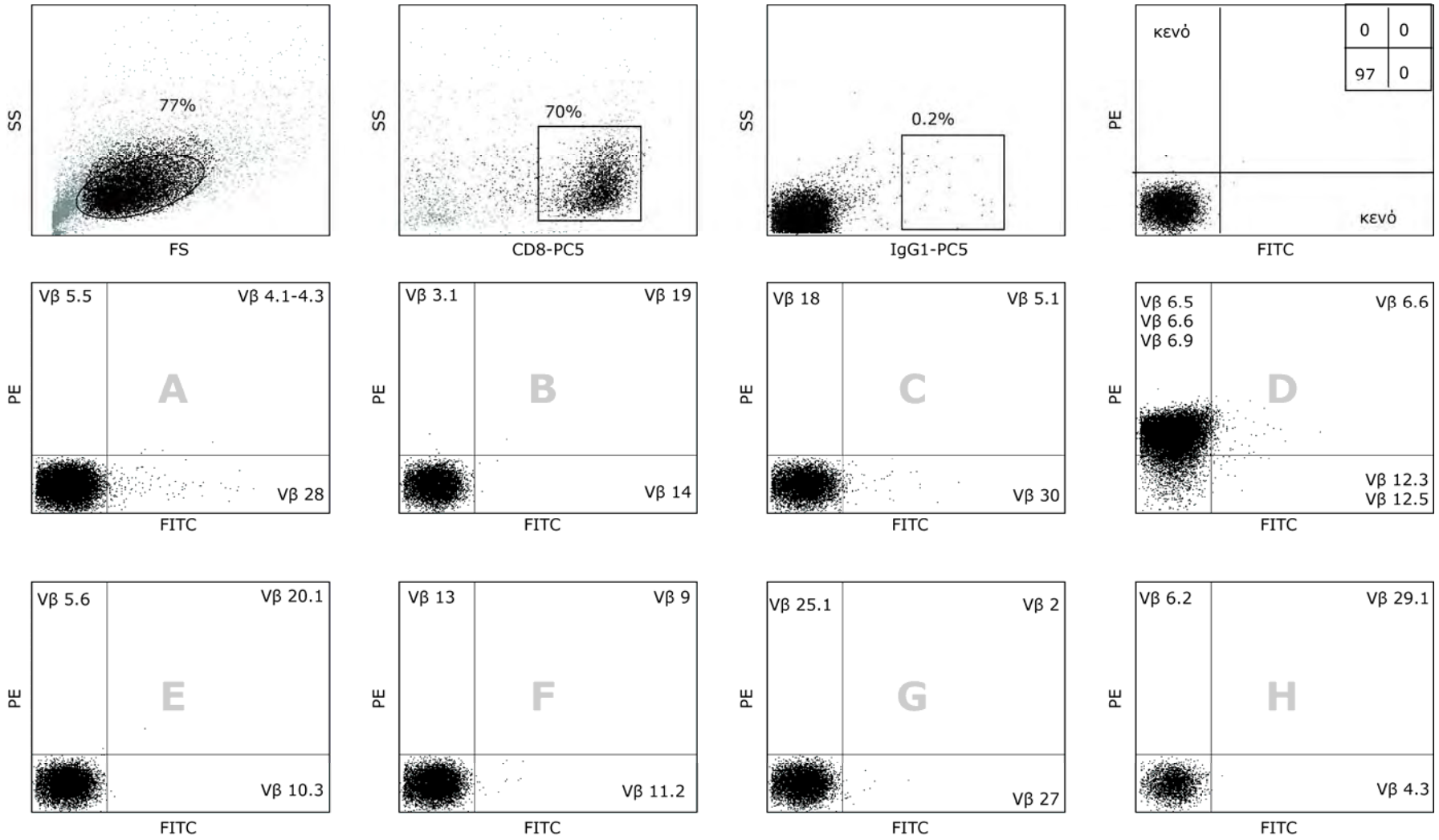
ΠΙΝΑΚΑΣ 29: Προσδιορισμός της Vβ αλυσίδας του TcR με PCR.

CTL	Ειδικότητα	TCR	Vβ	Jβ	Cβ
P#19 027B261/61	hTERT.A2	Vβ12	Vβ12.3 ή Vβ12.4	Jβ1.1	Cβ1
P#19 027B263/23		Vβ6	Vβ6-5	Jβ2.2	Cβ2
		Vβ19	Vβ19-1	Jβ2-5	

Μετά την πλήρη αλληλούχιση του TcR των δύο κλώνων του ασθενή P#19 (**Εικόνα 38**, σελίδα 118) προέκυψε πως πρόκειται για δύο διαφορετικούς κλωνοτύπους, ο ένας εκ των οποίων εμφανίζει δύο μετάγραφα που κωδικοποιούν για τη β αλυσίδα του TcR (**Πίνακας 29**). Μετά από σύγκριση με βάσεις δεδομένων προέκυψε πως το μετάγραφο με Vβ19-1 καθίσταται μη λειτουργικό περιλαμβάνοντας μία αλληλουχία τέλους που σταματά τη μετάφρασή του στη CDR3 περιοχή, επομένως ο κλώνος P#19 027B263/23 εμφανίζει TcR με Vβ6-5, Jβ2.2 και Cβ2 αλληλουχία.

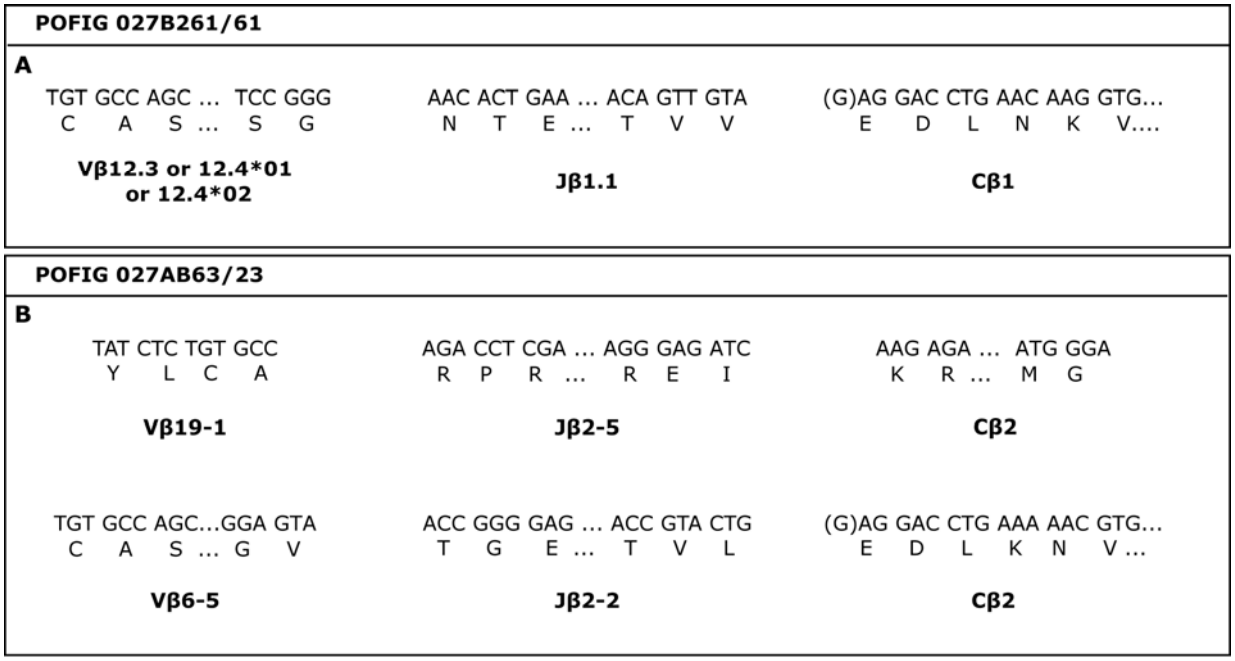
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 37: Έλεγχος της Vβ αλυσίδας του TCR με τη χρήση του IOTest Beta Mark της Beckman Coulter για τον P#19.

Στα δύο πρώτα στικτογράμματα φαίνεται η επιλογή των ζώντων και των $CD8^+$ κυττάρων. Αποκλείστηκε ο μη ειδικός φθορισμός των κυττάρων και η μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων (3ο και 4ο στικτόγραμμα). Ο κλώνος P#027B261 αποκαλύφθηκε πως έχει την Vβ 6 αλυσίδα, καθώς ήταν θετικός μόνο στον D συνδιασμό και φθόριζε στο FITC



ΕΙΚΟΝΑ 38: Οι αλληλουχίες των V-D-J-C περιοχών της β αλύσου του TCR των CTL ασθενών. Στην πρώτη σειρά αναγράφεται η αλληλουχία των βάσεων DNA, ακολουθεί η αμινοξική αλληλουχία της κάθε περιοχής.

4.6 Λειτουργικός χαρακτηρισμός των CD8 κλώνων

Στα πλαίσια του λειτουργικού χαρακτηρισμού διερευνήθηκε εάν οι CD8 Τ-κυτταρικοί κλώνοι των ασθενών διαφέρουν από τους κλώνους των υγιών δοτών ως προς την λυτική τους ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών.

4.6.1 Προσδιορισμος κυτταροκινων

Για την μελέτη της ικανότητας των CTLs να παράγουν κυτταροκίνες έπειτα από ειδική διέγερση, χρησιμοποιήθηκε ενδοκυττάρια χρώση για κυτταροκίνες και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (**Εικόνα 39**, σελίδα 118). Προσπάθεια χαρακτηρισμού επιχειρήθηκε σε όλους τους κλώνους, ωστόσο ενδοκυττάρια χρώση πραγματοποιήθηκε σε έναν μόνο κλώνο ασθενούς, ο οποίος πολλαπλασιάστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό *in vitro*, ώστε να αποκτηθεί επαρκής αριθμός κυττάρων για τη χρήση τους σε λειτουργικές δοκιμασίες. Ο εν λόγω κλώνος εξετάστηκε ως προς την ικανότητα έκκρισης IL-2, IL-4, IFN-γ και IL-10 μετά από ειδική και μη ειδική διέγερση με EBV Β κυττάρων ή/και καρκινικά κύτταρα.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε διαφορά του ποσοστού έκκρισης κυτταροκινών μετά από ειδική και μη ειδική διέγερση, όπως φαίνεται στην εικόνα 39. Ο κλώνος ήταν ικανός να παράγει IL-2 και IL-4 μετά από ειδική διέγερση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Αντίθετα, η παραγωγή IFN-γ δεν ήταν πάνω από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (ποσοστό 0.8 -1.8%) ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παραγωγή IL-10. Το σύστημα αντιγονοπαρουσίασης δεν φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή κυτταροκινών από το CTL, καθώς ανιχνεύθηκε το ίδιο πρότυπο παραγωγής κυτταροκινών ανεξαρτήτως τύπου APC.

Ενώ τα αποτελέσματα της ενδοκυττάριας χρώσης απέδειξαν την έκκριση ή μη της κάθε κυτταροκίνης, η μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία είναι δυνατόν να αποκαλύψει ποσοτικές διαφορές ανάμεσα στα CTLs ασθενών και υγιών δοτών. Διερευνήθηκε η έκκριση IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ και TNF-α μετά από ειδική διέγερση σε 1 κλώνο υγιούς (N#21) και σε 2 κλώνους ασθενούς (P#19). Όλοι οι κλώνοι ήταν ικανοί να εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες IL-2, IL-4 και IL-5, χωρίς όμως να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα CTL των δύο ομάδων. Οι κυτταροκίνες IFN-γ, TNF-α και IL-10 ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις της τάξης των 4-7 pg/mL, ενώ έκκριση IL-10 παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγμα σε ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση που κυμαινόταν από 2 – 8 pg/ml. Τα CTs τα οποία επωάστηκαν με EBV B κύτταρα χωρίς την παρουσία πεπτιδίου δεν εμφάνισαν έκκριση κυτταροκινών (**Εικόνα 40**, σελίδα 118).

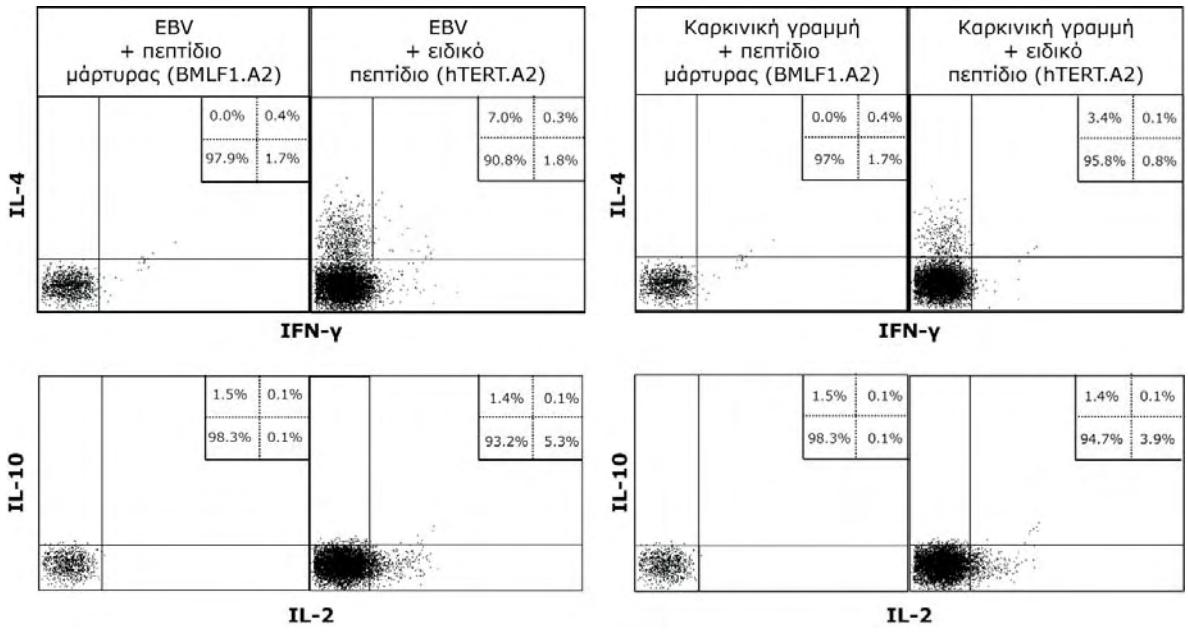
4.6.2 Λυτικη ικανοτητα

Η λυτική ικανότητα των CTLs που απομονώθηκαν αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητά τους να σκοτώνουν κύτταρα στόχους που παρουσίαζαν το πεπτίδιο που αναγνωρίζουν. Ένας CD8 Τ-κυτταρικός κλώνος υγιούς δότη και δύο CD8 κλώνοι ασθενούς εξετάστηκαν ως προς την λυτική τους ικανότητα. Όλοι οι κλώνοι ήταν ικανοί να αναγνωρίσουν και να λύσουν κύτταρα στόχους κατάλληλου HLA (καρκινικά κύτταρα και EBV B κύτταρα) τα οποία παρουσίαζαν πεπτίδια της hTERT έπειτα από ειδική διέγερση (**Εικόνα 41Α**, σελίδα 119). Ωστόσο, οι κλώνοι που προήλθαν από ασθενείς εμφάνισαν σημαντικά μειωμένη λυτική ικανότητα συγκρινόμενοι με τον κλώνο του υγιούς δότη ($p=0.06$) (**Εικόνα 41Β**, σελίδα 119). Τόσο οι κλώνοι των ασθενών και των υγειών δοτών δεν ήταν ικανοί να αναγνωρίσουν και να σκοτώσουν καρκινικά κύτταρα τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη hTERT χωρίς την προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου.

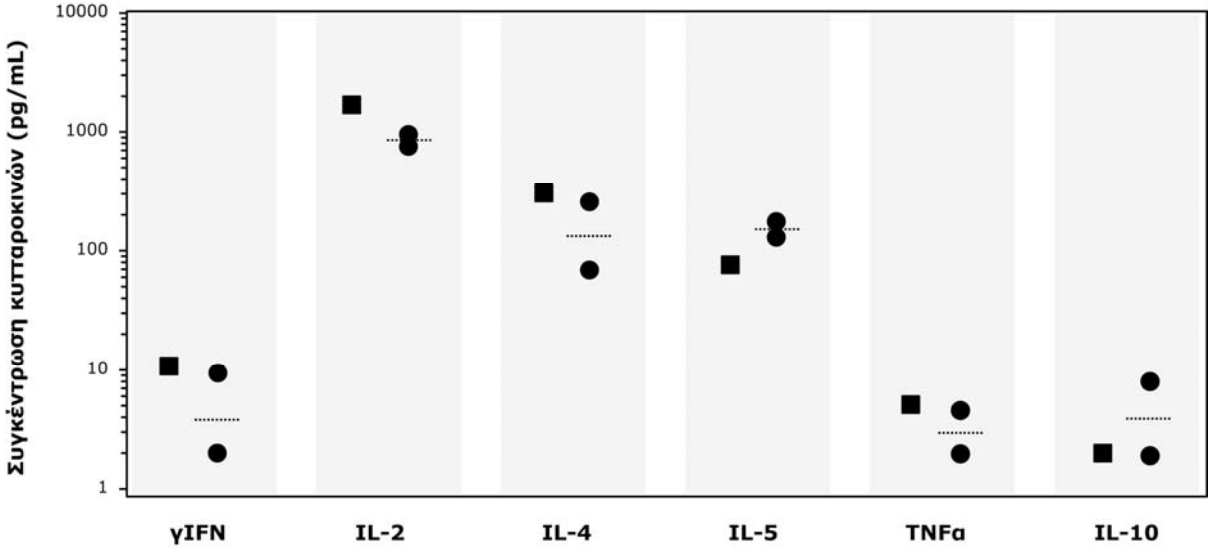
4.6.3 Συγγενεια του TCR

Η συγγένεια του TCR για το ειδικό πεπτίδιο καθορίστηκε στους δύο κλώνους που περιγράφηκαν πιο πάνω. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου που απαιτούνταν για να επιτευχθεί το 50% της μέγιστης λύσης ήταν παρόμοια και για τους 2 κλώνους και κυμαίνονταν μεταξύ 3 και 10 nM. Όπως προέκυψε, τα CTLs που εξετάστηκαν έχουν TCR με παρόμοια συγγένεια για το ειδικό πεπτίδιο (**Εικόνα 41Γ**, σελίδα 119).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



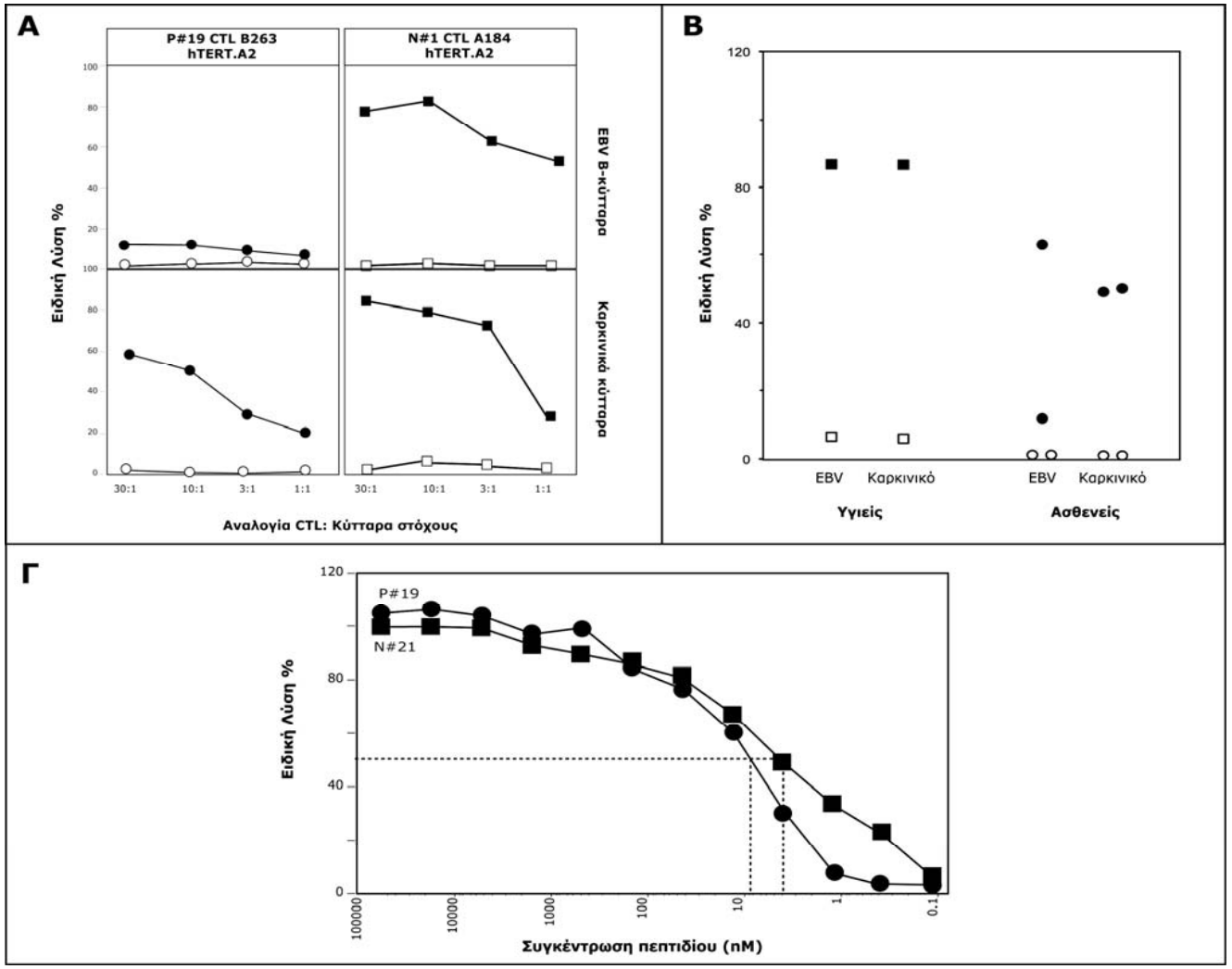
ΕΙΚΟΝΑ 39: Έκκριση κυτταροκινών από απομονωμένο κλώνο ασθενούς P#19, έπειτα απο ειδική και μη ειδική διέγερση με EBV κύτταρα και καρκινικά.



ΕΙΚΟΝΑ 40: Παραγωγή κυτταροκινών από αντιγονοειδικά CTLs που απομονώθηκαν από υγιή δότη (■) και ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (●) έπειτα από ειδική διέγερση. Οι διακεκκομένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή της συγκέντρωσης για κάθε ομάδα (pg/mL).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



ΕΙΚΟΝΑ 41: Λυτική ικανότητα των κλώνων

Α. Διαγράμματα ειδικής λύσης σε έναν κλώνο υγιούς δότη (N#21) και σε έναν δότη ασθενούς (P#19), χρησιμοποιώντας EBV Β μετασχηματισμένα κύτταρα ως κύτταρα στόχους (πάνω σειρά) και καρκινικά κύτταρα (κάτω σειρά). Τα λευκά σχήματα (○ και □) αντιπροσωπεύουν τα ποσοστά λύσης χωρίς την προσθήκη πεπτιδίου στον ασθενή και στον υγιή, ενώ τα μαύρα σχήματα (● και ■) τα ποσοστά λύσης μετά από προσθήκη πεπτιδίου σε συγκέντρωση 10ng/ml **Β.** Λυτική ικανότητα των CTL που απομονώθηκαν από δότη (■) και ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα (●). Απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης με τη χρήση EBV Β-κυττάρων και καρκινικών κυττάρων σαν κύτταρα στόχους. Με λευκό φόντο απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης χωρίς την προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου, ενώ με μαύρο φόντο μετά από προσθήκη πεπτιδίου σε συγκέντρωση 10ng/ml. **Γ.** Συγγένεια του TCR για το ειδικό πεπτίδιο σε δύο κλώνους υγειών (■) και ενός ασθενούς (●). Απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης με τη χρήση EBV Β-κυττάρων σαν κύτταρα στόχους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

5.1 Συχνότητα αντιγονοειδικών CTLs

Η παρούσα ερευνητική προσπάθεια εκπονήθηκε με στόχο τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό ειδικών $CD8^+$ Τ-κυτταρολυτικών κλώνων, που κυκλοφορούν στο αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ή ανιχνεύονται στο περιβάλλον των αντίστοιχων όγκων, έναντι πεπτιδίων δύο συγκεκριμένων, ευρέως εκφραζομένων αντιγόνων των όγκων, της σαρβιβίνης (και του υποτύπου της 2B) και της hTERT. Καθώς η συχνότητα ανίχνευσης των κυττάρων αυτών θεωρείτο ιδιαίτερα χαμηλή [146], χρησιμοποιήθηκε μία τεχνική πιθανολογικής προσέγγισης, η οποία στηρίχτηκε σε *in vitro* καλλιέργειες (MLPC), σε συνδυασμό με την χρήση HLA πολυμερών ως μέθοδο ανίχνευσης. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού και λειτουργικού χαρακτηρισμού των αντιγονοειδικών pCTLs που εντοπίστηκαν στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα CTLs που ανιχνεύτηκαν στο αίμα των υγιών ατόμων ίδιας ηλικιακής ομάδας. Επιπλέον, αντι-ιικά πεπτίδια μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν, παράλληλα με τα υπό έλεγχο πεπτίδια, αφ' ενός για να εξακριβωθεί ότι με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο εντοπισμός ειδικών CD8 κυττάρων, εφόσον η συχνότητα ανίχνευσης των τελευταίων είναι υψηλή, αφ' ετέρου για να διερευνηθεί εάν το αντιγονικό φορτίο του όγκου επηρεάζει την ικανότητα απάντησης των pCTLs έναντι άλλων μη καρκινικών ερεθισμάτων, δηλαδή έναντι ιικών πεπτιδίων [159]. Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση της θεραπείας της νόσου στην συχνότητα ανίχνευσης pCTLs, καθώς η τελευταία μελετήθηκε κατά τη διάγνωση της νόσου και έπειτα από θεραπεία.

Συχνότητα αντι-survivin pCTLs σε ασθενείς με καρκίνο

Η πρωτεΐνη σαρβιβίνη συγκαταλέγεται μεταξύ των γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση όγκων στο ανθρώπινο γονιδίωμα και θεωρείται εξαιρετικής σημασίας για τη θεραπεία του καρκίνου [94]. Παρομοίως, η σαρβιβίνη-2B, η μόνη ισομορφή που παράγεται κατά την ογκογένεση και η οποία μελετήθηκε επισταμένα, επίσης εκφράζεται ευρύτατα σε όγκους. Μέχρι στιγμής, έχουν γίνει αρκετές αναφορές αποδεικνύοντας ότι η σαρβιβίνη, που εκφράζεται σε καρκινικούς ιστούς, προκαλεί ειδική ανοσιακή απάντηση σε ασθενείς με καρκίνο, ενώ παράλληλα, αντισώματα σαρβιβίνης ανιχνεύτηκαν σε ορούς ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου [160, 161]. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί HLA-A2 περιορισμένες ειδικές CTL απαντήσεις έναντι πεπτιδίου της σαρβιβίνης σε ασθενείς με μελάνωμα και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία [100, 162]. Μετά την διαπίστωση της δράσης ειδικών CTLs έναντι των τροποποιημένων αλλά και φυσικών πεπτιδίων των πρωτεϊνών αυτών που παρουσιάζουν λυτική δράση κατά των καρκινικών κυττάρων [100, 101, 106], οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε αρκετά πρωτόκολλα εμβολιασμού. Ως τώρα, ο εμβολιασμός των καρκινοπαθών διεξαγόταν με HLA-A2 περιορισμένα πεπτίδια της σαρβιβίνης ($survivin_{95\text{-}104}$, LTLGEFLKL, το ίδιο πεπτίδιο που εξετάστηκε και στην παρούσα μελέτη), και το τροποποιημένο πεπτίδιο της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

σαρβιβίνης (survivin$_{96-104}$, LKLGEFLKL) [163], καθώς επίσης το HLA-A24 περιορισμένο πεπτίδιο της σαρβιβίνης-2B (survivin2B$_{80-88}$, AYACNTSTL, που χρησιμοποιήθηκε επίσης σε αυτή την εργασία) [100]. Με την εξαίρεση, ωστόσο, των αντι- Melan-A απαντήσεων, η συχνότητα αντιγονοειδικών CTL είναι αρκετά χαμηλή και δεν ανιχνεύται με *ex vivo* σήμανση των λεμφοκυττάρων με τα ειδικά HLA-πολυμερή, θέτοντας έτσι το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης στα ~3 x10^{-4} CD8 Τ-κύτταρα περιφερικού αίματος [164]. Απ' όσο γνωρίζουμε, η μέθοδος αυτή έχει ως τώρα εφαρμοστεί μόνο για τη μέτρηση ειδικών pCTL έναντι των πεπτιδίων MAGE [165, 166] και μόνο σε μία περίπτωση έναντι του πεπτιδίου σαρβιβίνης-2B$_{80–88}$ [101]. Ως εκ τούτου, η ανίχνευσή τους μπορεί να επιτευχθεί μόνο με *in vitro* τεχνικές. Σε ένα ποσοστό ασθενών με καρκίνο, ανιχνεύτηκε απάντηση σε συχνότητα 123 x10^{-4} και 1.5 x10^{-2} CD8 Τ κύτταρα για την σαρβιβίνη και την σαρβιβίνη-2B αντίστοιχα [103, 103]. Εν τούτοις, τα αποτελέσματα με την τεχνική ELISPOT από τον Andersen και τους συνεργάτες του, δεν θα μπορούσαν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, διότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαφορετική. Επιπλέον, στην μελέτη της ομάδας του Idenoue όπου ανιχνεύτηκαν αντι-Surv.A24 απαντήσεις, δεν πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης, ένα γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της συχνότητας, λόγω των ψευδώς θετικών πληθυσμών εξαιτίας της μη ειδικής σύνδεσης [167]. Ωστόσο, στις λίγες περιπτώσεις που μελετήθηκε η συχνότητα ανίχνευσης της σαρβιβίνης σε καρκίνο του πνεύμονα, όπως η ομάδα του Ichiki, παρατηρήθηκε CD8 απάντηση έναντι του πεπτιδίου Surv.A24 στους λεμφαδένες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα σε συχνότητα 0.5-2 x10^{-7} CD8 κύτταρα [101].

Παρά τις όποιες σχολαστικές προσπάθειές μας, προέκυψαν αδιάσειστες αποδείξεις αναφορικά με την απουσία των κυκλοφορούντων ειδικών CTLs έναντι των δύο πεπτιδίων της σαρβιβίνης τόσο όσον αφορά τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα όσο και τα υγιή άτομα που συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη. Αξίζει να τονιστεί ότι σε τέσσερις περιπτώσεις, η ανικανότητα των υποτιθέμενων θετικών πληθυσμών να πολλαπλασιαστούν με περαιτέρω διέγερση, οδήγησε στο να θεωρηθούν αρνητικοί, καθώς οι τελευταίοι χαρακτηρίζονταν κυτταρομετρικά, από χαμηλή ένταση φθορισμού. Αυτή η παρατήρηση ενδεχομένως να σημαίνει ότι θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την κυτταρομετρική ερμηνεία ενός τέτοιου πληθυσμού, ειδικά στην περίπτωση που δεν λαμβάνεται υπόψη η μη-ειδική σύνδεση [100, 167]. Η συχνότητα ανίχνευσης ειδικών CTLs έναντι της Surv.A2 και Surv.A24 στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα υπολογίστηκε μικρότερη από ~3 x10^{-7} CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος και ενδεχομένως, οι κλώνοι αυτοί να ανιχνεύονται σε χαμηλότερη συχνότητα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η απουσία ειδικών CTLs για τα πεπτίδια της σαρβιβίνης και της σαρβιβίνης-2B, δεν οφείλεται στην έλλειψη έκφρασης της σαρβιβίνης, δεδομένου ότι η σαρβιβίνη και η σαρβιβίνη-2B εκφράζεται σε 95.5% των δειγμάτων όγκου (**Πίνακας 21**) [159]. Επιπλέον, η χαμηλή συχνότητα ανίχνευσης της ειδικής CTL απάντησης έναντι της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

σαρβιβίνης, δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην εγγενή δυσκολία της σαρβιβίνης, ως αυτοαντιγόνο, να προκαλέσει ανοσιακή απάντηση, διότι εντοπίστηκε αντι-Surv.A2 CD8 πληθυσμός σε δείγμα φυσιολογικού δότη, μικρότερης ηλικίας (**Εικόνα 30E-30Z**). Στην τελευταία περίπτωση, το σύστημα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο ικανό να ενισχύσει CTLs, όπως περιγράφεται και από άλλες ερευνητικές ομάδες [147], και έπειτα από μία εβδομάδα διέγερσης, ο ειδικός αντι-Surv.A2 πληθυσμός πολλαπλασιάστηκε και μελετήθηκε περαιτέρω, αποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη σπανίων CD8 Τ κυττάρων στην περιφέρεια υγιών ατόμων (τα δεδομένα αυτά δεν ελήφθησαν υπόψη, εφόσον το φυσιολογικό δείγμα δεν ανήκει ηλικιακά στην ομάδα των υγιών δοτών) [168].

Τα ευρήματα αυτά, ενδεχομένως να θέτουν ένα σοβαρό ερώτημα σχετικά με τον στόχο της ανοσοθεραπείας και την επιλογή καταλληλότερων αντιγόνων του καρκίνου του πνεύμονα. Παρά το γεγονός ότι διάφορες δημοσιευμένες μελέτες αναγνώρισαν ότι ο εμβολιασμός με τα παραπάνω πεπτίδια προκάλεσε CTL απαντήσεις οι οποίες διαπιστώθηκαν μέσω τεχνικών ELISPOT, δεν παρατηρήθηκε σημαντική κλινική αποτελεσματικότητα. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην έλλειψη αυτόματων CTL απαντήσεων έναντι των πεπτιδίων αυτών, όπως παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Φυσικά, βάσει των προαναφερόμενων δεν μπορεί να αποκλειστεί η χρήση της σαρβιβίνης και σαρβιβίνης-2B από την ανοσοθεραπεία του καρκίνου, από τη στιγμή που και άλλα HLA τάξης I και II περιορισμένα πεπτίδια αυτών των πρωτεϊνών μπορούν επίσης να προκαλέσουν απαντήσεις Τ-κυττάρων έναντι των όγκων [105]. Με βάση τα αποτελέσματά μας, ωστόσο, η εκτίμηση της αποτελεσματικότητάς τους θα πρέπει να περιλαμβάνει ενδελεχή μέτρηση και αξιολόγηση των αυτόματων ανοσολογικών απαντήσεων.

Συχνότητα αντι-hTERT pCTLs σε ασθενείς με καρκίνο

Παρόλο που η σαρβιβίνη και η τελομεράση είναι «ίδια» αντιγόνα (αυτοαντιγόνα) τα οποία υπερεκφράζονται από καρκινικά κύτταρα, παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ τους ως προς την ικανότητά τους να προκαλέσουν ανιχνεύσιμη CD8 απάντηση. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το ποσοστό ανίχνευσης αντι-hTERT pCTLs σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα είναι περίπου 50% των δειγμάτων, επίπεδο παρόμοιο με εκείνο των υγιών ατόμων. Η συχνότητα ανίχνευσης ειδικών CTLs έναντι των πεπτιδίων hTERT.A2 και hTERT.A24 στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα υπολογίστηκε στα ~9 $x10^{-7}$ CD8 κύτταρα και ~4 $x10^{-7}$ CD8 κύτταρα περιφερικού αίματος αντίστοιχα. Άμεση σύγκριση της συχνότητας των αντιγονοειδικών αυτών κυττάρων με τα αποτελέσματα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία δεν μπορεί να γίνει εύκολα, διότι οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις είναι διαφορετικές. Στις λίγες περιπτώσεις ωστόσο, όπου χρησιμοποιήθηκε παρόμοια τεχνική [169], εντοπίστηκαν, σε μικρότερο αριθμό ασθενών, ειδικά για hTERT.A2 CTLs σε χαμηλή συχνότητα [170]. Διαφαίνεται ότι οι διάφοροι όγκοι μπορούν να επεξεργάζονται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

και να παρουσιάζουν συγκεκριμένα πεπτίδια της hTERT σε σύνδεση με συγκεκριμένα HLA μόρια. Ωστόσο, σε κάποιες μελέτες κυτταρικών σειρών, φάνηκε ότι τα ειδικά CTLs έναντι του πεπτιδίου hTERT.A2$_{ILAKFLHWL}$ δεν μπόρεσαν να αναγνωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα που εξέφραζαν hTERT [135]. Διάφοροι παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για την ανικανότητα των ειδικών CTLs να προκαλέσουν λύση των καρκινικών κυττάρων, ένας από τους οποίους είναι το πρωτεόσωμα [136]. Μια πιθανή εξήγηση λοιπόν, είναι η αναποτελεσματική επεξεργασία και παρουσίαση του hTERT.A2 πεπτιδίου μέσω του πρωτεασώματος ή του *ανοσοπρωτεασώματος*, ή ακόμη πιθανή δυσλειτουργία της πρωτεΐνης TAP (transporter in antigen processing). Πράγματι, η συγκεκριμένη υπόθεση έχει αποδειχθεί, σε διαφορετικό αντιγόνο, σε μια εργασία της Valmori και των συνεργατών της, η οποία έδειξε ότι η αναποτελεσματική διάσπαση του πεπτιδίου MAGE-3$_{271-279}$, που παρουσιάζεται από HLA-A2, οδήγησε σε μειωμένη αναγνώριση κυττάρων στόχων (HLA-A2) από τα ειδικά CTLs [171]. Ανάλογα συμπεράσματα περιέγραψε σε εργασία της η ομάδα της Morel, στην οποία δεν παρουσιάστηκε το αντιγονικό πεπτίδιο Melan-A$_{26-35}$ στα αντίστοιχα CTLs λόγω διαφοροποιημένης διάσπασης αμινοξέων από το ανοσοπρωτεάσωμα [172]. Συλλέγοντας παρόμοια αποτελεσμάτα, όπως αυτά των προαναφερθέντων εργασιών, μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει, η ύπαρξη αντικρουόμενων δεδομένων σχετικά με τη χρήση των hTERT πεπτιδίων σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας.

Συχνότητα αντι-survivin και αντι-hTERT pCTLs σε φυσιολογικά άτομα

Ελάχιστες πληροφορίες για αντιγονοειδικές CD8 απαντήσεις σε άτομα χωρίς καρκίνο υπάρχουν στην βιβλιογραφία, καθώς οι παρατηρήσεις των υγιών μαρτύρων αποτελούν στοιχείο σύγκρισης για τις αντίστοιχες CD8 Τ απαντήσεις των ασθενών με καρκίνο. Πολλές εργασίες [105] περιγράφουν μη ανιχνεύσιμη CD8 απάντηση έναντι του πεπτιδίου Surv.A2 σε υγιείς μάρτυρες, ενώ λίγες είναι αυτές που περιγράφουν αντι-Surv.A24 απάντηση σε φυσιολογικούς δότες [100, 102, 103], ωστόσο, στις μελέτες αυτές η συχνότητα εκτιμήθηκε με διαφορετική μεθοδολογία.

Ένα ακόμη εύρημα της παρούσας μελέτης, το οποίο θα μπορούσε να αποδειχθεί εξαιρετικής σημασίας αναφορικά με τη σπουδαιότητα των αυτόματων CTL απαντήσεων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, είναι ότι όπως και στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, έτσι και στους υγιείς δότες παρουσιάστηκε η ίδια δυσκολία αναφορικά με την ανίχνευση CTL απαντήσεων έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης, ενώ είναι γνωστό ότι μπορούν να επαχθούν τέτοιες απαντήσεις έναντι πολλών άλλων αντιγόνων των όγκων [5, 166 173]. Αντίθετα, στους υγιείς μάρτυρες ανιχνεύτηκαν CTLs έναντι των πεπτιδίων της hTERT.A2 και hTERT.A24 στο 50% των δειγμάτων, αποδεικνύοντας ότι ειδικά έναντι των όγκων CTLs κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα ατόμων χωρίς καρκίνο. Πιο συγκεκριμένα, στους υγιείς η συχνότητα ανίχνευσης ειδικών CTLs έναντι του Surv.A2 υπολογίστηκε μικρότερη από ~1.4 x10^{-7} και έναντι του πεπτιδίου Surv.A24 μικρότερη από ~2 x10^{-7} CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος. Τέλος, η συχνότητα ανίχνευσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

των αντι-hTERT.A2 και αντι-hTERT.A24 CTLs στους φυσιολογικούς δότες υπολογίστηκε σε ~1.5 x10^{-7} CD8 κύτταρα και 1.6 x10^{-7} CD8 κύτταρα του περιφερικού αίματος αντίστοιχα.

Τα ειδικά των όγκων pCTLs που ανιχνεύθηκαν στο αίμα των φυσιολογικών ατόμων, θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν αυτοδραστικούς κλώνους οι οποίοι έχουν διαφύγει από την επιλογή στον θύμο και οι οποίοι ενισχύονται στους ασθενείς με καρκίνο λόγω της παρουσίας του όγκου. Η παρουσία αυτών των κλώνων δημιουργεί πολλά ερωτήματα: γιατί τα CTLs έχουν διαφύγει της αρνητικής επιλογής στον θύμο; Γιατί δεν παρατηρείται αυτοανοσία στην περιφέρεια; Έπειτα από σωρεία μελετών, πιστεύεται ότι τα δενδριτικά κύτταρα, πιθανώς λεμφικής προέλευσης, μπορεί να ευθύνονται για την παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στα θυμοκύτταρα κατά την εκπαίδευση του θύμου [174, 175]. Τέλος, υποστηρίζεται ότι ένας υποπληθυσμός θυμικών δενδριτικών κυττάρων έχει κυρίως ανοσοπρωτεάσωμα και συνεπώς ειδικοί CTLs διαφεύγουν της αρνητικής επιλογής [176].

Στάδιο Διαφοροποίησης ειδικών CTLs

Ένα άλλο ζήτημα που προκύπτει είναι αν αυτοί οι κλώνοι προέρχονται από έναν πληθυσμό παρθένων κυττάρων ή κυττάρων μνήμης. Αν υποθέσουμε ότι δεν παρουσιάζονται αντιγόνα των όγκων στα φυσιολογικά άτομα, τα ειδικά των όγκων pCTLs θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως παρθένα κύτταρα. Ωστόσο, ανεξάρτητα από την προέλευση τους, τα CTLs έχουν τη δυνατότητα να αντιδράσουν στη διέγερση που προκαλούν τα αντιγόνα καρκινικών κυττάρων και η παρουσία των αντιγόνων των όγκων αναμένεται να προκαλέσει διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κλώνων σε κύτταρα μνήμης. Λόγω της χαμηλής συχνότητας στην οποία απαντώται τα κύτταρα αυτά στο περιφερικό αίμα και από τη στιγμή που η μόνη αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση αυτών των σπάνιων pCTLs είναι με *in vitro* ενίσχυση, στην παρούσα μελέτη δεν ήταν εφικτό να διεξαχθεί άμεση εκτίμηση (π.χ. *ex vivo* χρώση CD45 και CCR7), προκειμένου να καθοριστεί το σταδιο διαφοροποίησης και η προέλευσή τους. Συνεπώς, αν και όλες οι CD8 γραμμές και οι κλώνοι φέρουν φαινότυπο των δραστικών μνημονικών και των τελικά διαφοροποιημένων (Παράγραφος 4.3 και 4.4) δεν είναι γνωστό εάν ο φαινότυπος αυτός αντιπροσωπεύει την προϋπάρχουσα κατάσταση των κυττάρων, ή η κατάστασή τους έχει προκληθεί από το σύστημα καλλιέργειας. Παρόμοιες προσπάθειες κατέληξαν στα ίδια συμπεράσματα, όπως στην εργασία των Pittet και των συνεργατών του, κατά την οποία το 95% των αντι-Melan-A/MART-1 CTLs ασθενών με μελάνωμα, έπειτα από *in vitro* διέγερση με το εν λόγω πεπτίδιο, φέρουν φαινότυπο δραστικών μνημονικών κυττάρων, σύμφωνα με τους Sallusto – Lanzavecchia [176, 177].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Ασθενείς με αυξημένη pCTL συχνότητα

Από την ανάλυση της συχνότητας στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες προέκυψε πως κάποιοι ασθενείς διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους ως προς την συχνότητα ανίχνευσης ειδικών κλώνων και ως προς τα χαρακτηριστικά τους. Για το λόγο αυτό έγινε μια μεγάλη προσπάθεια διεξοδικής μελέτης της CTL απάντησης στους συγκεκριμένους ασθενείς, όσο ήταν τεχνικά εφικτό. Στην περίπτωση του ασθενούς P#10, παρατηρήθηκε ότι είχε 4-21 φορές υψηλότερη συχνότητα απάντησης έναντι του hTERT.A2 πεπτιδίου συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Τέτοιου μεγέθους απαντήσεις εντοπιζονται σε ασθενείς έπειτα από εμβολιασμό και δεν έχουν περιγραφεί προηγουμένως σε αυτόματες απαντήσεις σε ασθενείς με καρκίνο ή υγιείς, όσον αφορά τα συγκεκριμένα πεπτίδια [178]. Στον ασθενή P#10 από τη διαδικασία του MLPC απομονώθηκαν κατά τη διάγνωση 12 κυτταρικές γραμμές που αναγνώριζαν το hTERT-A2 πεπτίδιο σε συχνότητα 42 $x10^{-7}$, και μετά τη θεραπεία 4 κυτταρικές γραμμές της ίδιας ειδικότητας σε συχνότητα 34 $x10^{-7}$ CD8 T κύτταρα του περιφερικού αίματος. Σε μία ακόμη περίπτωση στον ασθενή P#19 ανιχνεύθηκε μεγαλύτερη συχνότητα μετά από θεραπεία, η οποία ήταν 6.2 $x10^{-7}$ των CD8 T κυττάρων, ενώ κατά τη διάγνωση η συχνότητα ήταν <2 $x10^{-7}$ των CD8 T κυττάρων περιφερικού αίματος. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι 2 CD8 γραμμές που προέκυψαν από τον ασθενή P#19 μετά από *in vitro* ενεργοποιήσεις παρουσίασαν διαφορετικό φαινότυπο. Η μία CD8 γραμμή έφερε τον φαινότυπο δραστικών μνημονικών κυττάρων, όμοιο με εκείνο των υπόλοιπων ασθενών ($CD45RO^+$ $CCR7^-$ $CD28^+$ $CD57^-$), ενώ η άλλη CD8 γραμμή έφερε τον ίδιο φαινότυπο με εκείνο των υγιών ($CD45RO^+$ $CCR7^-$ $CD28^-$ $CD57^-$) (**Πίνακας 25**). Επιπλέον, από τη μελέτη της κλωνικότητας του TCR προέκυψε ότι οι 2 κλώνοι του P#19 έχουν διαφορετικούς TcR που αναγνωρίζουν το hTERT.A2 πεπτίδιο (**Πίνακας 28**) [179], πρόκειται δηλαδή για διαφορετικούς κλωνοτύπους οι οποίοι όμως αναγνωρίζουν το ίδιο πεπτιδικό αντιγόνο. Είναι, λοιπόν, πιθανό ο φαινότυπος των CTLs των ασθενών να εξαρτάται από το εάν στην πορεία της καρκινογένεσης ή/και της εξέλιξης της ασθένειας, ήρθαν σε επαφή με τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν. Μπορεί επίσης να υποθεί ότι στους ασθενείς τα CTLs θα μπορούσαν να παρουσιάζουν διαφορετική προέλευση ανάλογα με την έκφραση των αντιγόνων που αναγνωρίζουν στον καρκινικό ιστό και το μικροπεριβάλλον στην περιοχή του όγκου. Ωστόσο, με βάση τη δική μας ανάλυση, μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι στους ασθενείς που μελετήθηκαν, τα αντιγονοειδικά CTL είχαν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μνήμης.

Επίδραση της χημειοθεραπείας στη συχνότητα pCTL

Η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία μπορούν να αυξήσουν τις ειδικές ανοσολογικές απαντήσεις ανοίγοντας έτσι το δρόμο για συνδυαστικές χημειο-ανοσοθεραπευτικές εφαρμογές. [180]. Η σισπλατίνη είναι γνωστό ότι προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης [181] και, εκτός από την καθυστέρηση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ή την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου, η χρήση της θεωρήθηκε ότι δημιουργεί ανοσογονικούς όγκους. Έτσι, η χρήση της σε πειραματικά μοντέλα, με τον συνοδευτικό εμβολιασμό του όγκου με αντιγόνα, ενδέχεται να οδηγήσει σε βελτίωση των απαντήσεων αντι-καρκινικών $CD8^+$ Τ-κυττάρων [182]. Ωστόσο, δε διεξήχθη ακριβής μέτρηση της επίδρασης αυτής σε ανθρώπους. Προς αυτή την κατεύθυνση, διερευνήθηκε κατά πόσο η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία με σισπλατίνη είχε κάποια επίπτωση στα επίπεδα των pCTL που ανιχνεύθηκαν. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη συχνότητα των pCTL σε έντεκα ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, οι οποίοι ελέγχθηκαν τουλάχιστον ένα χρόνο μετά την ολοκλήρωση των κύκλων θεραπείας τους (**Εικόνα 35**).

Τα ευρήματα αυτά προειδοποιούν για τον κίνδυνο παρερμηνείας από την επέκταση των δεδομένων τα οποία προέκυψαν από μελέτες σε ζώα με καρκίνο [183], αφού τα δεδομένα αυτά δεν μπορούν πάντα να αναπαράγουν με ακρίβεια το πιθανό ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον του ανθρώπινου καρκίνου. Τα στοιχεία που προκύπτουν από τις παραπάνω εφαρμογές θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν έναν καθοριστικό παράγοντα για την πορεία της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του πνεύμονα.

Συχνότητα αντι-hTERT.A2 pCTL σε TILs

Σε καμία περίπτωση, στο σύνολο των δύο ασθενών (P#7 και P#8), μετά από διέγερση δύο εβδομάδων δεν ανιχνεύτηκαν ειδικά CTLs που να αναγνωρίζουν κάποιο από τα υπό έλεγχο πεπτίδια. Βέβαια, σε έναν από τους 2 ασθενείς, εντοπίστηκαν αντι-EBV CTLs σε υψηλή συχνότητα (**Πίνακας 24**). Η απουσία απάντησης στα TILs μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως μειωμένη ή απουσία έκφρασης αντιγόνων των όγκων από τα καρκινικά κύτταρα, αδυναμία των CTLs να διηθήσουν συμπαγείς όγκους, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, χαμηλή συχνότητα των CTLs κάτω από τα όρια ανίχνευσης της *ex vivo* ανάλυσης και αδυναμία των CTLs που ενδεχομένως έχουν βρεθεί στα TILs να πολλαπλασιαστούν *in vitro* εξαιτίας των ανοσοκατασταλτικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου που τα έχουν καταστήσει ανεργικά. Σε παρόμοιες μελέτες, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, ανιχνεύτηκε αντιγονοειδική απάντηση σε χαμηλό ποσοστό των δειγμάτων. Όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά, η αδυναμία πολλαπλασιασμού των CTLs στα TILs, μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλίες μορίων σηματοδότησης που επηρεάζουν την επιβίωσή τους, ενώ άλλα δεδομένα υποστηρίζουν πως μπορεί να οφείλεται στην ανικανότητα των κυττάρων αυτών να πολλαπλασιαστούν *in vitro*. Εντούτοις, αρκετές είναι οι εργασίες, που αναφέρονται σε υψηλή συχνότητα ανίχνευσης ειδικών των όγκων αντιγόνων όταν σημαίνονται με HLA-πολυμερή *ex vivo* κυρίως σε ασθενείς με μελάνωμα [184, 185].

Συχνότητα έναντι ιικών πεπτιδίων

Η παρούσα μελέτη παρέχει άμεσες ενδείξεις ότι οι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα παρουσιάζουν ειδική CTL απάντηση έναντι του ιού EBV ισοδύναμη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

με εκείνη των υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας. Επιπλέον, φάνηκε ότι η απάντηση ειδικών CTL έναντι πεπτιδίων EBV που προήλθε από άτομα αυτής της ηλικιακής ομάδας, είτε έπασχαν από καρκίνο είτε όχι, ήταν υποδιπλάσια από εκείνη που προήλθε από νεότερα υγιή άτομα [186]. Όσον αφορά τα υγιή άτομα, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρθηκαν πρόσφατα από τους Colonna-Romano και τους συνεργάτες τους [187] και τα οποία καταδεικνύουν την αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της ηλικίας και του ποσοστού των κυκλοφορούντων ειδικών αντι-EBV CTLs. Κατά πάσα πιθανότητα, αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν να εξηγηθούν στο πλαίσιο της πολύπλοκης διαδικασίας της ανοσογήρανσης των Τ-κυττάρων [188, 189]. Όσον αφορά τους ασθενείς με καρκίνο, το ενδιαφέρον είναι ότι παρουσιάζουν την ίδια απάντηση ειδικών CTLs του EBV με τους υγιείς συμμετέχοντες, και η οποία σχετίζεται με την ηλικία. Δηλαδή ούτε το αντιγονικό φορτίο του όγκου ούτε κανένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με τον καρκίνο δεν επηρέασε την ικανότητά τους να παρέχουν CTL απάντηση έναντι του ιού.

Τόσο οι κλώνοι των ασθενών όσο και οι κλώνοι των υγιών, που σχετίζονται με την ηλικία, εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των ειδικών pCTL έναντι του ιού. Το πιθανότερο είναι αυτές οι διαφορές μπορούν να εξηγηθούν από την κυτταρική γήρανση, σύμφωνα με την οποία τα ειδικά CTLs σε ασθενείς με καρκίνο έχουν πολλαπλασιαστεί αρκετές φορές κατά τη διάρκεια ζωής τους και παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα περαιτέρω αντίδρασης στο ερέθισμα κάποιου αντιγόνου. Τα παραπάνω συμπεράσματα υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς με καρκίνο δεν χαρακτηρίζονται απο μία αδυναμία της ανοσιακής απάντησης, αλλά από εξάντληση ή ανεργία των αντιγονοειδικών κυττάρων που σχετίζεται με την ηλικία [190]. Στο πλαίσιο αυτό, διαπιστώθηκε πρόσφατα, σε παράλληλη εργασία του εργαστηρίου, ότι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα παρουσιάζουν δεκαπλάσια αύξηση του αριθμού των αντικαρκινικών CTL σε σχέση με τους συνομήλικους υγιείς δότες [191]. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι σε συγκεκριμένους ασθενείς η αναποτελεσματική αντικαρκινική απάντηση αποτελεί, κατα πάσα πιθανότητα, αντανάκλαση των αλλαγών που συμβαίνουν στα άτομα λόγω ηλικίας [192] και που επηρεάζουν την ικανότητά τους να ανταποκριθούν αποτελεσματικά έναντι των όγκων. Με βάση τα στοιχεία που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, αξίζει να διερευνηθεί κατά πόσο νεαρά άτομα εκδηλώνουν μια πιο ισχυρή αντικαρκινική απάντηση, όπως συμβαίνει με την απάντηση έναντι του ιού EBV.

5.2 Λειτουργικότητα των αντιγονοειδικών κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η απομόνωση όλων των αντιγονοειδικών πληθυσμών από τους υγιείς μάρτυρες και σε όσες Τ κυτταρικές γραμμές ασθενών υπήρχε επάρκεια υλικού. Παρά τις πολλαπλές προσπάθειες καλλιέργειας και απομόνωσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

κλώνων, χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά ένας κλώνος υγιούς δότη και δύο κλώνοι ασθενών, οι οποίοι πολλαπλασιάστηκαν σε ικανοποιητικό βαθμό *in vitro*, ώστε να αποκτηθεί επαρκής αριθμός κυττάρων για τη χρήση τους σε περαιτέρω αναλύσεις. Μάλιστα, τα δείγματα αυτά εμφάνισαν παρόμοια ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών (IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ και TNF-α) και απουσία έκκρισης IL-10.

Οι λόγοι αδυναμίας των κλώνων να πολλαπλασιαστούν είναι άγνωστοι, ενδεχομένως όμως να σχετίζονται με την ανοσογήρανση των CTLs και την αντιγραφική εξάντληση των CD8 κυττάρων που προκλήθηκε από συνεχείς *in vitro* ενεργοποιήσεις. Η ανοσογήρανση περιλαμβάνει μια σειρά αλλαγών που επηρεάζει τη φυσική και την επίκτητη ανοσία. Με την γήρανση, η λειτουργία του θύμου αδένα εξασθενεί και οδηγεί στην διαταραχή της ισορροπίας των Τ πληθυσμών εξαιτίας της μείωσης των παρθένων κυττάρων, στη μείωση της ποικιλότητας των Τ κυττάρων και στη συσσώρευση των μνημονικών Τ απαντήσεων [193] έναντι χρόνιων λοιμώξεων όπως ο CMV [194]. Η αντιγραφική γήρανση, απο την άλλη πλευρά, αποτελεί ένα κυτταρικό πρόγραμμα το οποίο περιορίζει τον πολλαπλασιαμό των φυσιολογικών κυττάρων, προκαλώντας μη αναστρέψιμη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και κρίσιμες γενετικές και φαινοτυπικές αλλαγές. Εκτεταμένες έρευνες σε CD4 και CD8 κύτταρα έχουν δείξει ότι η αντιγραφική γήρανση είναι χαρακτηριστικό των φυσιολογικών κυττάρων του ανθρώπου. Όπως περιγράφεται από τους Globerson και Effros, τα γηρασμένα CD8 κύτταρα μιας καλλιέργειας, διατηρούν ακόμη κάποιες λειτουργίες, παρά την αδυναμία τους να πολλαπλασιάζονται [195], όπως για παράδειγμα, η υπερέκφραση του CD25 στην επιφάνεια γηρασμένων CD8 Τ κυττάρων έπειτα από *in vitro* διέγερση με πεπτίδιο [196].

Υπό αυτό το πρίσμα, τα CD8 κύτταρα ενδεχομένως να βρίσκονται στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης τους, και κατ' επέκταση δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως παθολογικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή έχει περιγραφεί και σε χρόνιες ιικές λοιμώξεις σε ηλικιωμένα άτομα, η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και δραστικότητας μετά από συνεχή επαφή με το αντιγόνο. Αρκετές εργασίες έχουν αναφερθεί στην συσχέτιση της CMV και EBV λοίμωξης με την παρουσία υψηλών ποσοστών $CD8^+$ $CD28^-$ ηλικιωμένων ατόμων [197].

Από την άλλη πλευρά, τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs) που εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ασθενείς με καρκίνο, ίσως να ευθύνονται για την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την επέκταση των κλωνικών Τ κυττάρων [198, 199]. Ωστόσο, το τελευταίο θεωρείται μάλλον απίθανο, δεδομένου ότι σε έναν περιορισμένο αριθμό δειγμάτων που ελέγχθηκαν (n = 4, 2 από την ομάδα των καρκινοπαθών και 2 από τα υγιή άτομα), ο αριθμός των $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ κυττάρων, δεν διέφερε μεταξύ των MLPC των φυσιολογικών συμμετεχόντων ή των ασθενών με καρκίνο, και δεν εντοπίστηκε καμία σχέση μεταξύ της παρουσίας $Foxp3^+$ κυττάρων και την ύπαρξη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ειδικών έναντι του όγκου pCTL στα δείγματα αυτά (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) [191].

Αν και ο χαμηλός αριθμός των υγιών δοτών δεν επιτρέπει στατιστικές αναλύσεις, εξετάζοντας τη λειτουργική ικανότητα των αντι-hTERT pCTL υγιών μαρτύρων και ασθενών, προέκυψε πως είχαν παρόμοια ικανότητα πολλαπλασιασμού και ίδια ένταση φθορισμού μετά από χρώση με τα HLA-πολυμερή (**Εικόνα 34Β**). Πράγματι, μελετώντας την συγγένεια του TcR, επιβεβαιώθηκε ότι οι κλώνοι των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων που εξετάστηκαν διέθεταν TcRs με παρόμοια συγγένεια για το πεπτίδιο hTERT.A2 (**Εικόνα 41Γ**). Η συγκέντρωση του πεπτιδίου που απαιτούνταν για να επιτευχθεί το 50% της μέγιστης λύσης ήταν παρόμοια για όλα τα δείγματα και κυμαινόταν μεταξύ 3 και 12 nM. Τα δεδομένα μας, παρά τον μικρό αριθμό κλώνων που χρησιμοποιήθηκε, καταδεικνύουν μειωμένη ικανότητα των CTL κλώνων –οι οποίοι απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο– να σκοτώσουν τα κύτταρα που εκφράζουν το σχετικό πεπτίδιο αντιγόνου, παρά την φαινομενικά παρόμοια ικανότητα να αναγνωρίζουν το πεπτίδιο στα κύτταρα-στόχους. Το τελευταίο ενδέχεται να σημαίνει ότι τα CD8 Τ-κύτταρα επηρεάζονται διαρκώς από το μικροπεριβάλλον του όγκου, διαμορφώνοντας έτσι την ικανότητά τους να ανταποκριθούν στο αντιγονικό ερέθισμα [200]. Έτσι, οι ασθενείς μπορεί να διαθέτουν κυκλοφορούντες κλώνους pCTL με διαφορετικές συγγένειες TCR, σε χαμηλή συχνότητα, επιφέροντας κατ' αυτόν τον τρόπο μια αποτελεσματική αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση. Αναφερόμενοι στη συγγένεια των κλώνων πρέπει να έχουμε υπόψη πως αφενός οι υψηλής συγγένειας TCR υπόκεινται σε αρνητική επιλογή στο θύμο, αφετέρου στους καρκινοπαθείς η συνεχής επαφή με το αντιγόνο διαμορφώνει το είδος και το εύρος των Τ κυττάρων στην περιφέρεια [201] καθιστώντας ανενεργά τα υψηλής συγγένειας CTL, και επιτρέποντας τη διατήρηση των χαμηλότερης συγγένειας CTL. Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που αποκαλύπτουν πως η συνάφεια του συμπλόκου MHC-πεπτίδιο-TCR σχετίζεται άμεσα με τη δραστικότητα έναντι του όγκου, καθώς μόνο τα υψηλότερης συγγένειας CTLs ήταν σε θέση να λύσουν ικανοποιητικά καρκινικά κύτταρα [202]. Είναι λοιπόν σχετικά αναμενόμενο στους καρκινοπαθείς να παραμένουν στην κυκλοφορία χαμηλής συγγένειας αντιγονοειδικοί κλώνοι που εμφανίζουν περιορισμένη λειτουργική ικανότητα.

5.3 Συμπέρασμα

Συγκεντρωτικά, η παρούσα μελέτη αποκάλυψε σημαντικά στοιχεία για την ποσότητα αλλά και ποιότητα της CTL απάντησης έναντι των αντιγόνων της σαρβιβίνης και της τελομεράσης στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν πως CTL απαντήσεις έναντι της σαρβιβίνης και του υποτύπου της δεν ανιχνεύονται σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και σε υγιείς της ίδιας ηλικιακής ομάδας. Συνεπώς, η απομόνωση και η καλλιέργεια αντι-Surv.A2 και αντι-Surv.A24 κλώνων δεν ήταν εφικτή,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

και κατ' επέκταση ο χαρακτηρισμός της αντι-σαρβίβίνης CTL απάντησης περιλαμβάνει μόνο τη συχνότητα ανίχνευσης ειδικών CTLs. Αντίθετα, αντι-hTERT CTLs εντοπίστηκαν τόσο σε άτομα χωρίς καρκίνο όσο και σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, και ανιχνεύτηκαν περίπου στην ίδια συχνότητα. Το γεγονός αυτό, ίσως να οφείλεται σε παράγοντες που σχετίζονται περισσότερο με την ανοσογονικότητα του αντιγόνου παρά με την ικανότητα των ασθενών με καρκίνο να απαντήσουν σε αυτό. Αναμφισβήτητα όμως, πρόκειται για ένα ζήτημα που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Τα ευρήματά μας, ωστόσο, δηλώνουν ότι, κατά την εξέταση της δυνατότητας εφαρμογής των πεπτιδίων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ικανότητά τους να προκαλούν αυτόματες CTL απαντήσεις –γενικότερα και όχι μόνο στους ασθενείς με καρκίνο– καθώς και το μέγεθος τους. Το μέγεθος των αυτόματων απαντήσεων των CTLs αποτελεί σημαντικότατη παράμετρο, όχι μόνο αναφορικά με την εκτίμηση των ανοσοαπαντήσεων μετά την θεραπεία αλλά, κυρίως, λόγω της πιθανής σχέσης του με την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας.

Η παρούσα ερευνητική προσπάθεια πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο έλλειψης εμπεριστατωμένων στοιχείων σχετικά με την αξιολόγηση και την επιλογή καταλληλότερων αντιγόνων για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν σημαντικές πληροφορίες, όχι μόνο για την αποτελεσματικότητα της ενδεχόμενης ανοσοθεραπείας αλλά, πολύ περισσότερο, για τα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των $CD8^+$ Τ-κυτταρολυτικών κλώνων έναντι πεπτιδίων αντιγόνων των όγκων που προϋπάρχουν στον οργανισμό των υγιών ατόμων και των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της έρευνας μας, σχετικά με την επίδραση της ακτινοχημειοθεραπείας στη συχνότητα των ειδικών pCTLs πεπτιδίων, θέτουν ερωτήματα σχετικά με την αναμενόμενη αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής χημειο-ανοσοθεραπείας. Έτσι, τα ευρήματά μας θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον σχεδιασμό βελτιωμένων μεθόδων ανοσοθεραπείας για τον καρκίνο του πνεύμονα.

Επιπλέον, η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα παρουσιάζουν αντι-EBV απάντηση ισοδύναμη με εκείνη των υγιών συμμετεχόντων της ίδιας ηλικίας, και υποστηρίζει ότι πιθανά η αρνητική έκβαση των αντικαρκινικών ανοσοθεραπευτικών μεθόδων στον καρκίνο του πνεύμονα ενδέχεται να οφείλεται στις υποκείμενες επιπτώσεις που έχει η γήρανση στο ανοσιακό σύστημα και όχι στην αναποτελεσματική αντικαρκινική απάντηση.

Τέλος, φαίνεται ότι οι ασθενείς με καρκίνο απάντησαν αποτελεσματικά έναντι ενός πεπτιδίου της τελομεράσης ενώ ταυτόχρονα είχαν αμελητέα απάντηση έναντι των πεπτιδίων της σαρβιβίνης, ανεξάρτητα από τα επίπεδα των αντίστοιχων καρκινικών αντιγόνων, τα οποία κι εκφράζονται στους εκάστοτε όγκους. Έτσι, ασθενείς με καρκίνο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

του πνεύμονα είναι δυνατό να επιδείξουν διαφορετικά επίπεδα ανοχής έναντι διαφόρων πεπτιδίων αντιγόνων των όγκων, υποστηρίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη χρήση αντικαρκινικών εμβολίων πολλαπλών επιτόπων. Επιπλέον, παρόλο που διάφορα αντιγόνα των όγκων ενδεχομένως συχνά να εκφράζονται σε καρκίνο του πνεύμονα, η ανίχνευση των ειδικών κυτταρολυτικών CTLs ενάντι επιτόπων των συγκεκριμένων αντιγόνων αποτελεί μάλλον σπάνιο γεγονός.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ Τα CD8$^+$ κυτταρολυτικά Τ-κύτταρα αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους δραστικούς μηχανισμούς της ειδικής έναντι των όγκων ανοσιακής απάντησης. Η μελέτη τους, με τη βοήθεια των σύγχρονων τεχνικών ελέγχου της κυτταρικής ανοσίας, αποτελεί θερμό αντικείμενο έρευνας, τόσο στο πλαίσιο κατανόησης της αποτυχίας της ανοσοεπιτήρησης να ελέγξει την ανάπτυξη των όγκων, όσο και υπό το φως των προσπαθειών επαγωγής τους με στόχο την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αναζήτηση κυτταρολυτικών CD8$^+$ Τ κλώνων έναντι επιτόπων των πρωτεϊνών σαρβιβίνη, σαρβιβίνη-2Β και hTERT στο περιφερικό αίμα και σε TILs ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα καθώς και ο ποσοτικός και ποιοτικός χαρακτηρισμός τους σε σύγκριση με αντίστοιχους κλώνους, που ενδεχομένως ανιχνεύονται σε υγιή άτομα, με τη χρήση τεχνικών μεγάλης ευαισθησίας.

ΥΛΙΚΟ Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 20 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του πνεύμονα (κατά την διάγνωση της νόσου) (17 άνδρες και 3 γυναίκες, μέσης ηλικίας 56±2.3 ετών) και 5 υγιείς δότες (5 άνδρες, μέσης ηλικίας 67.1±9.9 ετών). Σε 5 από τους 9 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα περιφερικό αίμα συλλέχθηκε επίσης 3 εβδομάδες μετά από 3-6 κύκλους θεραπείας με πλατίνα. Επίσης, σε όσους ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση έγινε συλλογή καρκινικού ιστού και απομόνωση TILs.

ΜΕΘΟΔΟΙ Κυτταρολυτικά CD8$^+$ Τ κύτταρα ειδικά έναντι πεπτιδίων των αντιγόνων σαρβιβίνης, σαρβιβίνης-2Β και τελομεράσης ανιχνεύθηκαν έπειτα από *in vitro* ενεργοποίηση περισσοτέρων των διακοσίων μικροκαλλιεργειών υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης. Η ανίχνευση της παρουσίας αυτών των κυττάρων έγινε με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας φθοριομένα HLA-πολυμερή. Η συχνότητα των αντιγονοειδικών CD8$^+$ Τ κυττάρων υπολογίστηκε με βάση την κατανομή Poisson διορθωμένη για σπάνια φαινόμενα κατά Bernoulli. Απομονώθηκαν CD8 γραμμές και χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά με βάση εξωκυττάριους δείκτες που καθορίζουν το στάδιο διαφοροποίησης. Από τις CD8 γραμμές ασθενών και μαρτύρων απομονώθηκαν κλώνοι με μαγνητικό διαχωρισμό που χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και λειτουργικά ως προς την λυτική τους ικανότητα, παραγωγή κυτταροκινών και την συγγένεια του TCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (α) Στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα κατά την διάγνωση και υγιών ατόμων δεν ανιχνεύθηκαν CTLs ειδικά έναντι των πεπτιδίων Surv.A2 και Surv.A24 ενώ (β) και στις δύο ομάδες ανιχνεύθηκαν CTLs ειδικά έναντι των πεπτιδίων της τελομεράσης, hTERT.A2 και hTERT.A24 αλλά στους ασθενείς η συχνότητα αυτή, παρουσίαζε μεγαλύτερη διακύμανση. (γ) Η συχνότητα των αντιγονοειδικών πληθυσμών στους ασθενείς φάνηκε ότι δεν επηρεάστηκε από τη ράδιο- και χημειοθεραπεία. (δ) Σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, αντιγονοειδικά CD8+ Τ κύτταρα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ασθενών, εμφάνισαν παρόμοια λειτουργικά χαρακτηριστικά. (ε) Ασθενείς με καρκίνο είχαν αντι-EBV $CD8^+$ Τ κύτταρα στα ίδια επίπεδα με αυτά των φυσιολογικών ατόμων. (στ) Στα TILs ασθενών, δεν ανιχνεύθηκε $CD8^+$ Τ απάντηση έναντι κανενός πεπτιδίου αντιγόνων των όγκων παρά μόνο έναντι ιικών πεπτιδίων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η μη ανίχνευση CD8 Τ απαντήσεων έναντι πεπτιδίων της σαρβιβίνης σε αντίθεση με την παρουσία pCTLs έναντι πεπτιδίων της hTERT, θέτει σημαντικά ερωτήματα ως προς την ανοσογονικότητα της σαρβιβίνης και την χρήση της στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου γενικότερα και όχι μόνο του καρκίνου του πνεύμονα. Η διακύμανση στην συχνότητα ανίχνευσης ειδικών κλώνων και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των pCTLs των ασθενών και φυσιολογικών ατόμων, θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν καθοριστικούς παράγοντες για την κατανόηση της ανοσιακής απάντησης των μέχρι τώρα κλινικών μελετών και στο σχεδιασμό βελτιωμένων ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

ABSTRACT

OBJECTIVE Cytolytic $CD8^+$ T cells are one of the major effector mechanisms against tumor specific immune response. Their study, using modern techniques of cellular immunity, is a subject of interest regarding the understanding of failure of immunosurveillance to control tumor growth, and their involvement in cancer immunotherapy. The purpose of this study was to detect CTL clones against epitopes of survivin, survivin-2B and hTERT in peripheral blood and TILs in patients with lung cancer, and to quantitatively and qualitatively characterize these clones in comparison with the corresponding clones, which may be detected in healthy subjects by using highly sensitive techniques.

MATERIAL Peripheral blood was collected from 20 patients with primary lung cancer (at diagnosis) (17 men and 3 women, mean age 56 ± 2.3 years) and 5 healthy donors (5 men, mean age 67.1 ± 9.9 years). In 5 out of 9 patients with lung cancer, peripheral blood also collected 3 weeks after 3-6 cycles of platinum. Also, tumor tissue was collected and TILs were isolated from patients who underwent surgery.

METHODS Cytolytic $CD8^+$ T cells against specific peptide of survivin, survivin-2B and telomerase were detected after *in vitro* amplification of several hundred microcultures under limiting dilution conditions. The detection of these cells was achieved by HLA-multimer flow cytometric technology. The frequency of antigen specific CD8 T cells was estimated by the use of Poisson distribution analysis for rare events, corrected by Bernoulli. CD8 lines were isolated and characterized phenotypically on the basis of extracellular markers that define the differentiation stage. CD8 clones from patients and normal individuals were isolated by magnetic sorting, and characterized phenotypically and functionally regarding their lytic capacity, cytokine production and affinity of their TCR.

RESULTS (a) in peripheral blood, anti-survivin or anti-survivin-2B specific CTL clones were not detected in patients, and in none of the healthy individuals, while (B) in both groups specific CTLs against peptides of telomerase, hTERT.A2 and hTERT.A24, were detected, however, the CTL frequency in patients showed higher variation. (c) The frequency of circulating peptide-specific pCTLs appeared to be unaffected by radio- and chemotherapy. (d) Compared to CTLs of healthy individuals, specific CTL clones of cancer patients showed similar qualitative and quantitative characteristics. (e) Anti-EBV CD8 T cells were detected in cancer patients at similar levels to those of healthy individuals. (f) In TILs, specific CD8 T cell response against tumor antigens was undetectable, however, specific CTL clones against viral peptides were identified.

CONCLUSION The absence of detectable CD8 T cell responses against peptides of surviving, opposed to the presence pCTLs against peptides of hTERT, raises important questions regarding the immunogenicity of survivin and the use of its peptides in

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

cancer immunotherapy, including lung cancer. The variation in frequency of detectable specific cytolytic clones and the pCTL functional differences between patients and normal subjects could represent key factors in understanding the immune response in clinical trials and the design of improved cancer immunotherapy.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

1 COLEY WB. The treatment of malignant tumour by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases *Am J Med Sci* 1893, 105:487

2 ROSENBERG SA, YANG JC, RESTIFO NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines *Nat Med* 2004*,* 10:909–915

3 ALTMAN JD, MOSS PA, GOULDER PJ, BAROUCH DH, MCHEYZER-WILLIAMS MG, BELL JI Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes *Science* 1996, 274:94–96

4 APPAY V, ROWLAND-JONES SL. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection *Semin Immunol* 2004, 16:205–212

5 BOON T, COULIE PG, VAN DEN EYNDE BJ, VAN DER BRUGGEN P. Human T cell responses against melanoma *Ann Rev Immunol* 2006, 24:6.1–6.34

6 KLEIN G. Surveillance team against cancer *Nature 2005*, 434:150

7 DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H, OLD LJ, SCHREIBER RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape *Nat Immunol* 2002, 3:991–998

8 SWANN JB, SMYTH MJ. Immune surveillance of tumors *J Clin Invest* 2007, 117:1137–1146

9 EHRLICH P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung *Ned Tijdschr Geneeskd* 1909, 5:273–290

10 BURNET F M. Cancer—a biological approach *Brit Med J* 1957, 1:841–847

11 THOMAS L. In: Lawrence HS (ed) Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States *Hoeber-Harper, New York*, 1959, pp. 529–532

12 PENN I. Posttransplant malignancies *Transplant Pro*c 1999, 31:1260–1262

13 BIRKELAND SA, LØKKEGAARD H, STORM HH. Cancer risk in patients on dialysis and after renal transplantation *Lance*t 2000, 355:1886–1887

14 PENN I. Malignant melanoma in organ allograft recipients *Transplantation* 1996, 61:274–278

15 CLARK WH JR, ELDER DE, GUERRY D, BRAITMAN LE, TROCK BJ, SCHULTZ D, SYNNESTVEDT M, HALPERN AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression *J Natl Cancer Inst* 1989, 81:1893–1904

16 MIHM MCJR, CLEMENTE CG, CASCINELLI N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response *Lab Invest* 1996, 74:43–47

17 RILKE F, COLNAGHI MI, CASCINELLI N, ANDREOLA S, BALDINI MT, BUFALINO R ET AL. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors *Int J Cancer* 1991, 49:44–49

18 NAITO Y, SAITO K, SHIIBA K, OHUCHI A, SAIGENJI K, NAGURA H, OHTANI H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer *Cancer Res* 1998, 58:3491–3494

19 DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. The three Es of cancer immunoediting *Annu Rev Immunol* 2004, 22:329–360

20 DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting *Immunity* 2004, 21:137–148

21 SMYTH MJ, DUNN GP, SCHREIBER RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity *Adv Immunol* 2006, 90:1–50

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

22 LOEB LA, LOEB KR, ANDERSON JP. Multiple mutations and cancer *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:776–781

23 LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers *Nature* 1998, 396:643–649

24 MACKIE RM, REID R, JUNOR B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery *N Engl J Med* 2003, 348:567–568

25 PENN I. Donor transmitted disease: cancer *Transplant Proc* 1991, 23:2629–2631

26 PENN I. Malignant melanoma in organ allograft recipients *Transplantation* 1996, 61:274–278

27 SURANYI MG, HOGAN PG, FALK MC, AXELSEN RA, RIGBY R, HAWLEY C, PETRIE J. Advanced donor-origin melanoma in a renal transplant recipient: immunotherapy, cure, and retransplantation *Transplantation* 1998, 66:655–661

28 ENGEL AM, SVANE IM, MOURITSEN S, RYGAARD J, CLAUSEN J, WERDELIN O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression *APMIS* 1996, 104:629–639

29 SHANKARAN V, IKEDA H, BRUCE AT, WHITE JM, SWANSON PE, OLD LJ, SCHREIBER RD. IFN-γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity *Nature* 2001, 410:1107–1111

30 SVANE IM, ENGEL AM, NIELSEN MB, LJUNGGREN HG, RYGAARD J, WERDELIN O. Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice *Eur J Immunol* 1996, 26:1844–1850

31 SMYTH MJ, CROWE NY, GODFREY DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma *Int Immunol* 2001, 13:459–463

32 STREET SE, TRAPANI JA, MACGREGOR D, SMYTH MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon-γ *J Exp Med* 2002, 196:129–134

33 ZITVOGEL L, TESNIERE A, KROEMER G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion *Nat Rev Immunol* 2006, 6:715–727

34 MITRA R, SINGH S, KHAR A. Antitumor immune responses *Expert Rev Mol Med* 2003, 5:1–19

35 OSTRAND-ROSENBERG S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity *Curr Opin Genet Dev* 2008, 18:11–18

36 KIM R, EMI M, TANABE K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape *Immunology* 2007, 121:1–14

37 PIEMONTI L, ZERBI A, DI CARLO V. Strategies for tumor immune escape *Drugs Today* 2003, 39:701–724

38 MALMBERG KJ, LJUNGGREN HG. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance *Semin Cancer Biol* 2006, 16:16–31

39 PAWELEC G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53:262–274

40 ROCHA B, TANCHOT C. The Tower of Babel of CD8+ T-cell memory: known facts, deserted roads, muddy waters, and possible dead ends *Immunol Rev* 2006, 211:182–196

41 MASOPUST D, VEZYS V, WHERRY EJ, AHMED R. A brief history of CD8 T cells *Eur J Immunol* 2007, 37:S103–110

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

42 KLEBANOFF CA, GATTINONI L, RESTIFO NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy *Immunol Rev* 2006, 211:214–224

43 LODOLCE JP, BOONE DL, CHAI S, SWAIN RE, DASSOPOULOS T, TRETTIN S, MA A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998, 9:669–676

44 ZHANG X, SUN S, HWANG I, TOUGH DF, SPRENT J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8C T cells in vivo by IL-15 *Immunity* 1998, 8:591–599

45 SCHLUNS KS, KIEPER WC, JAMESON SC, LEFRANCOIS L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000, 1:426–432

46 SALLUSTO F, LENIG D, FORSTER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions *Nature* 1999, 401:708–712

47 SALLUSTO F, GEGINAT J, LANZAVECCHIA A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance.*Annu Rev Immunol 2004*, 22:745–63

48 SALLUSTO F, KREMMER E, PALERMO B, HOY A, PONATH P, QIN S, FORSTER R, LIPP M, LANZVECCHIA A. Switch in chemokine receptor expression uponTCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells *Eur J Immunol* 1999, 29:2037–2045

49 KISHIMOTO TK, JUTILA MA, BUTCHER EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:2244–2248

50 CHAO CC, JENSEN R, DAILEY MO. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells *J Immunol* 1997, 159:1686–1694

51 GEGINAT J, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Proliferation and differentiation potential of human CD8C memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines *Blood* 2003, 101:4260–4266

52 SON NH, MURRAY S, YANOVSKI J, HODES RJ, WENG N. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age *J Immunol* 2000, 165:1191–1196

53 BOISE LH, MINN AJ, NOEL PJ, JUNE CH, ACCAVITTI MA, LINDSTEN T, THOMPSON CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL *Immunity* 1995, 3:87–98

54 LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets *Curr Opin Immunol* 2005, 17:326–332

55 BOUNEAUD C, GARCIA Z, KOURILSKY P, PANNETIER C. Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of centraland effector-memory CD8 T cells in vivo *J Exp Med* 2005, 201:579–590

56 WHERRY EJ, TEICHGRABER V, BECKER TC, MASOPUST D, KAECH SM, ANTIA R Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets *Nat Immunol* 2003, 4:225–234

57 BARON V, BOUNEAUD C, CUMANO A, LIM A, ARSTILA TP, KOURILSKY P The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct *Immunity* 2003, 18:193–204

58 KAECH SM, WHERRY EJ, AHMED R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development *Nat Rev Immunol* 2002, 2:251–262

59 HARTY JT, BADOVINAC VP. Influence of effector molecules on the CD8 (+) T cell response to infection Curr Opin Immunol 2002, 14:360–365

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

60 SERBINA N, PAMER EG. Quantitative studies of CD8+ T-cell responses during microbial infection *Curr Opin Immunol* 2003, 15:436–442

61 WONG P, PAMER EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens *Annu Rev Immunol* 2003, 21:29–70

62 PEARCE EL, SHEN H. Making sense of inflammation, epigenetics, and memory CD8+ T-cell differentiation in the context of infection *Immunol Rev* 2006, 211: 197–202

63 KAECH SM, WHERRY EJ, AHMED R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development *Nat Rev Immunol* 2002, 2:251–262

64 GETT AV, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A, GEGINAT J. T cell fitness determined by signal strength *Nat Immunol* 2003, 4:355–360

65 LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Opinion-decision making in the immune system: progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response *Nat Rev Immunol* 2002, 2:982–987

66 MASOPUST D, AHMED R. Reflections on CD8 T-cell activation and memory *Immunol Res* 2004, 29:151–160

67 MASOPUST D, KAECH SM, WHERRY EJ, AHMED R. The role of programming in memory T-cell development *Curr Opin Immunol* 2004, 16:217–225

68 GOURLEY TS, WHERRY EJ, MASOPUST D, AHMED R. Generation and maintenance of immunological memory *Semin Immunol* 2004, 16:323–333

69 FEARON DT. The expansion and maintenance of antigen-selected CD8+ T cell clones *Adv Immunol 2007*, 96:103–139

70 ZHOU J, SHEN X, HUANG J, HODES RJ, ROSENBERG SA, ROBBINS PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy *J Immuno*l 2005, 175:7046–7052

71 DUDLEY ME, WUNDERLICH JR, ROBBINS PF, YANG JC, HWU P, SCHWARTZENTRUBER DJ, TOPALIAN SL, SHERRY R, RESTIFO NP, HUBICKI AM, ROBINSON MR, RAFFELD M, DURAY P, SEIPP CA, ROGERS-FREEZER L, MORTON KE, MAVROUKAKIS SA, WHITE DE, ROSENBERG SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes *Science* 2002, 298:850–854

72 KLEBANOFF CA, GATTINONI L, TORABI-PARIZI P, KERSTANN K, CARDONES AR, FINKELSTEIN SE, PALMER DC, ANTONY PA, HWANG ST, ROSENBERG SA, WALDMANN TA, RESTIFO NP. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells *Proc Natl Acad Sci* USA 2005, 102:9571–9576

73 GATTINONI L, KLEBANOFF CA, PALMER DC, WRZESINSKI C, KERSTANN K, YU Z, FINKELSTEIN SE, THEORET MR, ROSENBERG SA, RESTIFO NP. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells *J Clin Invest* 2005, 115:1616–1626

74 CUI Z, WILLINGHAM MC. The effect of aging on cellular immunity against cancer in SR/CR mice *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53:473–478

75 EFFROS RB. Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53: 925–933

76 AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma *Nat Med* 1997, 3:917–921

77 VERDECIA MA, HUANG H, DUTIL E, KAISER DA, HUNTER T, NOEL JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement *Nat Struct Biol* 2000, 7:602–608

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

78 CHANTALAT L, SKOUFIAS DA, KLEMAN JP, JUNG B, DIDEBERG O, MARGOLIS RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions *Mol Cell* 2000, 6:183–189

79 LECASSE EC, BAIRD S, KORNELUK RG, MACKENZIE AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer *Oncogene* 1998, 17:3247–3259

80 DEVERAUX QL, REED JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis *Genes Dev* 1999, 13:239 –252

81 TAMM I, WANG Y, SAUSVILLE E, SCUDIERO DA, VIGNA N, OLTERSDORF T, REED JC. IAP-family protein survivin inhibits caaspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs *Cancer Res* 1998, 58:5315 –5320

82 SHIN S, SUNG BJ, CHO YS, KIM HJ, HA NC, HWANG JI An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. Biochemistry 2001, 40:1117 –1123

83 O'CONNOR DS, GROSSMAN D, PLESCIA J, LI F, ZHANG H, VILLA A Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:13103 –13107

84 FORTUGNO P, WALL NR, GIODINI A, O'CONNOR DS, PLESCIA J, PADGETT KM Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function *J Cell Sci* 2002, 115:575–585

85 SUZUKI A, HAYASHIDA M, ITO T, KAWANO H, NAKANO T, MIURA M Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation *Oncogene* 2000, 19:3225 –3234

86 SUZUKI A, ITO T, KAWANO H, HAYASHHIDA M, HAYASAKI Y, TSUTOMI Y Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death *Oncogene* 2000, 19:1346 –1353

87 LI F, AMBROSINI G, CHU EY, PLESCIA J, TOGNIN S, MARCHISIO PC, ALTIERI DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin *Nature* 1998, 396:580 –584

88 SKOUFIAS DA, MOLLINARI C, LACROIX FB, MARGOLIS RL. Human survivin is a kinetchore-associated passenger protein *J Cell Biol* 2000, 151:1575 –1582

89 ZAFFARONI N, PENNATI M, DAIDONE MG. Survivin as target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 2005, 9:360 –372

90 MAHOTKA C, LIEBMANN J, WENZEL M, SUSCHEK CV, SCHMITT M, GABBERT HE, GERHARZ CD. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants *Cell Death Diff* 2002, 9:1334 –1342

91 ALTIERI DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer *Oncogene* 2003, 22:8581–8589

92 O'CONNOR DS, SCHECHNER JS, ADIDA C, MESRI M, ROTHERMEL AL, LI F, NATH AK, POBER JS, ALTIERI DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells *Am J Pathol* 2000, 156:393 –398

93 UREN AG, WONG L, PAKUSCH M, FOWLER KJ, BURROWS FG, VAUX DL, CHOO KH. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype *Curr Biol* 2000, 10:1319 –1328

94 ALTIERI DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target *Nat Rev Cancer* 2003, 3:46 –54

95 ALTURA RA, OLSHEFSKI RS, JIANG Y, BOUE DR. Nuclear expression of Survivin in paediatric ependymomas and choroid plexus tumours correlates with morphologic tumour grade *Br J Cancer* 2003, 89:1743 –1749

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

96 SHARIAT SF, LOTAN Y, SABOORIAN H, KHODDAMI SM, ROEHRBORN CG, SLAWIN KM, ASHFAQ R. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma *Cancer* 2004, 100:751–757

97 LI F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis *Br J Cancer* 2005, 92:212–216

98 ANDERSEN MH, SVANE IM, BECKER JC, STRATEN PT. The universal character of the tumor-associated antigen survivin *Clin Cancer Res* 2007, 13:5991–5994

99 FRIEDRICHS B, SIEGEL S, ANDERSEN MH, SCHMITZ N, ZEIS M. Survivin-derived peptide epitopes and their role for induction of antitumor immunity in hematological malignancies *Leuk Lymphoma* 2006, 47:978–985

100 HIROHASHI Y, TORIGOE T, MAEDA A, NABETA Y, KAMIGUCHI K, SATO T, YODA J, IKEDA H, HIRATA K, YAMANAKA N, SATO N, An HLA-A24-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitope of a Tumor-associated Protein Survivin *Clin Can Res* 2002, 8: 1731–1739

101 ICHIKI Y, HANAGIRI T, TAKENOYAMA M, BABA T, FUKUYAMA T, NAGATA Y, MIZUKAMI M, SO T, SUGAYA M, YASUDA M, SO T, SUGIO K, YASUMOTO K Tumor specific expression of survivin-2B in lung cancer as a novel target of immunotherapy *Lung Cancer* 2005, 48 (2) :281-9

102 CASATI C, DALERBA P, RIVOLTINI L, GALLINO G, DEHO P, RINI F, BELLI F, MEZZANZANICA D, COSTA A, ANDREOLA S, LEO E, PARMIANI G, CASTELLI C. The apoptosis inhibitor protein surviving induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectalcancer patients *Cancer Res* 2003, 23: 4507–4515

103 SCHMIDT SM, SCHAG K, MULLER MR, WECK MM, APPEL S, KANZ L, GRUNEBACH F, BROSSART P. Survivin is a shared tumorassociatedantigen expressed in a broad variety of malignanciesand recognized by specific cytotoxic T cells *Blood* 2003, 102: 571–576.

104 REKER S, MEIER A, HOLTEN-ANDERSEN L, SVANE IM, BECKER JC, THOR SP, ANDERSEN MH. Identification of novel survivin-derived CTL epitopes *Cancer Biol Ther* 2004, 3:173–179

105 REKER S, BECKER JC, SVANE IM, RALFKIAER E, STRATEN PT, ANDERSEN MH. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients *Int J Cancer* 2004, 108:937–941

106 ANDERSEN MH, PEDERSEN LO, CAPELLER B, BROCKER EB, BECKER JC, THOR SP. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients *Cancer Res* 2001, 61: 5964–5968

107 ANDERSEN MH, PEDERSEN LO, BECKER JC, STRATEN PT. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients *Cancer Res* 2001, 61:869–872

108 FENG J, FUNK WD, WANG SS, WEINRICH SL, AVILION AA, CHIU CP The RNA component of human telomerase *Science* 1995, 269:1236–1241

109 NAKAMURA TM, MORIN GB, CHAPMAN KB, WEINRICH SL, ANDREWS WH, LINGNER J, HARLEY CD, CECH TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human *Science* 1997, 277:955–959

110 HARRINGTON L, MCPHAIL T, MAR V, ZHOU W, OULTON R, BASS MB, ARRUDA I, ROBINSON MO. A mammalian telomerase associated protein *Science* 1997, 275:973–977

111 SHAY JW, ZOU Y, HIYAMA E, WRIGHT WE. Telomerase and cancer *Hum Mol Genet* 2001, 10:677-685

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

112 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, 14:1013–1021

113 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

114 KILIAN A, BOWTELL DD, ABUD HE, HIME GR, VENTER DJ, KEESE PK, DUNCAN EL, REDDEL RR, JEFFERSON RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types *Hum Mol Genet* 1997, 6:2011–2019

115 MAURO LJ, FOSTER DN. Regulators of telomerase activity *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 26:521–524

116 LIU J P. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity FASEB J 1999, 13:2091–2104

117 DUCREST AL, SZUTORISZ H, LINGNER J. NABHOLZ M. Regulation of the human telomerase gene *Oncogene* 2002, 21:541–552

118 HORIKAWA I, BARRETT JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms *Carcinogenesis* 2003, 24:1167–1176

119 Yan Z, Yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjöld M, Zetterberg A, Björkholm M, Gruber A, Xu D. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors *Cancer Res* 2000, 60:6230–6235

120 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, 69:188–197

121 MEYERSON M. Role of telomerase in normal and cancer cells *J Clin Oncol* 2000, 18:2626–2634

122 SHAY JW, WRIGHT WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase *Carcinogenesis* 2005, 26:867–874

123 CHANG S, KHOO CM, NAYLOR ML, MASER RS, DEPINHO RA. Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression *Genes Develop* 2003, 17:88–100

124 PERRAULT SD, HORNSBY PJ, BETTS DH. Global gene expression response to telomerase in bovine adrenocortical cells *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 335:925–936

125 JAGADEESH S, BANERJEE PP. Telomerase reverse transcriptase regulates the expression of a key cell cycle regulator, cyclin D1 *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 347:774–780

126 MASSARD C, ZERMATI Y, PAULEAU A, LAROCHETTE N, MÉTIVIER D, SABATIER L, KROEMER G, SORIA JC. hTERT: A novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway *Oncogene* 2006, 25:4505–4514

127 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, 313:322–330

128 MEYERSON M, COUNTER CM, EATON EN, ELLISEN LW, STEINER P, CADDLE SD, ZIAUGRA L, BEIJERSBERGEN RL, DAVIDOFF MJ, LIU Q, BACCHETTI S, HABER DA, WEINBERG RA. hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization *Cell* 1997, 90:785–795

129 GORDAN JD, VONDERHEIDE RH. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. Cytotherapy 2002, 4:317–327

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

130 VONDERHEIDE RH. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. Oncogene 2002, 21:674–679

131 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, 10:673–679

132 MINEV B, HIPP J, FIRAT H, SCHMIDT JD, LANGLADE-DEMOYEN P, ZANETTI M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans *Proc Natl Acad Sci* 2000, 97:4796–4801

133 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, 7:3343–3348

134 HUO LF, TANG JW, HUANG JJ, HUANG PT, HUANG CF, KUNG HF, LIN MC. Cancer immunotherapy targeting the telomerase reverse transcriptase *Cell Mol Immunol* 2006, 3:1–11

135 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, 65:5417–5427

136 AYYOUB M, MIGLIACCIO M, GUILLAUME P, LI´ENARD D, CEROTTINI JC, ROMERO P, LEVY F, SPEISER DE, VALMORI D. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8+ T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing *EUR J IMMUNOL* 2001, 31:2642–2651

137 Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells *Nat Med* 2000, 6:1011-1017

138 SU Z, DANNULL J, HEISER A, YANCEY D, PRUITT S, MADDEN J, COLEMAN D, NIEDZWIECKI D, GILBOA E, VIEWEG J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells *Cancer Res* 2003, 63:2127–2133

139 SU Z, DANNULL J, YANG BK, DAHM P, COLEMAN D, YANCEY D, SICHI S, NIEDZWIECKI D, BOCZKOWSKI D, GILBOA E, VIEWEG J. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer *J Immunol* 2005, 174:3798-3807

140 VONDERHEIDE RH, DOMCHEK SM, SCHULTZE JL, GEORGE DJ, HOAR KM, CHEN DY, STEPHANS KF, MASUTOMI K, LODA M, XIA Z, ANDERSON KS, HAHN WC, NADLER LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes *Clin Cancer Res* 2004, 10:828–839

141 BRUNSVIG PF, AAMDAL S, GJERTSEN MK, KVALHEIM G, MARKOWSKI-GRIMSRUD CJ, SVE I, DYRHAUG M, TRACHSEL S, MØLLER M, ERIKSEN JA, GAUDERNACK G. Telomerase peptide vaccination: A phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1553–1564

142 BOLONAKI I, KOTSAKIS A, PAPADIMITRAKI E, AGGOURAKI D, KONSOLAKIS G, VAGIA A, CHRISTOPHYLAKIS C, NIKOLOUDI I, MAGGANAS E, GALANIS A, CORDOPATIS P, KOSMATOPOULOS K, GEORGOULIAS V, MAVROUDIS D. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide *J Clin Oncol* 2007, 25:2727–2734

143 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, 21:5946–5950

144 http://www.cancerimmunity.org/statics/databases.htm

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

145 PITTET MJ, SPEISER DE, VALMORI D, RIMOLDI D, LIENARD D, LEJEUNE F, CEROTTINI JC, ROMERO P. Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8+ T cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients *Intern Immunopharm* 2001, 1:1235–1247

146 KARANIKAS V, LURQUIN C, COLAU D, VAN BAREN N, DE SMET C, LETHE B, CONNEROTTE T, CORBIERE V, DEMOITIE MA, LIENARD D, DRENO B, VELU T, BOON T, COULIE PG Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus J Immunol 2003, 171:4898–4904

147 COULIE PG, KARANIKAS V, COLAU D, LURQUIN C, LANDRY C, MARCHAND M, DORVAL T, BRICHARD V, BOON T A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:10290–10295

148 OSTLE B. Statistics in Research *The Iowa State University Press, Ames, Iowa* 1963, p. 75

149 RUDOLPH MG, STANFIELD RL, WILSON IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors *Annu Rev Immunol* 2006, 24:419-466

150 COLE DK, GAO GF. CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator *Cell Mol Immunol* 2004, 1:81-88

151 SHARPE AH, FREEMAN GJ. The B7-CD28 superfamily Nat Rev Immunol 2002, 2:116-126

152 GREENWALD RJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. The B7 family revisited *Annu Rev Immunol* 2005, 23:515-548

153 HOLMES N. CD45: al is not yet crystal clear *Immunology* 2006, 117:145-155

154 HERMISTON ML, XU Z, WEISS A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells *Annu Rev Immunol* 2003, 21:107-137

155 D'ANGEAC AD, MONIER S, PILLING D, TRAVAGLIO-ENCINOZA A, RÈME T, SALMON M CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses *Eur J Immunol.* 1994, 24:1503-1511

156 CAMPBELL JJ, BUTCHER EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing *Curr Opin Immunol* 2000, 12:336-341

157 SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression *Immunol Rev 2000*, 177:134-140

158 KARANIKAS V, TSOHAS S, BOUKAS K, KERENIDI T, NAKOU M, DAHABREH J, POULARAKIS T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Coexpression patterns of tumour-associated antigen genes by non-small cell lung cancinomas: Implications for immunotherapy *Cancer Biol Ther* 2008, 7(3): 345-52

159 COULIE GP, VAN DER BRUGGEN P, T-cell responses of vaccinated cancer patients *Current Opinion in Immunology* 2003, 15:131-137

160 KARANIKAS V, KHALIL S, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Anti-survivin antibody responses in lung cancer *Cancer Lett* 2009, 282 (2):159-66

161 ROHAYEM J, DIESTELKOETTER P, WEIGLE B, OEHMICHEN A, SCHMITZ M, MEHLHORN J, CONRAD K, RIEBER EP. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein surviving in cancer patients *Cancer Res,* 2000 60:1815–1817.

162 SCHMITZ M., DIESTELKOETTER P., WEIGLE B., SCHMACHTENBERG F.,STEVANOVIC S., OCKERT D., RAMMENSEE H.G., RIEBE, E.P.Generation of survivin-specific CD8 T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides *Cancer Res* 2000, 60:4845–4849

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

163 WOBSER M, KEIKAVOUSSI P, KUNZMZNN VOLKER, WEININGER M, ANDERSEN MH, BECKER JC Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen surviving *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1294-1298

164 COULIE GC, CONNEROTTE T. Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? *Current opinion in Immunology* 2005, 14:320-325

165 HANAGIRI T, VAN BAREN N, NEYNS B, BOON T, COULIE PG. Analysis of a rare melanoma patient with a spontaneous CTL response to a MAGE-A3 peptide presented by HLA-A1, *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:178–184

166 TRAKATELLI M, TOUNGOUZ M, BLOCKLET D, DODOO Y, GORDOWER L, LAPORTE M, VEREECKEN P, SALES F, MORTIER L, MAZOUZ N, LAMBERMONT M, GOLDMAN S, COULIE P, GOLDMAN M, VELU T. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:469-74

167 IDENOUE S. HIROHASHI IDENOUE S, HIROHASHI Y, TORIGOE T, SATO Y, TAMURA Y, HARIU H, YAMAMOTO M,KUROTAKI T, TSURUMA T, ASANUMA H, KANASEKI T, IKEDA H, KASHIWAGI K, OKAZAKI M, SASAKI K, SATO T,OHMURA T, HATA F, YAMAGUCHI K, HIRATA K, SATO N. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins *Clin Can Res* 2005, 11:1474–1482

168 KARANIKAS V, SOUKOU F, KALALA F, KERENIDI T, GRAMMOUSTIANOU ES, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Baseline levels of CD8+ T cells against survivin and survivin-2B in the blood of lung cancer patients and cancer-free individuals *Clin Immunol* 2008, 129(2):230-40

169 MAECKER B, VON BERGWELT-BAIDON MS, ANDERSON KS, VONDERHEIDE RH, ANDERSON KC, NADLER LM, SCHULTZE JL Rare naturally occurring immune responses to three epitopes from the widely expressed tumour antigens hTERT and CYP1B1 in multiple myeloma patients *Clin Exp Immuno*. 2005, 141(3):558-62

170 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, 10:673–679

171 VALMORI D, GILEADI U, SERVIS C, DUNBAR PR, CEROTTINI JC, ROMERO P, CERUNDOLO V, LEVY F. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3 *J Exp Med* 1999, 189:895–906

172 MOREL S, LEVY F, BURLET-SCHILTZ O, BRASSEUR F, PROBST-KEPPER M, PEITREQUIN AL, MONSARRAT B, VAN VELTHOVEN R, CEROTTINI JC, BOON T, GAIRIN JE, VAN DEN EYNDE BJ. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells *Immunity* 2000, 12:107–117.

173 SO T, HANAGIRI T, CHAPIRO J, COLAU D, BRASSEUR F, YASUMOTO K, BOON T, COULIE PG. Lack of tumor recognition by cytolytic T lymphocyte clones recognizing peptide 195-203 encoded by gene MAGE-A3 and presented by HLA-A24 molecules *Cancer Immunol Immunother.* 2007, 56(2):259-69

174 ARDAVIN C. Thymic dendritic cells *Immunol Today* 1997, 18:350-361

175 AMSEN D, KRUISBEEK AM. *Immunol Rev* 1998, 165:209-29

176 NAGORSEN D, SCHEIBENBOGEN C, MARINCOLA FM, LETSCH A, KEILHOLZ U Natural T cell immunity against cancer *Clin Can Res* 2003, 9:4296-4303

177 PITTET MJ, VALMORI D, DUNBAR PR, SPEISER DE, LIÉNARD D, LEJEUNE F, FLEISCHHAUER K, CERUNDOLO V, CEROTTINI JC, ROMERO P. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

specific CD8+ T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals *J Exp Med* 1999, 190:705–715

178 WENANDY L, SORENSEN RB, SENGELOV L, SVANE IM, THOR STRATEN P, ANDERSEN MH The immunogenicity of the hTERT540-548 peptide in cancer *Clin Cancer Res* 2008, 14(1):4-7

179 LONCHAY C, VAN DER BRUGGEN P, CONNEROTTE T, HANAGIRI T, COULIE P, COLAU D, LUCAS S, VAN PEL A, THIELEMANS K, VAN BAREN N, BOON T Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen *Proc Natl Acad Sci* 2004, 2:14631-8

180 CORREALE P, CUSI MG, TSANG KY, DEL VECCHIO MT, MARSILI S, PLACA ML, INTRIVICI C, AQUINO A, MICHELI L, NENCINI C, FERRARI F, GIORGI G, BONMASSAR E, FRANCINI G. Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients *J Clin Oncol* 2005, 23(35):8950-8

181 CEPEDA V, FUERTES MA, CASTILLA J, ALONSO C, QUEVEDO C, PÉREZ JM Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity *Anticancer Agents Med Chem* 2007, 1:3-18.

182 TSENG CW, HUNG CF, ALVAREZ RD, TRIMBLE C, HUH WK, KIM D, CHUANG CM, LIN CT, TSAI YC, HE L, MONIE A, WU TC. Pretreatment with cisplatin enhances E7-specific CD8+ T-Cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination *Clin Cancer Res* 2008, 15;14(10):3185-92

183 RIZZUTO GA, MERGHOUB T, HIRSCHHORN-CYMERMAN D, LIU C, LESOKHIN AM, SAHAWNEH D, ZHONG H, PANAGEAS KS, PERALES MA, ALTAN-BONNET G, WOLCHOK JD, HOUGHTON AN. Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response *J Exp Med* 2009, 13;206(4):849-66

184 VALMORI D, PITTET MJ, VONARBOURG C, RIMOLDI D, LIÉNARD D, SPEISER D, DUNBAR R, CERUNDOLO V, CEROTTINI JC, ROMERO P. Analysis of the cytolytic T lymphocyte response of melanoma patients to the naturally HLA-A0201-associated tyrosinase peptide 368–376 *Cancer Res* 1999, 59:4050–5.

185 NAITO Y, SAITO K, SHIIBA K, OHUCHI A, SAIGENJI K, NAGURA H, OHTANI H. CD8 T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer *Cancer Res* 1998, 58:3491–3494

186 KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, SOUKOU F, KERENIDI T, TSOUGOS I, THEODOROU K, GEORGOULIAS P, GOURGOULIANIS KI, GERMENI AE Cytolytic T-cell response against Epstein-Barr virus in lung cancer patients and healthy subjects *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2010, 29(1):64

187 COLONNA-ROMANO G, AKBAR AN, AQUINO A, BULATI M, CANDORE G, LIO D, AMMATUNA P,FLETCHER JM, CARUSO C, PAWELEC G. Impact of CMV and EBV seropositivity on CD8 T lymphocytes in an old population from West-Sicily *Exp Gerontol* 2007, 42:995-1002

188 NIKOLICH-ŽUGICH J. Ageing and life-long maintenance of T cell subsets in the face of latent persistent infections *Nat Rev Immunol* 2008, 8:512-522

189 WENG NP. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 2006, 24:495-499.

190 EFFROS RB, DAGARAG M, SPAULDING C, MAN J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging *Immunol Rev* 2005, 205:147-57.

191 KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, SOUKOU F, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Naturally occurring tumor-specific CD8+ T-cell precursors in individuals with and without cancer *Immunol Cell Biol* 2010, 88:575-85

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

192 SANSONI P, VESCOVINI R, FAGNONI F, BIASINI C, ZANNI F, ZANLARI L, TELERA A, LUCCHINI G, PASSERI G, MONTI D, FRANCESCHI C, PASSERI M. The immune system in extreme longevity *Exp Gerontol* 2008, 43:61-65.

193 HAKIM FT, FLOMERFELT FA, BOYIADZIS M, GRESS RE. Aging, immunity and cancer *Current Opinion in Immunology* 2004, 16:151–156

194 KOCH S, SOLANA R, DELA ROSA O, PAWELEC G. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: A mini review *Mechanisms of Ageing and development* 2006, 127:538-543

195 GLOBERSON A, EFFROS RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes within the aged *Immunology Today* 2000, 21:515–520

196 PERILLO NL, NAEIM F, WALFORD RL, EFFROS RB. The in vitro senescence of human lymphocytes: failure to divide is not associated with a loss of cytolytic activity or memory T cell phenotype *Mechanisms of Ageing and Development* 1993, 67:173–185.

197 LOONEY RJ, FALSEY A, CAMPBELL D, TORRES A, KOLASSA J, BROWER C, MCCANN R, MENEGUS M, MCCORMICK K, FRAMPTON M, HALL W,ABRAHAM GN. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals *Clinical Immunology* 1999, 90:213–219.

198 BEYER M, SCHULTZE JL. Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment *Curr Pharm Des* 2009, 15(16):1879-92

199 KNUTSON KL, DISIS ML, SALAZAR LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:271–285

200 KROGER CJ, ALEXANDER-MILLER MA. Dose-dependent modulation of CD8 and functional avidity as a result of peptide encounter. *Immunology* 2007; 122:167–178

201 MAILE R, SILER CA, KERRY SE, MIDKIFF KE, COLLINS EJ, FRELINGER JA. Peripheral “CD8 Tuning” Dynamically Modulates the Size and Responsiveness of an Antigen-Specific T Cell Pool In Vivo *J Immunol* 2005, 174(2):619-27.

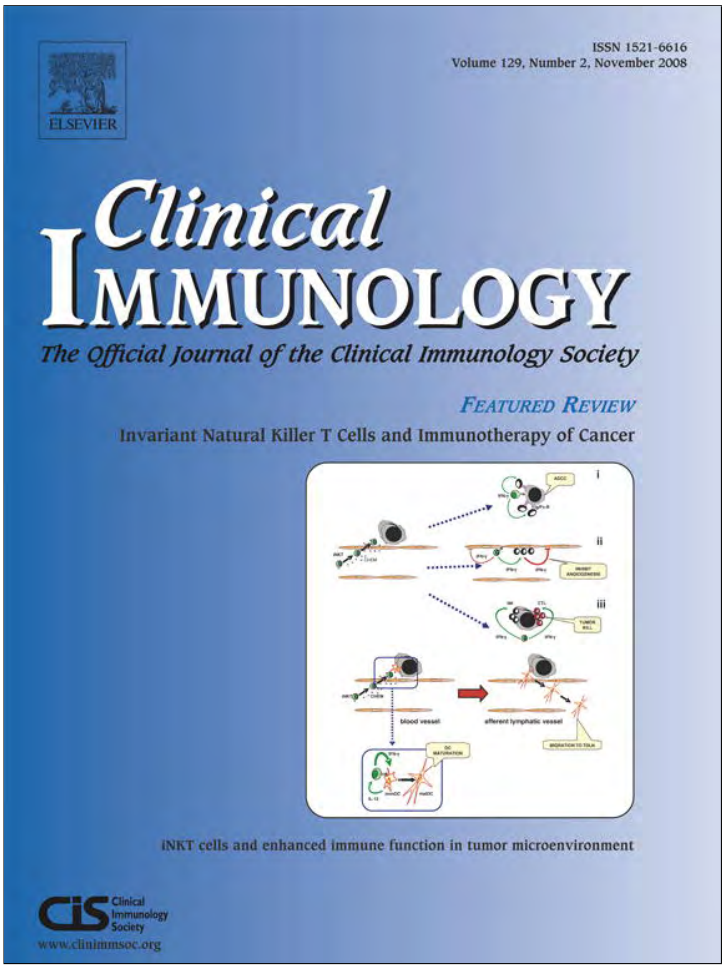
202 PALERMO B, CAMPANELLI R, MANTOVANI S, LANTELME E, MANGANONI AM, CARELLA G, DA PRADA G, DELLA CUNA GR, ROMAGNE F, GAUTHIER L, NECKER A, GIACHINO C. Diverse expansion potential and heterogeneous avidity in tumor-associated antigen-specific T lymphocytes from primary melanoma patients *Eur J Immunol* 2001, 31:412-420

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

7

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Clinical Immunology (2008) **129**, 230–240

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/yclim

Baseline levels of CD8$^+$ T cells against survivin and survivin-2B in the blood of lung cancer patients and cancer-free individuals

Vaios Karanikas[a,*], Faye Soukou[a], Fani Kalala[a], Theodora Kerenidi[b], Evangelia S. Grammoustianou[a], Konstantinos I. Gourgoulianis[b], Anastasios E. Germenis[a]

[a] *Cancer Immunology Unit, Department of Immunology and Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece*
[b] *Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece*

Received 21 April 2008; accepted with revision 23 July 2008
Available online 13 September 2008

KEYWORDS
HLA-multimers;
Spontaneously occurring CD8$^+$ T-cell responses;
Peptide-specific CD8$^+$ T cells;
Survivin;
Survivin-2B

Abstract Survivin and its variant survivin-2B have been considered as potential candidates for cancer immunotherapy. The magnitude however of spontaneously occurring CD8$^+$ T cells circulating precursor CTLs (pCTL), has never been evaluated. We set out to measure in 20 patients with lung carcinomas and 5 aged matched healthy male individuals (expressing HLA-A2 and/or -A24), the frequency of pCTLs specific for two naturally processed and presented peptides of survivin (LTLGEFLKL presented by HLA-A2) and survivin-2B (AYACNTSTL presented by HLA-A24) since these peptides are the only ones used in immunotherapeutic trials. The frequency of peptide-specific pCTLs was estimated using a sensitive method that combines HLA-multimer flow cytometric technology with a previous step of *in vitro* amplification under limiting dilution conditions. Anti-survivin or anti-survivin-2B specific CTL clones were not detected in 17 out of the 21 tested patients, and in none of the healthy individuals. In a number of peripheral blood mononuclear cell microcultures of the remaining 4 patients, diffuse clusters stained weakly by the HLA-multimers were observed which were not amplified after further stimulation and, therefore, they were finally considered as negative. The significance of the levels of spontaneously occurring CTL-responses against survivin and survivin-2B peptides, in cancer patients and cancer-free subjects, remains to be elucidated and it would be interesting to be considered in relation to the clinical efficacy of anti-cancer vaccination protocols.
© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Survivin is a member of the inhibitor of apoptosis family implicated also in regulating mitotic progression. Although

* Corresponding author: Fax: +302410 682580.
E-mail address: vkaran@med.uth.gr (V. Karanikas).

1521-6616/$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.clim.2008.07.024

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Table 1 Characteristics of the lung cancer patients involved in the study, and the survivin and survivin-2B mRNA expression levels (adjusted to the expression in a testis sample) in tumor samples of the NSCLC patients

Patient no	Gender	Age (years)	Histology	TNM status	Stage	Survivin	Survivin-2B
1	M	74	NSCLC	T2N2M0	IIIA	25.5	17.6
2	M	75	NSCLC	T4N0M0	IIIB	75.3	82.4
3	M	73	NSCLC	T4N2M0	IIIB	45.2	13.6
4	M	45	NSCLC	T2N2M0	IIIA	21.3	28.4
5	M	81	NSCLC	T2N1M0	IIB	11.2	7.3
6	M	69	NSCLC	T2N0M0	IB	9.6	6.7
7	F	59	NSCLC	T2N2M0	IIIA	5.5	2.3
8	F	47	NSCLC	T1N0M0	IA	5.1	1.8
9	M	67	NSCLC	T1N0M0	IA	37.6	4.1
10	M	70	NSCLC	T2N0M0	IB	0	0
11	M	80	NSCLC	T2N0M0	IB	18.2	11.7
12	M	69	SCLC	T2N1M0	IIB		
13	M	56	SCLC	T4N2M1	IV		
14	M	71	SCLC	T4N2M1	IV		
15	M	74	SCLC	T3N0M0	IIB		
16	F	54	SCLC	T1N3M0	IIIB		
17	M	74	SCLC	T4N2M0	IIIB		
18	M	70	SCLC	T2N2M0	IIIA		
19	M	63	SCLC	T2N3M0	IIIB		
20	M	71	SCLC	T4N3M0	IIIB		

rarely expressed in terminally differentiated adult tissues, it is highly upregulated in most cancers [1,2]. The survivin gene undergoes during oncogenesis alternative splicing resulting in the appearance of four as yet identified variants [2]. Amongst them, survivin-2B resulting from an in-frame insertion of a 23 amino acid sequence derived from intron 2, seems to exhibit a pro-apoptotic function acting thus as a natural antagonist against survivin [3,4]. Tumors of different origin appear to be able to process and present survivin and survivin-2B epitopes [5], a fact that subsequently led to the application of immunotherapeutic protocols including single survivin or survivn-2B peptides [6–8], or combinations of them with peptides from other tumor-associated antigens (TAAs) [9].

In an attempt to determine whether co-expression TAA patterns exist in lung cancer that could dictate the formulation of polyvalent vaccines for lung cancer, we have recently found that survivin and survivin-2B were co-expressed in 95.5% of tumor samples [10]. As a matter of fact, in several elegantly performed studies [11–14], HLA-A2 or -A24-restricted appropriate spontaneous cytolytic $CD8^+$ T-cell (CTL) immune responses capable of lysing tumor cells expressing both survivin and survivn-2B have been detected, justifying their current use in anti-cancer vaccines. Most intriguingly, however, existing evidence indicates that the success of immunotherapy might not only depend on the existence of these cells but also on the size of the spontaneously occurring responses that vaccination intents' to boost [15,16]. To our surprise, there is only scarce information regarding the frequency of precursor CTLs (pCTLs) specific for survivin and survivin-2B peptides [13,17] and their magnitude, has never been thoroughly evaluated, despite the fact that the presence of low level CTL has being implicated in the effectiveness of immunotherapy.

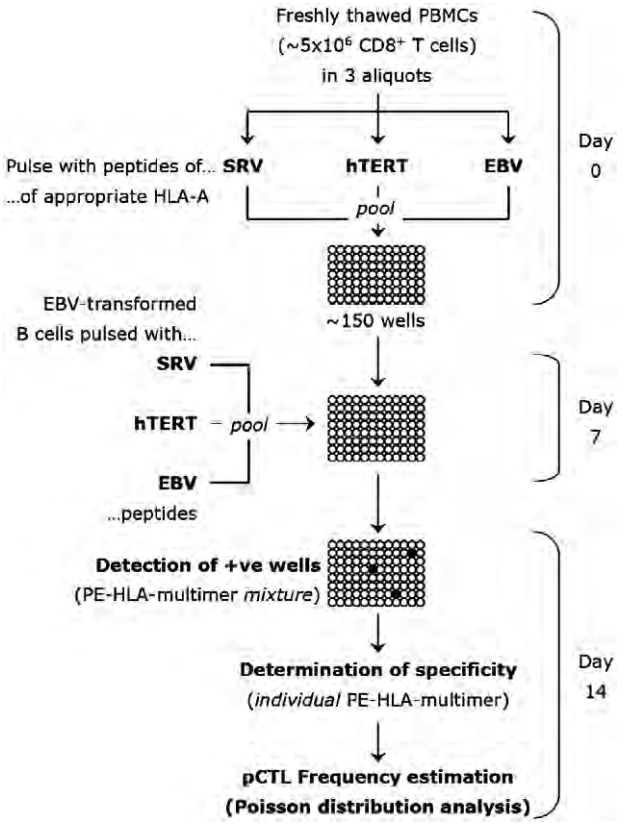


Figure 1 Outline of the procedure undertaken to measure the frequency of peptide-specific pCTLs amongst peripheral $CD8^+$ T cells in lung cancer patients and cancer-free individuals. Details involved in each step are described in the relevant Materials and methods sections.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Table 2 Primers and conditions of PCR

Genes	Primers from 5′ to 3′	Temperature and duration of			Cycle no	Acquisition temperature	Product size (bp)
		Denaturation	Annealing	Extension			
RT-PCR							
β-actin	f: GGCATCGTGATGGACTCCG	94 °C	68 °C	72 °C	21	–	621
	r: GCTGGAAGGTGGACAGCGA	1 min	1 min	1 min			
Survivin-std	f: CAGATTTGAATCGCGGGACCCGTT	94 °C	60 °C	72 °C	30	–	524
	r: CCTGGAAGTGGTGCAGCCACTCTG	1 min	1 min	1 min			
qRT-PCR							
β_2-microglobulin	SuperArray (Cat PPH01094A)	95 °C	55 °C	72 °C	40	72 °C	150
		30 s	30 s	30 s			
Survivin-2B	f: TTCTCAAGGACCACCGCATC	95 °C	62 °C	72 °C	45	85 °C	262
	r: TGTTCCTCTCTCGTGATCCG	10 s	10 s	30 s			

The latter prompted us to measure in the peripheral blood of patients with lung carcinomas expressing survivin and survivin-2B transcripts, the frequency of specific pCTLs against two naturally processed and presented peptides of these proteins which are the only ones used as yet in peptide vaccination studies. Frequency measurements were performed using a very sensitive methodology, which involved concomitant peptide stimulation of blood lymphocyte cultures under limiting dilution conditions, followed by HLA-multimer analysis.

Materials and methods

Patients and normal donors

Twenty patients with primary lung cancer (mean age 67.1 ± 10.1 years) and 5 apparently healthy male individuals with no history of malignancy or autoimmune disease (mean age 56.0 ± 2.6 years) were studied (Table 1). Only HLA-A2 and/or -A24 subjects were included in the study, their typing performed by PCR-SSP (Protrans SSP kits, Protrans, Germany) [18]. Twelve of the patients were HLA-A2, 7 HLA-A24 and one HLA-A2/A24. Accordingly, 3 of the healthy individuals were HLA-A2, one HLA-A24 and one HLA-A2/A24. Measurement of specific pCTLs, as detailed below, was performed in all patients at diagnosis, whilst in 5 out of the 9 patients with small cell lung carcinoma (SCLC) (no 12, 14, 17, 19, 20), this measurement was repeated 3 weeks after 3–6 cycles of platinum-based plus etoposide chemotherapy. In the 11 patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC) (no 1–11), tumor material was obtained and examined for mRNA expression, as detailed below.

The study conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki, it was reviewed and approved by the University of Thessaly Ethics Committee, and all participants provided informed consent.

Measurement of peptide-specific pCTLs

Taking into account the fact that for normal individuals, the anti-MAGE3.A1 pCTL-frequency detected in the peripheral blood is at the order of $\sim 4 \times 10^{-7}$ of peripheral $CD8^+$ T cells [19], a sensitive methodological approach was employed so that survivin-specific pCTLs could be detected *in vitro* [20,21]. This approach considers that low frequency pCTLs cannot be detected directly *ex vivo* but only if they are previously stimulated for a brief period of time under limiting dilution conditions. Thereafter, their presence is determined with the use of class I HLA-multimers. In particular, a sufficient number of mixed lymphocyte-peptide culture (MLPCs) (approximately 150) containing a total of approximately 5×10^6 $CD8^+$ T cells (depending on the number of $CD8^+$ cells obtained), is employed, so as to allow the detection of at least one positive MLPC. The proportion of MLPCs containing $CD8^+$ cells specifically stained with the given class I HLA-multimer is used to calculate, by the use of Poisson distribution analysis for rare events, the frequency of peptide-specific pCTLs amongst peripheral $CD8^+$ T cells. Fig. 1 presents an outline of the overall procedure undertaken and described in detail below. In essence, this approach aims towards the identification of a number of positive cultures rather than ascertaining the percent positive events in each positive microculture.

Peptides and class I HLA-multimers

Survivin peptides binding to HLA-A2 (LTLGEFLKL; SRV.A2) and HLA-A24 (AYACNTSTL; SRV.A24) were used as test peptides. Two Epstein–Barr virus (EBV) peptides (GLCTLVAML; BMLF1.A2 and RYSIFFDYM; EBNA3C.A24) were used as controls. As a further control, peptides from another well validated TAA, namely human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (ILAKFLHWL; hTERT.A2 and VYAETKHFL; hTERT.A24), were used on the basis of their ability to induce spontaneous CTL-responses in cancer patients [22,23]. Peptides were used according to the HLA-A phenotype of the patients and the healthy individuals. Peptides synthesized on solid phase using F-moc for transient NH_2-terminal protection, were purchased as lyophilised at >90% purity ascertained by mass spectrometry (Abgent, San Diego, USA), dissolved in DMSO at 10 mg/mL and stored at −20 °C before use.

Class I HLA-multimers for each of the above peptides were kindly donated by Prof P Coulie (Christian De Duve Institute of Cellular Pathology, Universite Catholique de Louvain, Brussels, Belgium) and used as described [21]. The multimers containing survivin and hTERT peptides were labelled with

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Table 3 Frequencies of circulating pCTLs specific for survivin, survivin-2B and hTERT peptides detected in cancer patients and healthy individuals

Subject no	CD8 tested ($\times 10^6$)	MLPCs tested	+ve MLPCs	*f*	+ve MLPCs	*f*
			hTERT.A2		SURV.A2	
Patients						
1	1.5	76	0	<7.4	3(?)	15.0
2	6.5	192	0	<3.6	0	<2.6
5	3.8	272	3	7.8	0	<2.6
6	6.6	184	0	<1.5	0	<1.5
8	3.5	160	1	2.6	0	<2.8
9	1.6	88	0	<6.3	0	<6.3
10	2.8	106	12	42.0	0	<3.5
11	1.6	88	1	6.3	0	<6.3
13	0.8	78	1	13.0	3(?)	1.5
16	3.8	192	0	<2.6	0	<2.6
18	2.0	91	0	<5.2	0	<5.2
19	3.6	152	2	6.9	0	<3.4
20	2.0	168	2	9.9	3(?)	15.0
Healthy subjects						
21	8.4	192	1	1.0	0	<1
22	24.0	379	0	<0.4	0	<0.4
23	5.0	208	1	2.0	0	<2
24	2.5	176	0	<2.3	0	<2.3
Subject no	CD8 tested ($\times 10^6$)	MLPCs tested	+ve MLPCs	*f*	+ve MLPCs	*f*
			hTERT.A24		SURV.A24	
Patients						
1	1.5	76	0	<7.4	0	<5
3	10.0	171	0	<1	0	<1
4	2.8	93	1	3.6	0	<3.6
7	2.3	127	0	<4.2	0	<4.2
12	1.4	72	0	<7.3	0	<7.3
14	7.3	260	0	<1.4	1(?)	1.4
15	3.4	156	1	2.9	0	<2.9
17	2.9	160	0	<3.4	0	<3.4
Healthy subjects						
24	2.5	176	0	<2.3	0	<2.3
25	6.4	248	1	1.6	0	<1.6

f: frequency of pCTLs specific for the given peptide per 10^7 peripheral blood CD8 (not determined and remained blank when subjects did not express the corresponding HLA-A molecule);+ve: positive; see text for the explanation of "?", the "<" designation of frequencies and the abbreviations of the peptides.

phycoerythrin (PE) and multimers containing EBV peptides were labelled with allophycocyanin (APC). The multimer containing the MAGE3.A2 peptide (FLWGPRALV) was used to control for non-specific PE binding.

Mixed lymphocyte-peptide cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated by Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) density-gradient centrifugation, were cryopreserved in Iscove's medium containing 116 mg/L L-arginine, 36 mg/L L-asparagine and 216 g/L L-glutamine (complete medium), and supplemented with 10% human pooled serum and 10% DMSO. After thawing, PBMC were resuspended at a concentration of 10^7 cells/mL in complete medium supplemented with 1% human pooled serum, divided into groups and pulsed separately (60 min, room temperature) with 20 μg/mL of each test and control peptide (according to the HLA molecules expressed for each sample). After washing-off excess peptide, PBMC aliquots were mixed (populations pulsed with survivin and hTERT peptides were pooled) and distributed in round bottom 96 microwell plates at 2×10^5 cells in 0.2 mL of 10% human pooled serum-complete medium containing 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4 and 10 ng/mL IL-7. On day 7 of culture, MLPCs were restimulated for a further 7 days, by exchanging 50% of the medium with irradiated EBV-transformed B cells (EBV-B) pulsed separately with the same peptides used initially in the same cytokine mixture. During the second week of stimulation, the cultures were divided according to proliferation, in

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

medium containing IL-2 alone. On day 14, HLA-multimer labelling was performed (Fig. 1).

Detection of HLA-multimer positive cells

Antigen specific pCTLs contained in each microwell were detected after staining with relevant HLA-multimers and read on a FC500 Beckman-Coulter flow cytometer, equipped with 2 Lasers (488 και 633 nm). In brief, MLPCs were washed, resuspended in PBS with 1% human pooled serum, and incubated for 30 min at 37 °C with all multimers at a final concentration of 5 nM of heavy chains. All multimers were validated for specific staining by testing them against $CD8^+$ T-cell populations containing CTL specific for the corresponding SURV.A2 and hTERT.A2 peptides (Fig. 2). The multimer combination reflected the peptides used during the stimulation period and the HLA-A molecules of each subject. Multimers of different HLA-A heavy chain specificities were never combined. Anti-CD8 antibodies coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Immunotech, Beckman-Coulter) were added for a further 30 min incubation at 37 °C and the cells were washed, fixed with 0.5% formaldehyde, and analyzed by flow cytometry. In order to avoid false positive results due to autofluorescence and/or non-specific HLA-binding, the flow cytometric analysis procedure was performed as previously described [20,21]. In brief, any positive event detected by the use of an empty FL3 channel was regarded as autofluorescence and was excluded from further analysis. Moreover, any positive event stained by both PE and APC multimers of the same HLA-A heavy chain was regarded as non-specific binding (e.g. KIR) and was also excluded. Low percentage of multimer positive events especially when combined with low fluorescence intensity, was considered as equivocal and the particular MLPC was stimulated for one or two more weeks, and re-analysed. Positivity of MLPCs was ascertained only when multimer positive events appeared as a tight cluster (irrespective of the intensity) in the PE-APC dot plot.

If one or more MLPCs stained positive for the HLA-multimer combination used, then the staining was repeated separately for each multimer, to identify the peptide specificity of the reactive lymphocytes.

mRNA expression

Survivin and survivin-2B mRNA expression was detected as described previously [10]. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and RNase-Free DNase Set (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. 650 ng of total RNA was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using the Omniscript RT Kit (Qiagen) and random hexamers (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) at 42 °C for 60 min, as per the manufacturer's instructions.

Survivin gene mRNA expression was detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). To this purpose, 20 μM of a specific primer set was used in a total reaction volume of 25 μL. Thermocycling conditions (PTC-200, MJ Research, Watertown-Mass., USA), PCR cycles and

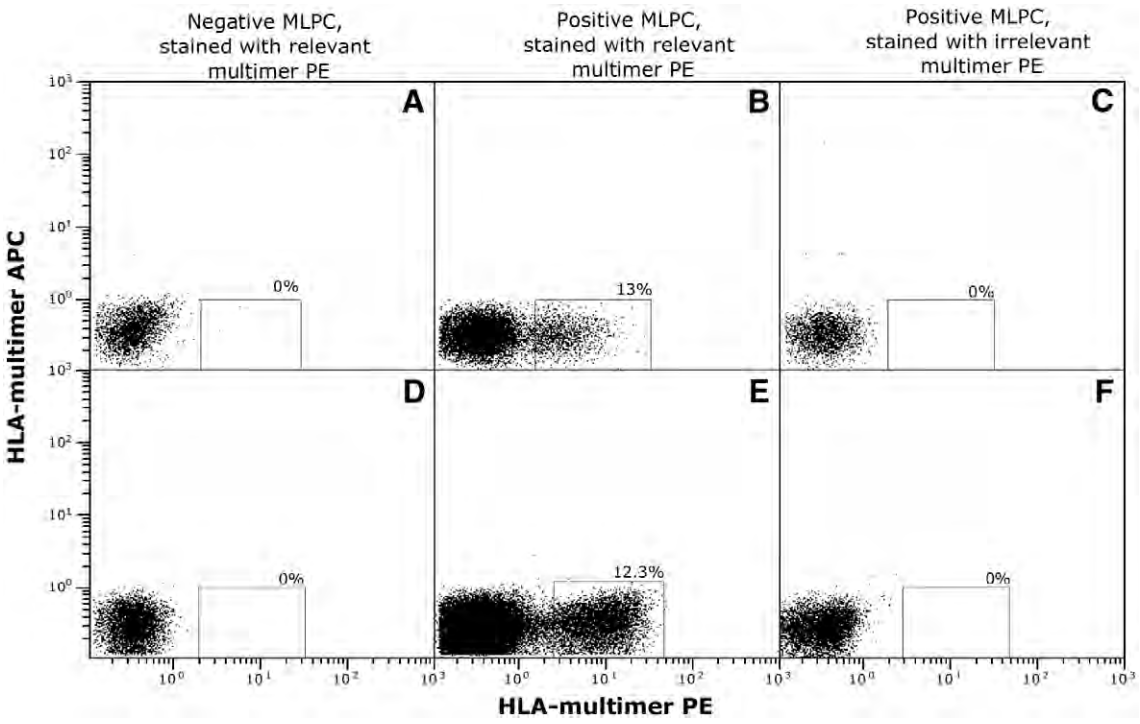


Figure 2 Flow cytometric detection of peptide-specific $CD8^+$ T cells. Plots show representative MLPC stained with the SURV.A2, the hTERT.A2 or the MAGE3.A2-PE-multimers, against the APC-HLA-multimer containing the corresponding EBV-peptide, i.e. the last step of flow cytometric analysis procedure undertaken to exclude non-specific events. (A) Negative MLPC stained with a SURV.A2 multimer. (B) Positive MLPC stained with a SURV.A2 multimer (this positive population was generated from a non-aged matched individual not included amongst the controls of this study). (C) Staining of the MLPC contained in B, with the irrelevant MAGE3.A2 PE multimer. (D) Negative MLPC stained with a hTERT.A2 multimer. (E) Positive MLPC stained with a hTERT.A2 multimer. (F) Staining of the MLPC contained in E, with the irrelevant MAGE3.A2 PE multimer.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

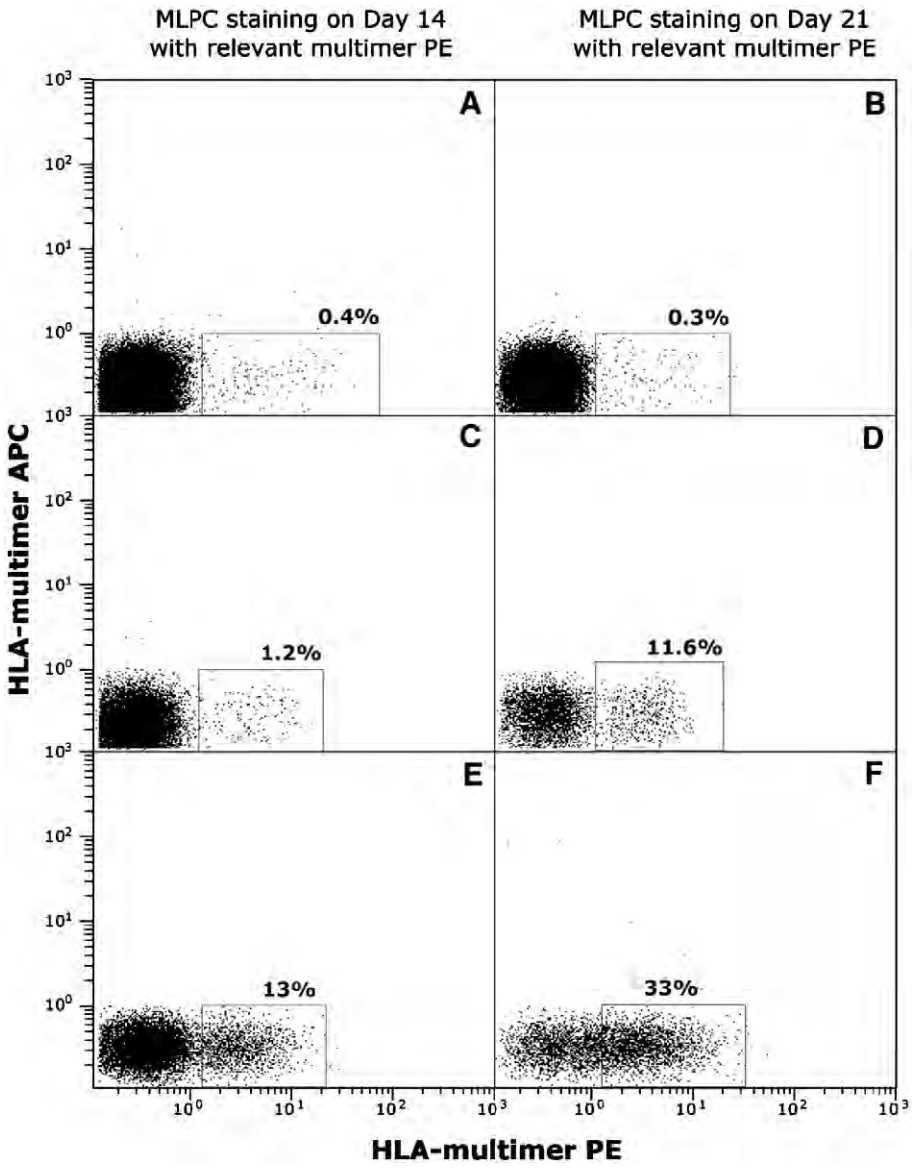


Figure 3 Flow cytometric detection of peptide-positive MLPCs. Plots show $CD8^+$ T cells stained with the appropriate PE-HLA-multimer against the APC-HLA-multimer containing the corresponding EBV-peptide. (A, B) SURV.A2 multimer staining. Plots refer to one of the doubtful MLPCs at day 14 of culture (A) and after a further one-week stimulation (B). No significant amplification is observed justifying their consideration as negative. (C, D) hTERT.A2 multimer staining of the same MLPC. Contrary to the SURV.A2 multimer stained MLPCs, at day 14 of culture, a definitive cluster of events is observed (C) that is amplified ×3 after a further one-week stimulation (D). (E, F) Similarly, when PBMC from a non-aged matched healthy individual are used, at day 14 of culture, a definitive cluster of SURV.A2 positive events is observed (E) that is amplified ×3 after a further one-week stimulation (F).

the resulting product size are presented in Table 2. The final PCR product was electrophoresed on 2% agarose gels containing ethidium bromide and visualized by UV illumination. A semiquantitative measurement for the level of expression in a given sample was normalised to that of the expression of β-*actin* gene in the same sample, by calculating the intensity quotient for the *survivin* and β-*actin* genes [24].

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to measure survivin-2B mRNA expression, using the automated thermocycler RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia). The SYBR Supermix kit (Invitrogen, Paisley UK) and the primer set for survivin-2B were used, and the specific conditions are presented in Table 2. β_2-microglobulin was used as the normalisation reference gene (RT^2 PCR Primer Set, SuperArray) since it is moderately abundant and expressed in most tissue types [25–28]. The relative expression of each gene was analyzed using the Rotor Gene software (Ver. 6) to obtain relative gene expression. PCR products were examined for the presence of by-products using the melting curve analysis provided by the software. The expression of survivin-2B in tumor samples was calculated as a multiple of the gene expression in lung tissue material obtained from two patients submitted to surgery for the resection of a hamartoma (male, age 62 years old) and lung bullae (male, age 28 years old), which served as calibrator.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Expression levels obtained by the two techniques were normalised to allow further comparisons. To adjust the expression values of the two genes, a commercially available sample of normal testis (Clontech, USA) was used. The results for each gene are expressed as a percentage of expression levels by this testis sample.

Results

Prior to assessing for the presence of peptide-specific CTL in the microcultures, the multimers used, were validated for their specificity and sensitivity. Multimers could detect only peptide-specific populations in MLPCs containing CTL specific for the corresponding SURV.A2 and hTERT.A2 peptides. These populations were stained specifically only by the corresponding multimers (Figs. 2B and E) and not by control ones labelled with the same fluorochrome (Figs. 2C and F). Most importantly, when no peptide-specific population was present in the MLPC, no staining was observed (Figs. 2A and D).

To estimate the frequency of peptide-specific pCTLs, MLPCs were performed on all twenty patients and five healthy individuals included in the study. Table 3 presents, for each of them the number of $CD8^+$ cells tested, the number of MLPCs performed, the number of MLPCs containing a multimer positive population and the estimated frequency of peptide-specific pCTLs. Frequencies designated as "less than" (<) are the minimum frequencies determined on the basis of the maximum number of $CD8^+$ cells obtained from the patients, and amongst which, one specific pCTL could not be found. This designation was used to declare that the presence of specific pCTLs at lower frequencies cannot be excluded. As it is shown, pCTLs against the corresponding survivin or survivin-2B peptides were not detected in 10 out of the 13 tested patients expressing HLA-A2, in 7 out of the 8 patients expressing HLA-A24, and in none of the healthy individuals expressing either or both HLA-A antigens.

In four MLPCs, the survivin multimers identified a weakly stained $CD8^+$ T-cell population. In three patients, anti-SURV.A2 pCTLs were detected at frequencies of 1.5, 15 and 15 per 10^7 peripheral $CD8^+$ cells respectively, whilst in another one an anti-SURV.A24 pCTL was detected at a frequency of 1.4 per 10^7 peripheral $CD8^+$ cells. In these four patients, however, the positivity of MLPCs was based on the detection of a very low percentage of multimer positive events of low intensity (Fig. 3A). Although the corresponding MLPCs were restimulated at least once more, the presumed CTL clones did not expand further, to allow these MLPCs to be unequivocally considered as positive (Fig. 3B) (hence the number of these MLPCs presented in Table 3, is followed by "?"). Nonetheless, this was not the case with the MLPCs stimulated with the control hTERT peptides which, even when they contained multimer positive cells of low percentage but in definitive clusters, they could be amplified further (Figs. 3C and D).

To understand whether not detecting survivin-specific CTL was due to the culture conditions employed, since under the same conditions, hTERT specific T cells could be amplified, we resorted to performing similar experiments using PBMC from a non-aged matched normal individual not included in the controls of this study. MLPC from this subject were stimulated with the SURV.A2 peptide and CTL could be amplified. This CTL population could recognise the multimer containing the same peptide and its specificity was verified by stimulating further for one more week (Fig. 3E and F).

Since preclinical studies indicate that the use of chemotherapy with agents inducing apoptosis of cancer cells, like cisplatin [29] and etoposide [30] used in our patients, stimulates the anti-tumor immune response [31,32], the measurement of the frequency of specific pCTLs was repeated post-chemotherapy in 5 patients with SCLC. No alteration in the frequency of pCTLs specific for peptides of survivin, survivin-2B and hTERT was observed (data not shown).

In considering whether the absence of detectable specific pCTLs related to the presence of transcripts of the corresponding genes, tumor samples from 11 NSCLC patients were assessed for survivin and survivin-2B mRNA expression. All of them were found expressing both genes at various levels (Table 1).

Discussion

Survivin is ranked amongst the top five most tumor-specific genes in the human genome and is therefore considered as a hot target for cancer therapy [33,34]. Similarly, survivin-2B, the only well studied variant generated during oncogenesis, is also widely expressed by tumors [4]. Survivin- and survivin-2B-based tumor vaccines have been exploited following the identification of CTLs specific against predicted as well as naturally processed peptides of these proteins exhibiting lytic activity against tumor cells [13,14,17,35–37]. Up to now, vaccination of cancer patients has been performed using two such peptides. These are the HLA-A2 restricted survivin$_{95-104}$ peptide [9] (which includes the corresponding 9mer used in this study) and its modified 9mer survivin$_{96-104}$ [7,8] as well as the HLA-A24 restricted survivin-2B$_{80-88}$ peptide [6] (used also in this study). Post-immunotherapy amplification of pre-existing specific CTL-responses has been demonstrated in a number of patients included in the aforementioned trials. However, the level of this amplification is not entirely clear since the approaches used in determining the pre-existing CTL-responses could not accurately measure them.

Great efforts have been made in the literature, predominantly for melanoma, to elucidate whether spontaneous antitumoral CTL-responses exist and to what extent, as well as whether they are beneficial to the patients by influencing the state of the tumor and its sensitivity to immunotherapy [extensively reviewed in 15,38]. With the advent of HLA-multimers, it was concluded that most patients develop spontaneous CTL-responses specific for tumor antigens. With the exception, however, of anti-Melan-A CTL-responses, their frequency is profoundly low and not detectable by direct *ex vivo* labelling of peripheral blood lymphocytes with multimers exhibiting a lower detection limit of $\sim 3\times10^{-4}$ of the $CD8^+$ cells. Therefore, it is well accepted that their detection can only be achieved indirectly by the use of *in vitro* expansion techniques. Despite inconsistencies of the up to now used strategies [39,40], when performed under limiting dilution, expansion techniques can decrease the detection limit of anti-MAGE.A3 pCTLs to 4×10^{-7} of $CD8^+$ T cells [19].

To the best of our knowledge, attempts to measure naturally occurring CTL-responses specific for peptides of survivin [13,41] and survivin-2B [42] in the peripheral blood, have detected frequencies ranging from undetectable (in all

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

cancer-free subjects and in the majority of cancer patients studied) to 123×10^{-4} of lymphocytes for anti-survivin, and 1.5×10^{-2} of $CD8^+$ T cells, for anti-survivin-2B. However, the ELISPOT assay for IFN-γ secretion used by Andersen et al. [13,41] has been shown to be quite heterogeneous [39] and, thus, does not allow their results to be compared with ours. Moreover, an inherent problem of this approach is the uncertainty as to whether the IFN-γ secreting cells are only the peptide-specific ones. On the other hand, in the study of Idenoue et al. [42], the HLA-multimer method was not performed under limiting dilution conditions, a fact that can overestimate the frequency, whilst false positive events due to non-specific binding were not taken into account.

In our study, a recently presented probabilistic approach, using a limiting dilution restimulation followed by a multimer assay [20,21], was employed to precisely measure the spontaneously induced naturally occurring CTL-responses against the above mentioned peptides of survivin and survivin-2B. The performance of the above approach was thoroughly and stepwise controlled to confront its sensitivity and specificity. Regarding the sensitivity, control peptides of hTERT were used to ascertain that our method can detect infrequent T-cell responses, whereas EBV control peptides giving strong responses were each time included in the measurements to assure the success of amplification. Finally, the specificity was verified by the use of a control sample with known anti-survivin CTL-positivity.

Ichiki et al. [17] applied a similar to our approach to measure pre-existing CTL-responses against the survivin-$2B_{80-88}$ peptide in regional lymph nodes. They used an ELISPOT assay for IFN-γ secretion combined with repeated *in vitro* amplification under limiting dilution conditions. In all the 4 lung cancer patients examined, they found pCTLs ranging from 0.5 to 2×10^{-7} of lymph node lymphocytes. Exactly the same to our approach for the measurement of pre-existing CTL-responses against peptides of other TAA, in the peripheral blood of a comparable number of patients, has been performed only in melanoma. Hanagiri et al. [43] found a frequency of anti-MAGE-3.A1 pCTLs to be in the vicinity of 5×10^{-7} of the $CD8^+$ cells for 42 patients and 5 cancer-free individuals. Trakatelli et al. [44], after examining 8 patients, found in 5 of them an anti-NA17.A2 pCTLs to range from 4 to 45×10^{-7} of the $CD8^+$ cells. Finally, So et al. [45] found a frequency of anti-MAGE-3.A24 specific pCTLs to be 2×10^{-8} of CD8 cells in non-cancerous individuals.

Despite our meticulous efforts, strong evidence for the presence of spontaneously induced circulating specific pCTLs against both peptides of survivin was not obtained regarding either the cancer patients or the healthy subjects of this study, although pCTLs were sought to a frequency of one per 24 million $CD8^+$ T cells. It is noteworthy that, in four cases, the inability of the presumed positive events to be multiplied following further stimulation, lead us to consider as negative for CTL clones, any MLPC giving diffuse (not clustered) cytometric scattergrams comprised of events with low fluorescence intensity. To our opinion, this observation dictates that special attention has to be given when interpreting such flow cytometric profiles, especially if non-specific binding is not taken into account [6,12,42,46].

Our results, related to the expression of survivin and survivin-2B by the examined tumors, signify that the absence of specific pCTLs against their peptides cannot be attributed to lack of expression, since we have recently found (also shown in Table 1) that survivin and survivin-2B were co-expressed in 95.5% of tumor samples and subsequently all other TAA co-expression patterns included this combination [10]. Whether the expression of TAAs alone by the tumors can prime specific pCTLs as well as whether these primed pCTLs are mostly confined within the tumoral area more than in the periphery, are questions of immense importance that remain, however, essentially unanswered. To this end, it must be noted that Ichiki et al. [17] found that the frequency of anti-survivin-$2B_{80-88}$ pCTLs in regional lymph nodes of lung cancer patients expressing the antigen was three times higher than that in non-expressing ones. To our opinion this difference cannot be considered as biologically significant and, therefore, we assume that it is in support of our conclusion that the absence of spontaneously occurring specific CTL-responses is unrelated to the expression of the antigen by the tumors.

Bearing in mind that both survivin and hTERT, which was used as control, are self antigens overexpressed by tumors, we have to underline the difference observed between them regarding their ability to elicit detectable CTL-responses. This finding indicates that the absence of detectable spontaneously induced specific CTL-response cannot be solely attributed to a presumed inherent difficulty of survivin as a self antigen to induce them. Although our experience and that of others [20,21], indicates that the culture system employed in this study is quite capable of amplifying pCTL, the protocol of stimulation could be a key factor. One alternative approach that could ameliorate any possible growth inability of spontaneously occurring anti-survivin-specific CTL due to the presence of regulatory T cells (Tregs) within the MLPC would have been to stimulate these cells with an enriched mature dendritic cell population as previously described [35]. This of course was not the case with the MLPCs described in Figs. 3E and F, which after three stimulations resulted in the amplification of a significant SURV.A2 positive population and were subsequently cloned and studied further indicating that rare T cells can be amplified (data not considered since this individual was non-age matched with our cancer patients).

Augmentation of peptide-specific CTL-responses has been detected following chemotherapy in both preclinical mouse models [47] and in one instance in cancer patients [48]. Our findings did not confirm these observations, suggesting that the examined peptides do not contribute in the expected stimulation of the anti-tumor immune response. Although factors related to the maturation of dendritic cells may be responsible [49], problems regarding processing and presentation of these antigens, coupled by a low affinity of the corresponding TcRs, cannot be excluded. To this end, although recent attempts have considered the use of a modified version of the SURV.A2 peptide to vaccinate patients, it is our feeling that since the aim of the study was to seek the presence of spontaneously induced naturally occurring CTL, this modified peptide would not exist naturally. Hence, no such pre-existing CTL would be amplified, but rather recruited T cells would have lower tumor reactivity than those from the endogenous response to the tumor [50].

Another finding of this study that could prove to be of importance regarding the significance of spontaneously occurring CTL-responses in cancer immunotherapy, is that,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

similar to the cancer patients, healthy individuals exhibited a very low frequency of detectable anti-survivin CTL-responses, whilst it is well known that they can generate such responses against numerous other TAAs [15,38]. This fact, together with the reasons outlined above, implies that factors related more to the immunogenicity of the antigen rather than to the ability of the cancer patients to respond to it, might be responsible. Indeed, published studies provide evidence that vaccination with the above peptides elicited CTL-responses detected by ELISPOT [6–9] whilst other class I and class II HLA restricted peptides of these proteins can also give rise to anti-tumor T-cell responses [37,51–55] indicating that the use of survivin and survivin-2B cannot be excluded from cancer immunotherapy.

Whether spontaneous CTL-responses and their magnitude would represent a factor related to the poor clinical efficacy of peptide-specific anti-cancer vaccines, generally and not only those of survivin, remains a matter requiring further evaluation. Under the light of the evidence provided by Marzo et al. [56] of a T-cell memory lineage commitment related to precursor frequency, this might prove to be a parameter of immense significance. Possibly, the inclusion of a thorough measurement of the pre-existing CTL immune responses in the protocols of the corresponding clinical trials could add important information towards this direction.

Acknowledgments

This work was supported by (a) a European Union-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%) (ENTER 04EP09) grant, (b) a European Union-European Social Fund (75%) & National Resources-EPEAEK II (Pythagoras) (25%) grant, and (c) a Marie Curie Incoming International Fellowship within the 6th European Community Framework Programme (FP6 Contract MIF1-CT-2006-021795, IRTALUNG) grant. The authors declare no conflicts of interest. We appreciate the help of Dr L. Rivoltini in proof reading the manuscript (Unit of Immunotherapy of Human Tumors, Istituto Nazionale Tumori, Milano, Italy).

References

[1] G. Ambrosini, C. Adida, G. Sirugo, D.C. Altieri, Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting, J. Biol. Chem. 273 (1998) 11177–11182.
[2] M.J. Duffy, N. O'Donovan, D.J. Brennan, W.M. Gallagher, B.M. Ryan, Survivin: a promising tumor biomarker, Cancer Lett. 249 (2007) 49–60.
[3] C. Mahotka, M. Wenzel, E. Springer, H.E. Gabbert, C.D. Gerharz, Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties, Cancer Res. 59 (1999) 6097–6102.
[4] F. Li, Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis, Br. J. Cancer 92 (2005) 212–216.
[5] F. Li, Survivin study: what is the next wave? J. Cell Physiol. 197 (2003) 8–29.
[6] T. Tsuruma, F. Hata, T. Torigoe, T. Furuhata, S. Idenoue, T. Kurotaki, M. Yamamoto, A. Yagihashi, T. Ohmura, K. Yamaguchi, T. Katsuramaki, T. Yasoshima, K. Sasaki, Y. Mizushima, H. Minamida, H. Kimura, M. Akiyama, Y. Hirohashi, H. Asanuma, Y. Tamura, K. Shimozawa, N. Sato, K. Hirata, Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer, J. Transl. Med. 2 (2004) 19.
[7] M. Wobser, P. Keikavoussi, V. Kunzmann, M. Weininger, M.H. Andersen, J.C. Becker, Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin, Cancer Immunol. Immunother. 55 (2006) 1294–1298.
[8] K. Otto, M.H. Andersen, A. Eggert, P. Keikavoussi, L.Ø. Pedersen, J.C. Rath, M. Böck, E.B. Bröcker, P.T. Straten, E. Kämpgen, J.C. Becker, Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin, Vaccine 23 (2005) 884–889.
[9] S. Fuessel, A. Meye, M. Schmitz, S. Zastrow, C. Linne, K. Richter, B. Lobel, O.W. Hakenberg, K. Hoelig, E.P. Rieber, M.P. Wirth, Vaccination of hormone-refractory prostate cancer patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial, Prostate 66 (2006) 811–821.
[10] V. Karanikas, S. Tsohas, K. Boukas, T. Kerenidi, M. Nakou, J. Dahabreh, T. Poularakis, K.I. Gourgoulianis, A.E. Germenis, Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy, Cancer Biol. Ther. 7 (2008) 345–352.
[11] S.M. Schmidt, K. Schag, M.R. Muller, M.M. Weck, S. Appel, L. Kanz, F. Grunebach, P. Brossart, Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells, Blood 102 (2003) 571–576.
[12] C.M. Coughlin, M.D. F leming, R.G. Carroll, B.R. Pawel, M.D. Hogarty, X. Shan, B.A. Vance, J.N. Cohen, S. Jairaj, E.M. Lord, M.H. Wexler, G.A. Danet-Desnoyers, J.L. Pinkus, G.S. Pinkus, J.M. Maris, S.A. Grupp, R.H. Vonderheide, Immunosurveillance and survivin-specific T-cell immunity in children with high-risk neuroblastoma, J. Clin. Oncol. 24 (2006) 5725–5734.
[13] M.H. Andersen, L.O. Pedersen, B. Capeller, E.B. Bröcker, J.C. Becker, P. thor Straten, Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients, Cancer Res. 61 (2001) 5964–5968.
[14] Y. Hirohashi, T. Torigoe, A. Maeda, Y. Nabeta, K. Kamiguchi, T. Sato, J. Yoda, H. Ikeda, K. Hirata, N. Yamanaka, N. Sato, An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin, Clin. Cancer Res. 8 (2002) 1731–1739.
[15] P. Romero, J.C. Cerottini, D.E. Speiser, The human T cell response to melanoma antigens, Adv. Immunol. 92 (2006) 187–224.
[16] S. Tanaka, M. Harada, T. Mine, M. Noguchi, R. Gohara, K. Azuma, M. Tamura, A. Yamada, A. Morinaga, M. Nishikori, K. Katagiri, K. Itoh, H. Yamana, T. Hashimoto, Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancer based on pre-existing peptide-specific ctotoxic T-lymphocyte precursors in the periphery, J. Immunother. 26 (2003) 357–366.
[17] Y. Ichiki, T. Hanagiri, M. Takenoyama, T. Baba, T. Fukuyama, Y. Nagata, M. Mizukami, T. So, M. Sugaya, M. Yasuda, T. So, K. Sugio, K. Yasumoto, Tumor specific expression of survivin-2B in lung cancer as a novel target of immunotherapy, Lung Cancer 48 (2005) 281–289.
[18] R. Blasczyk, U. Hahn, J. Wehling, D. Huhn, A. Salama, Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis, Tissue Antigens 46 (1995) 86–95.
[19] C. Lonchay, P. van der Bruggen, T. Connerotte, T. Hanagiri, P. Coulie, D. Colau, S. Lucas, A. Van Pel, K. Thielemans, N. van Baren, T. Boon, Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 14631–14638.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

[20] P.G. Coulie, V. Karanikas, D. Colau, C. Lurquin, C. Landry, M. Marchand, T. Dorval, V. Brichard, T. Boon, A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 10290–10295.
[21] V. Karanikas, C. Lurquin, D. Colau, N. van Baren, C. De Smet, B. Lethe, T. Connerotte, V. Corbiere, M.A. Demoitie, D. Lienard, B. Dreno, T. Velu, T. Boon, P.G. Coulie, Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus, J. Immunol. 171 (2003) 4898–4904.
[22] R.H. Vonderheide, W.C. Hahn, J.L. Schultze, L.M. Nadler, The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes, Immunity 10 (1999) 673–679.
[23] J. Arai, M. Yasukawa, H. Ohminami, M. Kakimoto, A. Hasegawa, S. Fujita, Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes, Blood 97 (2001) 2903–2907.
[24] R. Chiari, G. Hames, V. Stroobant, C. Texier, B. Maillère, T. Boon, P.G. Coulie, Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules, Cancer Res. 60 (2000) 4855–4863.
[25] C. Rubie, K. Kempf, J. Hans, T. Su, B. Tilton, T. Georg, B. Brittner, B. Ludwig, M. Schilling, Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues, Mol. Cell Probes 19 (2005) 101–109.
[26] C. Blanquicett, M.R. Johnson, M. Heslin, R.B. Diasio, Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies, Anal. Biochem. 303 (2002) 209–214.
[27] D.L. Morse, D. Carroll, L. Weberg, M.C. Borgstrom, J. Ranger-Moore, R.J. Gillies, Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, Anal. Biochem. 342 (2005) 69–77.
[28] A.B. Dydensborg, E. Herring, J. Auclair, E. Tremblay, J.F. Beaulieu, Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 290 (2006) G1067–G1074.
[29] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, Oncogene 22 (2003) 7265–7279.
[30] A. Montecucco, G. Biamonti, Cellular response to etoposide treatment, Cancer Lett. 252 (2007) 9–18.
[31] A.K. Nowak, R.A. Lake, B.W. Robinson, Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines? Adv. Drug. Deliv. Rev. 58 (2006) 975–990.
[32] R.A. Lake, R.G. van der Most, A better way for a cancer cell to die, N. Engl. J. Med. 354 (2006) 2503–2504.
[33] V.E. Velculescu, S.L. Madden, L. Zhang, A.E. Lash, J. Yu, C. Rago, A. Lal, C.J. Wang, G.A. Beaudry, K.M. Ciriello, B.P. Cook, M.R. Dufault, A.T. F erguson, Y. Gao, T.-C. He, H. Hermeking, S.K. Hiraldo, P.M. Hwang, M.A. L opez, H.F. Luderer, B. Mathews, J.M. Petroziello, K. Polyak, L. Zawel, W. Zhang, X. Zhang, W. Zhou, F.G. Haluska, J. Jen, S. Sukumar, G.M. Landes, G.J. Riggins, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Analysis of human transcriptomes, Nat. Genet. 23 (1999) 387–388.
[34] D.C. Altieri, Validating survivin as a cancer therapeutic target, Nat. Rev. Cancer 3 (2003) 46–54.
[35] M. Schmitz, P. Diestelkoetter, B. Weigle, F. Schmachtenberg, S. Stevanovic, D. Ockert, H.G. Rammensee, E.P. Rieber, Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides, Cancer Res. 60 (2000) 4845–4849.
[36] S. Reker, A. Meier, L. Holten-Andersen, I.M. Svane, J.C. Becker, P. thor Straten, M.H. Andersen, Identification of novel survivin-derived CTL epitopes, Cancer Biol. Ther. 3 (2004) 173–179.
[37] M.H. Andersen, R.B. Soerensen, J.C. Becker, P. thor Straten, HLA-A24 and survivin: possibilities in therapeutic vaccination against cancer, J. Transl. Med. 4 (2006) 38.
[38] T. Boon, P.G. Coulie, B.J. van den Eynde, P. van der Bruggen, Human T cell responses against melanoma, Annu. Rev. Immunol. 24 (2006) 175–208.
[39] C.M. Britten, C. Gouttefangeas, M.J. Welters, G. Pawelec, S. Koch, C. Ottensmeier, A. Mander, S. Walter, A. Paschen, J. Muller-Berghaus, I. Haas, A. Mackensen, T. Kollgaard, P. Thor Straten, M. Schmitt, K. Giannopoulos, R. Maier, H. Veelken, C. Bertinetti, A. Konur, C. Huber, S. Stevanovic, T. Wolfel, S.H. van der Burg, The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes by structural and functional assays, Cancer Immunol. Immunother. 57 (2007) 289–302.
[40] P. Romero, J.C. Cerottini, D.E. Speiser, Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination, Cancer Immunol. Immunother. 53 (2004) 249–255.
[41] M.H. Andersen, L.O. Pedersen, J.C. Becker, P. thor Straten, Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients, Cancer Res. 61 (2000) 869–872.
[42] S. Idenoue, Y. Hirohashi, T. Torigoe, Y. Sato, Y. Tamura, H. Hariu, M. Yamamoto, T. Kurotaki, T. Tsuruma, H. Asanuma, T. Kanaseki, H. Ikeda, K. Kashiwagi, M. Okazaki, K. Sasaki, T. Sato, T. Ohmura, F. Hata, K. Yamaguchi, K. Hirata, N. Sato, A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins, Clin. Cancer Res. 11 (2005) 1474–1482.
[43] T. Hanagiri, N. van Baren, B. Neyns, T. Boon, P.G. Coulie, Analysis of a rare melanoma patient with a spontaneous CTL response to a MAGE-A3 peptide presented by HLA-A1, Cancer Immunol. Immunother. 55 (2006) 178–184.
[44] M. Trakatelli, M. Toungouz, D. Blocklet, Y. Dodoo, L. Gordower, M. Laporte, P. Vereecken, F. Sales, L. Mortier, N. Mazouz, M. Lambermont, S. Goldman, P. Coulie, M. Goldman, T. Velu, A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients, Cancer Immunol. Immunother. 55 (2006) 469–474.
[45] T. So, T. Hanagiri, J. Chapiro, D. Colau, F. Brasseur, K. Yasumoto, T. Boon, P.G. Coulie, Lack of tumor recognition by cytolytic T lymphocyte clones recognizing peptide 195–203 encoded by gene MAGE-A3 and presented by HLA-A24 molecules, Cancer Immunol. Immunother. 56 (2007) 259–269.
[46] C. Casati, P. Dalerba, L. Rivoltini, G. Gallino, P. Deho, F. Rini, F. Belli, D. Mezzanzanica, A. Costa, S. Andreola, E. Leo, G. Parmiani, C. Castelli, The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients, Cancer Res. 63 (2003) 4507–4515.
[47] S.R. Scheffer, H. Nave, F. Korangy, K. Schlote, R. Pabst, E.M. Jaffee, M.P. Manns, T.F. Greten, Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo, Int. J. Cancer 103 (2003) 205–211.
[48] P. Correale, M.G. Cusi, K.Y. Tsang, M.T. Del Vecchio, S. Marsili, M.L. Placa, C. Intrivici, A. Aquino, L. Micheli, C. Nencini, F. Ferrari, G. Giorgi, E. Bonmassar, G. Francini, Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients, J. Clin. Oncol. 23 (2005) 8950–8958.
[49] A.K. Nowak, R.A. Lake, A.L. Marzo, B. Scott, W.R. Heath, E.J. Collins, J.A. Frelinger, B.W. Robinson, Induction of tumor cell

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells, J. Immunol. 170 (2003) 4905–4913.
[50] D. Valmori, M. Ayyoub, Using modified antigenic sequences to develop cancer vaccines: are we losing the focus? PLoS. Med. 1 (2004) e26.
[51] M.M. Bachinsky, D.E. Guillen, S.R. Patel, J. Singleton, C. Chen, D.A. S oltis, L.G. Tussey, Mapping and binding analysis of peptides derived from the tumor-associated antigen survivin for eight HLA alleles, Cancer Immun. 5 (2005) 6.
[52] M. Piesche, Y. Hildebrandt, F. Zettl, B. Chapuy, M. Schmitz, G. Wulf, L. Trümper, R. Schroers, Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin, Hum. Immunol. 68 (2007) 572–576.
[53] S.R. Hadrup, J. Gehl, R.B. Sørensen, P.F. Geertsen, P.T. Straten, M.H. Andersen, Persistence of survivin specific T cells for seven years in a melanoma patient during complete remission, Cancer Biol. Ther. 5 (2006) 480–482.
[54] S. Reker, J.C. Becker, I.M. Svane, E. Ralfkiaer, P.T. Straten, M.H. Andersen, HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients, Int. J. Cancer 108 (2004) 937–941.
[55] S. Siegel, J. Steinmann, N. Schmitz, R. Stuhlmann, P. Dreger, M. Zeis, Identification of a survivin-derived peptide that induces HLA-A*0201-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes, Leukemia 18 (2004) 2046–2047.
[56] A.L. Marzo, K.D. Klonowski, A. Le Bon, P. Borrow, D.F. Tough, L. Lefrançois, Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment, Nat. Immunol. 6 (2005) 790–793.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Immunology and Cell Biology (2010) 0, 1–11
© 2010 Australasian Society for Immunology Inc. All rights reserved 0818-9641/10 $32.00
www.nature.com/icb

ORIGINAL ARTICLE

Naturally occurring tumor-specific CD8+ T-cell precursors in individuals with and without cancer

Vaios Karanikas[1], Maria Zamanakou[1], Faye Soukou[1], Theodora Kerenidi[2], Konstantinos I Gourgoulianis[2] and Anastasios E Germenis[1]

Boosting pre-existing, naturally occurring cytolytic CD8+ T-cell (CTLs) responses directed against class-I MHC-restricted peptides of tumor antigens, represents a primary goal of cancer immunotherapy. The number of pre-existing antitumor CTLs and their impaired function has been incriminated as the most likely candidates for the reduced clinical efficacy of these trials. This study was scheduled to determine possible differences in the frequency and the function of naturally occurring CTL precursors (pCTLs) against multiple peptides derived from the cancer-testis antigens MAGE-A1 and MAGE-A3, and the overexpressed antigen hTERT, in newly diagnosed lung cancer patients as compared with aged-matched healthy individuals. The cumulative frequency of circulating peptide-specific pCTLs was found significantly higher in the cancer patients, varied widely and was not affected by radiotherapy and chemotherapy. Furthermore, this frequency was greatly different between the various tumor-antigen peptides. Under the light of recent evidence provided from animal models, these results indicate that the peptide-specific pCTL frequency might represent an important determinant for the fate of cancer immunotherapy. In addition, our results show that tumor-specific pCTLs of cancer patients can present functional differences regarding their proliferative capacity, intensity of multimer staining and lytic capacity, when compared with those of healthy individuals. Hence, our findings could have an important role for the design of improved immunotherapeutic approaches for lung cancer.
Immunology and Cell Biology (2010) **0,** 000–000. doi:10.1038/icb.2010.8

Keywords: HLA-multimers; peptide-specific CD8+ T-cells; tumor antigens; precursor frequency

UNCORRECTED PROOF

Boosting pre-existing, naturally occurring cytolytic CD8+ T-cell (CTL) responses directed against class-I major histocompatibility complex (MHC)-restricted peptides of tumor antigens, represents a primary goal of cancer immunotherapy. These CTLs, recognizing several tumor antigens, show *in vitro* a clear ability to lyse tumor cells expressing such molecules. However, the clinical effectiveness of active immunotherapy approaches using these antigens remains rather low, with tumor regressions appearing rarely and sporadically.[1] The underlying reasons of this ineffectiveness continue to be obscure, despite the great progress made over the last decade in understanding several aspects of the antitumor cytolytic T-cell response. The number of pre-existing antitumor CTLs has been incriminated as one of the most likely candidates, although evidence toward this supposition was not convincing. Very recently, however, Rizzuto *et al.*[2] showed quite elegantly that the frequency of pre-existing tumor-antigen-specific CTL precursors (pCTL) in mice represents a critical determinant of the quality of the antitumor immune response, in accordance with the already recognized role that initial T-cell numbers have in the response against pathogens.[3,4]

The detection of pre-existing antitumor specific CTL responses in cancer patients is currently used in the context of evaluating tumor antigens as potential candidates for vaccination.[5–7] The magnitude of these responses is also measured in an attempt to exclude patients with undetectable pre-existing responses from immunotherapy trials,[8–10] or, in the majority of cases, to ascertain comparatively their post-vaccination increase.[11,12] Surprisingly, however, no studies have attempted to correlate the initial antitumor pCTL number with the outcome of vaccination. Furthermore and despite the significant volume of information provided, the data of all these studies regarding the exact frequency of naturally occurring antitumor pCTLs in cancer patients, are not comparable. The main reason for this, is the lack of standardized measurement techniques, although precise analysis has been performed in a limited number of cases.[11,13–16] As a result, informative data about the frequency of pre-existing, naturally occurring antitumor specific CTLs in cancer patients, are practically lacking from the literature. Therefore, it remains questionable whether the distribution of the initial antitumor pCTLs frequency levels varies widely enough to justify the design of studies aiming to

[1]Cancer Immunology Unit, Department of Immunology & Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece and [2]Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, Larissa, Greece
Correspondence: Professor V Karanikas, Cancer Immunology Unit, Department of Immunology & Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa 41110, Greece.
E-mail: vkaran@med.uth.gr
Received 23 October 2009; revised 11 December 2009; accepted 5 January 2010

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

evaluate whether this frequency can affect the outcome of anti-cancer vaccination. In the same context and under the light of the simultaneous use of multiple tumor-antigen peptides in several vaccination trials, it remains completely unknown whether, in a given patient, pre-existing CTL responses of similar strength could be elicited against all peptides.

Therefore, this study was performed in an attempt to detect concomitantly, in the peripheral blood of a large cohort of newly diagnosed lung cancer patients, the distribution of the number of pre-existing CTLs specific for peptides of the cancer-testis antigens MAGE-A1 and MAGE-A3, and the overexpressed antigen human telomerase reverse transcriptase (hTERT), which are amongst the most widely used for vaccination of such patients.[17–19] Where possible, these measurements were also performed in tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) of the same patients. To this aim, a sensitive approach combining human leukocyte antigen (HLA)-multimer flow cytometric technology with a previous step of *in vitro* amplification with multiple peptides under limiting dilution conditions was used.[15] Bearing in mind that antitumor pCTLs do exist in non-cancerous individuals, although their precise measurement has been rarely attempted,[7,13,15,20,21] an additional aim of the study was to compare the number of initial pCTL levels against the above peptides detected in cancer patients, with those of normal healthy individuals of the same age.

Accumulating evidence during the last years indicates that radiotherapy and some chemotherapeutic agents can augment specific immune responses, offering the rationale for combined chemo-immunotherapy.[22–24] Therefore, the pCTL frequency was determined in a subset of our patients after they had been submitted to conventional radiotherapy and/or chemotherapy. Finally, to uncover possible differences existing between pCTLs from cancer patients and healthy individuals, specific CTL clones were isolated and their functional characteristics and clonotypic variation were determined (Table 1).

Table 1 Characteristics of patients[a] and normal controls included in the study

	NSCLC (n=15)	*SCLC (n=10)*	*Controls (n=17)*
Age			
Range	43–81	54–74	51–73
Mean ± 1 s.d.	65.2 ± 9.9	65.8 ± 7.9	61.3 ± 5.0
Sex (male/female)	11/4	9/1	12/5
Stage			
I	6	0	
II	3	3	
III	5	4	
IV	1	3	
Performance[b]			
0	12	7	
1	3	2	
2	0	1	
Loss of weight			
<5%	13	5	
⩾5%	2	5	
Overall median			
Survival (days)	921	389	
Range	651–1162	66–1021	

Abbreviations: NSCLC, non-small cell lung carcinoma; SCLC, small cell lung carcinoma.
[a]Patients were grouped according to the histotype.
[b]ECOG performance status.

RESULTS

Frequency of peptide-specific pCTLs in lung cancer patients and healthy subjects

Tables 2 and 3 present the frequency of pCTLs specific against peptides of MAGE-A1, MAGE-A3 and hTERT estimated in lung cancer patients and healthy subjects, respectively, along with the number of $CD8^+$ cells tested, the number of mixed lymphocyte-peptide cultures (MLPCs) performed and the number of MLPCs containing a multimer-positive population. Only MLPC for which specificity was ascertained as described under section Methods and a clear multimer-positive population could be detected (Figure 1), were included. In both tables, frequencies presented as 'less than' (<) the indicated value, are shown only to indicate that those individuals did not dispose pCTLs in higher frequencies. As this limit was dependent on the $CD8^+$ T-cell number obtained from each individual and varied among pCTLs specific for individual peptides, it was not considered as the threshold of the method. Consequently, such corresponding frequencies were not included in any additional statistical analysis.

Among the three hTERT, two MAGE-A1 and four MAGE-A3 peptides used, $CD8^+$ T-cell responses were detected upon diagnosis in various proportions of patients, only against the hTERT-ILA.A2, MAGE-A3.A2, MAGE-A3.A24, hTERT.A24 and MAGE-A3.B35 peptides, that is, in 6/14 (43%), 5/14 (36%), 4/9 (44%), 2/10 (20%) and 1/6 (17%) patients, respectively, in widely varying frequencies (Figure 2). Accordingly, normal subjects presented with $CD8^+$ T-cell responses only against three of the peptides recognized by patients, namely hTERT-ILA.A2, MAGE-A3.A2 and hTERT.A24, and in addition against MAGE-A3.A1. The proportions of healthy subjects recognizing these peptides were 4/9 (44%), 5/8 (63%), 1/6 (17%) and 1/6 (17%), respectively (Figure 2). There was no statistically significant difference between the proportion of patients and normal individuals recognizing each one of the commonly recognized peptides.

Interestingly, however, the cumulative peptide-specific pCTL frequencies observed in lung cancer patients ($17.2 \pm 21.7 \times 10^{-7}$ peripheral $CD8^+$ T-cells, range $1.4–80.0 \times 10^{-7}$) were statistically significantly higher ($P=0.028$) than those detected in healthy age-matched controls ($2.2 \pm 1.3 \times 10^{-7}$ peripheral $CD8^+$ T-cells, range $1.0–4.6 \times 10^{-7}$), as shown in Figure 3a. No significant difference was observed in the pCTL frequency between patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and those with small cell lung carcinoma (SCLC) ($P>0.05$). It must be noted that, in patients where responses against peptides of multiple tumor-antigens (MAGE-A3 and hTERT) were concomitantly examined, the pCTL frequencies against each one of them appeared quite different than the other (for example, patient no. 11 presented with a pCTL frequency against hTERT-ILA.A2 of 42×10^{-7} peripheral $CD8^+$ T-cells, but with a pCTL frequency against MAGE-A3.A2 of $<3.3 \times 10^{-7}$ peripheral $CD8^+$ T-cells).

No pCTL was detected in the TILs against any of the tumor peptides of six patients with NSCLC (patient nos. 7–9 and 13–15) (data not shown) despite the tumor expressing either one or more of the antigens tested. Furthermore patient nos. 9 and 13 contained pCTL specific for BMLF1.A2 at very high frequencies. Among all six patients, however, only one (patient no. 9) presented with anti-hTERT-ILA.A2 and anti-MAGE-A3.A2 pCTLs detected in peripheral blood.

Despite the limited number of samples, the frequency of pCTLs appeared to be unrelated to the mRNA expression of the corresponding antigens in the tumor tissues of 50% of NSCLC patients (Table 2).

In the process of determining the pCTL frequencies in the peripheral blood, we collected and evaluated flow cytometric data obtained from the analysis of each individual MLPCs. Interestingly, the mean percentage of multimer-positive $CD8^+$ T-cells inside the positive

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Table 2 Frequencies of circulating pCTLs specific for peptides of hTERT and MAGE3 detected in cancer patients (1–15 NSCLC, 16–25 SCLC) upon diagnosis and antigen expression in resected tumor material

Patient	*HLA*	*CD8*[a]	*MLPCs tested*	*hTERT-ILA.A2*		*hTERT.A24*		*MAGE-A3.A2*		*MAGE-A3.A24*		*MAGE-A3.B35*		*Expression*[b]		
				+ve MLPCs	f[c]	*+ve MLPCs*	f	*+ve MLPCs*	f	*+ve MLPCs*	f	*+ve MLPCs*	f	*hTERT*	*MAGE-A1*	*MAGE-A3*
1	A02, 24, B35	1.4	76	0	<7.4	0	<7.4	0	<7.4	1	7.4					
2	A02	6.5	192	0	<3.6			0	<2.6							
3	A24, B35	10.3	171			0	<1.0			0	<1.0					
4	A24, 24	2.8	93			1	3.6			0	<3.6					
5	A02	3.8	272	3	7.8			0	<2.6							
6	A02	6.6	184	0	<1.5			0	<1.5							
7	A24, B35	2.3	127			0	<4.2					0	<4.2	21.5	<1	<1
8	A01, B35	8.1	208									0	<1.2	17.8	<1	65.2
9	A02	3.5	160	1	2.6			2	5.8					20.1	<1	<1
10	A02, B35	1.6	88	0	<6.3			0	<6.3			0	<6.3	<1	<1	85.6
11	A02, B35	2.8	106	12	42.0			0	<3.5			0	<3.5			
12	A02	1.5	77	1	6.3			11	70.0					21.3	108.2	74.7
13	A02, 24	2.7	104	0	<3.7	0	<3.7	0	<3.7	0	<3.7			15.0	<1	<1
14	A24	0.5	23			0	<18			0	<18			33.8	77.7	122.0
15	A01, B35	3.4	89									0	<3.0	15.0	<1	<1
16	A24, 24	1.7	76			0	<6.0			1	6.0					
17	A02, 02	1.6	98	1	6.4			1	6.4							
18	A24	7.3	260			0	<1.4			1	1.4					
19	A24, B35	3.4	156			1	2.9			2	5.6					
20	A02	3.8	192	0	<2.6			0	<2.6							
21	A24	2.9	160			0	<3.4			0	<3.4					
22	A02	2.0	91	0	<5.2			0	<5.2							
23	A01, 02	4.9	204	0	<2			7	14.0							
24	B35	1.5	192									1	6.0			
25	A02	2.0	168	2	9.9			3	15.0							

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; MLPC, mixed lymphocyte-peptide culture.
[a]Million CD8 tested.
[b]The expression levels for hTERT, MAGE-A1 and MAGE-A3 were determined as described previously[51] and expressed as a percentage of expression levels by a testis sample; see text for the explanation of '<' and the abbreviations of the peptides.
[c]*f*: Frequency of pCTLs specific for the given peptide per 10^7 peripheral blood CD8 (not determined and remained blank when subjects did not express the corresponding HLA-A, HLA-B molecule).

Table 3 Frequencies of circulating pCTLs specific for hTERT and MAGE-A3 peptides detected in normal individuals

Subject	*HLA*	*CD8*[a]	*MLPCs tested*	*hTERT-ILA.A2*		*hTERT.A24*		*MAGE-A3.A1*		*MAGE-A3.A2*	
				+ve MLPCs	f[b]	*+ve MLPCs*	f	*+ve MLPCs*	f	*+ve MLPCs*	f
1	A24, B35	4.3	255			0	<2.3				
2	A02	3.8	188	1	2.6						
3	A01	8.6	240					1	1.0		
4	A01, 02	24.3	379	0	<0.4			0	<0.4	0	<0.4
5	A02	5.0	208	1	2.0					1	2.0
6	A02	8.4	192	1	1.0					2	3.6
7	A01	5.5	231					0	<2.0		
8	A01, 24	6.4	248			1	1.6	0	<1.6		
9	A02	8.7	243	0	<1.2					1	1.2
10	A2, A24, B35	2.5	176	0	<2.3	0	<2.3			0	<2.3
11	A01, A24	3.7	232			0	<2.7	0	<2.7		
12	A01	5.0	179					0	<2.0		
13	A02, B35	7.2	240	1	1.4					0	<1.4
14	A02	20.2	253	0	<0.5					4	2.0
15	A24, B35	1.0	91			0	<2.8				
16	A24, B35	4.6	246			0	<2.2				
17	A02	9.3	232	0	<1.0					1	1.0

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; MLPC, mixed lymphocyte-peptide culture.
[a]Million CD8 tested.
[b]The frequency of pCTLs specific for the given peptide per 10^7 peripheral blood $CD8^+$ T-cells (not determined and remained blank when subjects did not express the corresponding HLA-A, HLA-B molecule); see text for the explanation of '<' and the abbreviations of the peptides.

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

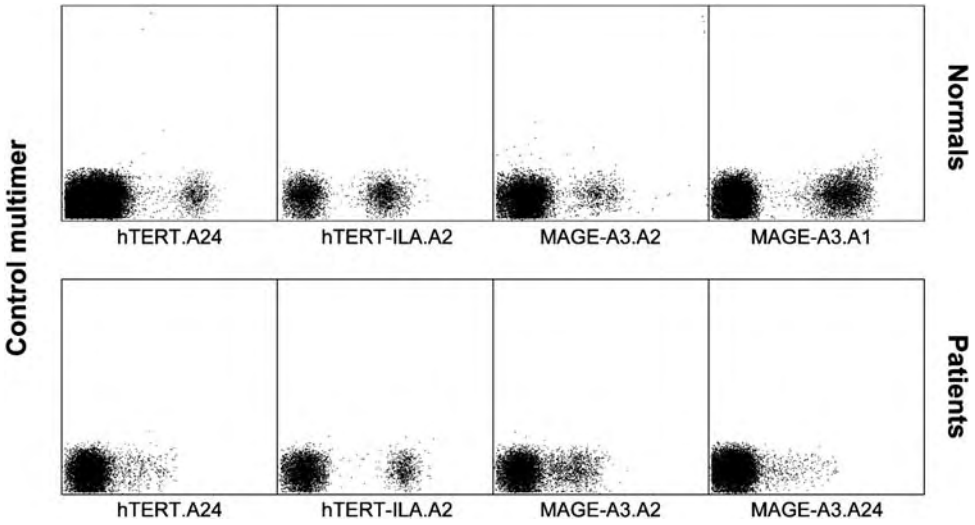


Figure 1 Representative multimer-positive plots. MLPC were stained as described under section Methods with control multimers labeled with allophycocyanin and multimers containing the peptide of interest labeled with PE, following exclusion of irrelevant binding events.[15] The plots represent live $CD8^+$ cells. MLPC, mixed lymphocyte-peptide culture; PE, phycoerythrin.

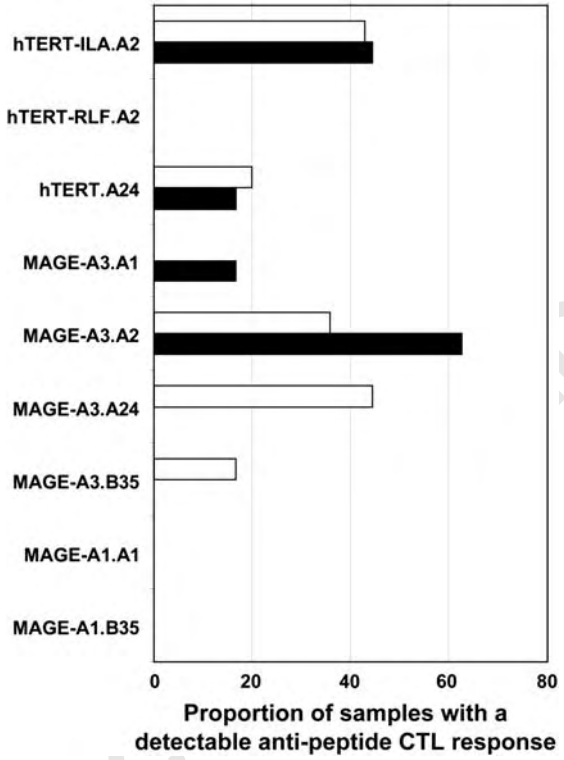


Figure 2 Proportion of patients upon diagnosis (white bars) and normal subjects (black bars) with a detectable peptide-specific CTL response. Peptides are described under section Methods. CTL, cytolytic $CD8^+$ T-cell.

MLPCs was found to be significantly higher (P=0.030) in healthy subjects (6.5 ± 7.9%, range 0.2–30.0%) than in lung cancer patients (1.5 ± 2.1%, range 0.1–9.1%) (Figure 3b), indicating a decreased proliferation rate of the peptide-specific pCTLs in the later. Similarly, the mean fluorescence intensity of the HLA-multimers was significantly higher (P=0.023) in healthy subjects (10.6 ± 8.2, range 2-29) than in patients (4.8 ± 3.8, range 2–27) (Figure 3c), suggesting a difference in the kinetics of interaction between T-cell receptor (TcR) and multimer complexes.[25] A correlation of marginal significance was observed between the percentage of multimer$^+$$CD8^+$ and the multimer mean fluorescence intensity within the patient group (r=0.280, P=0.046) but not in normal subjects (r=0.075, P=0.790).

Effect of treatment on pCTL frequency

Various anticancer treatment modalities affect the tumor-antigenic load; surgery alone removes a tremendous amount of tumor antigens whereas, on the contrary, radio- and chemotherapy-induced apoptosis of cancer cells results in enhanced antigenic load. To investigate whether such expected changes affect the cytolytic antitumor response, the post-treatment frequencies of antitumor pCTLs was examined in 16 out of 25 lung cancer patients for whom the corresponding frequencies had been detected at diagnosis. Alterations in the peptide-specific circulating pCTL frequencies were detected in 12 out of 16 patients (Table 4). However, among these alterations, only those detected in SCLC patient nos. 23 and 25 can be considered interesting as at least threefold but contrasted changes were observed. It is noteworthy that the changes presented by the first of these patients regarding the responses against two different peptides, were also contrasted, that is, elevation of the anti-hTERT-ILA.A2 pCTL frequency paralleled by a concomitant reduction in the anti-MAGE-A3.A2 pCTL frequency. NSCLC patients who underwent surgery only (patient nos. 9–12) presented with no significant alterations in the pCTL frequencies detected 6 months after surgery. For the NSCLC patients for whom a tumor sample could be obtained (patient nos. 9, 10, 12), antigen expression appeared unrelated to the strength of CTL response. Finally, no association was observed between any clinicopathological parameter and presence of pCTL (data not shown).

Characterization of anti-tumor specific CD8+ T-cell clones

Twenty-seven positive MLPCs were used for obtaining peptide-specific $CD8^+$ T-cell clones. Variation in the proliferation rate and the cloning efficiency of the individual clones necessitated several attempts for each MLPC. Finally, we were successful in obtaining five clones from normal individuals and five from lung cancer patients, capable of being expanded to sufficient numbers for additional analysis.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

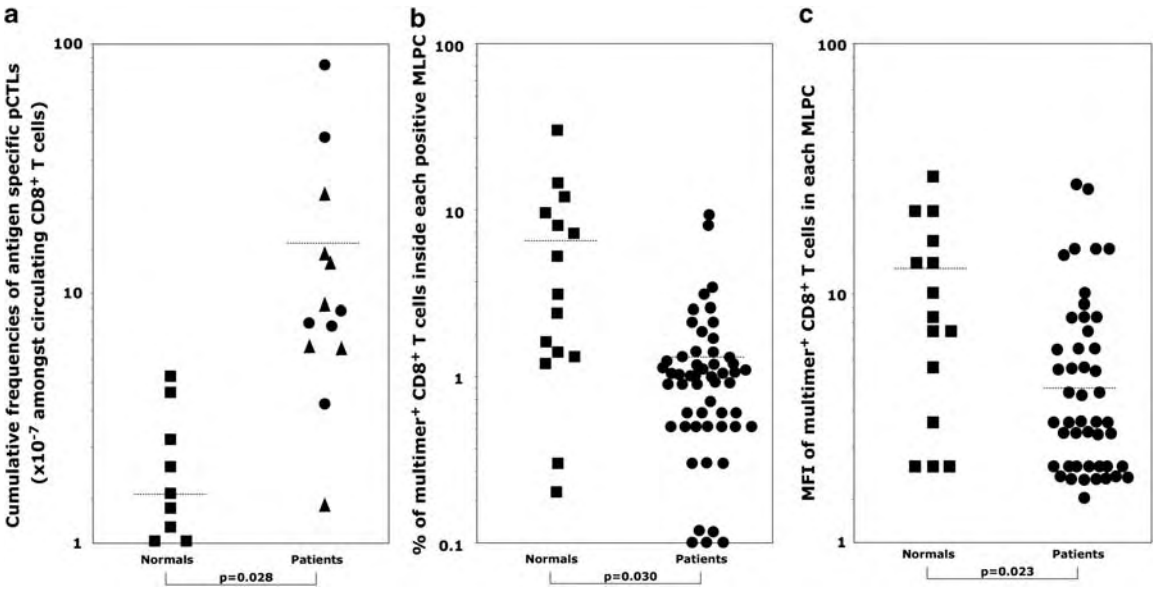


Figure 3 The frequencies and flow cytometric characteristics of circulating antitumor specific pCTL of patients with lung cancer and normal healthy individuals. (**a**) Cumulative frequencies of pCTLs ($\times 10^{-7}$ peripheral $CD8^+$ T-cells) directed against all the tumor-antigen peptides in normal healthy individuals (■) and patients with NSCLC (●) and SCLC (▲). (**b**) Percentage of multimer-positive $CD8^+$ T-cells inside each positive MLPC detected in normal individuals (■) and patients with lung cancer (●). (**c**) The mean fluorescence intensity of HLA-multimers in normal individuals (■) and patients with lung cancer (●) inside the positive MLPCs. The dotted line represents mean value for each group. MLPC, mixed lymphocyte-peptide culture; pCTL, CTL precursor.

Table 4 Previous and post-therapy frequencies of circulating pCTLs specific for hTERT and MAGE peptides detected in patients with lung cancer (patients for whom no CTL responses have been detected, are not presented)

Patients	*Peptide*	*pCTL frequencies*[a]	
		Pre-treatment	*Post-treatment*
1	MAGE-A3.A24	7.4	<3
4	hTERT.A24	3.6	<2.9
8	MAGE-A3.A1	<1.2	1.6
8	MAGE-A3.B35	<1.2	1.6
9	hTERT-ILA.A2	2.6	4.4
9	MAGE-A3.A2	5.8	4.4
10	MAGE-A1.B35	<6.3	1.7
11	hTERT-ILA.A2	42.0	37.0
12	hTERT-ILA.A2	6.3	<5.0
12	MAGE-A3.A2	70.0	75.0
16	MAGE-A3.A24	6.0	<7.3
18	MAGE-A3.A24	1.4	<3.3
23	hTERT-ILA.A2	<2.0	6.9
23	MAGE-A3.A2	14.0	3.4
24	MAGE-A3.B35	6.0	<3.5
25	hTERT-ILA.A2	9.9	<3.0
25	MAGE-A3.A2	15.0	<3.0

Abbreviations: hTERT, human telomerase reverse transcriptase; pCTL, CTL precursor.
1, 4 and 8: NSCLC patients submitted to surgery and who received radio- and chemotherapy as well. 9–12: NSCLC patients underwent only surgery. 16 and 23: SCLC patients who received radio- and chemotherapy. 18, 24 and 25: SCLC patients who received only chemotherapy.
[a]The frequency of pCTLs specific for the given peptide per 10^7 peripheral blood $CD8^+$ T-cells (not determined and remained blank when subjects did not express the corresponding HLA-A, HLA-B molecule); see text for the explanation of '<' and the abbreviations of the peptides.

First, the lytic capacity of each one of the isolated clones was assessed. The clones were capable of recognizing and killing tumor cells expressing MAGE-A3 and hTERT to various levels, albeit this recognition was enhanced when the relevant peptides were added on the targets (Figures 4a–c, upper panels). Lysis by MAGE-A3.A2 clones was weaker but yet considerable (Figure 4b, clone A102, 27% lysis at E:T=30:1). Conversely, hTERT-ILA.A2-specific clones hardly recognized non-pulsed tumor cells but did so when peptide was added. All clones could recognize and kill strongly, Epstein–Barr virus (EBV)-B targets pulsed only with the relevant peptides and not control ones (Figures 4a–c, lower panels).

The lytic values of all clones were compared at an effector:target ratio of 10:1 that is normally used to compare cytolytic clones with regard to their lytic capacity. Interestingly, clones derived from healthy individuals appeared to lyse targets significantly stronger than the clones of patients (P=0.01) (Figure 4d). This difference did not appear to be related to the peptide recognized by either clone. Although the number of clones tested was limited for each group (5 per group), the lytic values were consistently similar every time each clone was tested (n=3). The avidities of the T-cell clones were determined by incubating EBV-transformed B (EBV-B)-cells with increasing amounts of the relevant peptides (Figure 4e). The concentrations of peptide required to obtain 50% maximal lysis were similar for patients and healthy individuals, ranging between 0.5 and 20 nM. We concluded that patients and healthy individuals contained pCTL with similar avidity.

In exploring further whether clones derived from patients or normal individuals differed, we examined if they could secrete interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, IL-17, interferon-γ and tumor necrosis factor-α under peptide-specific stimulation (Figure 5a). Upon incubation with EBV-B cells pulsed with the relevant peptide (and in some instances tumor cells), all clones could secrete significant levels

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

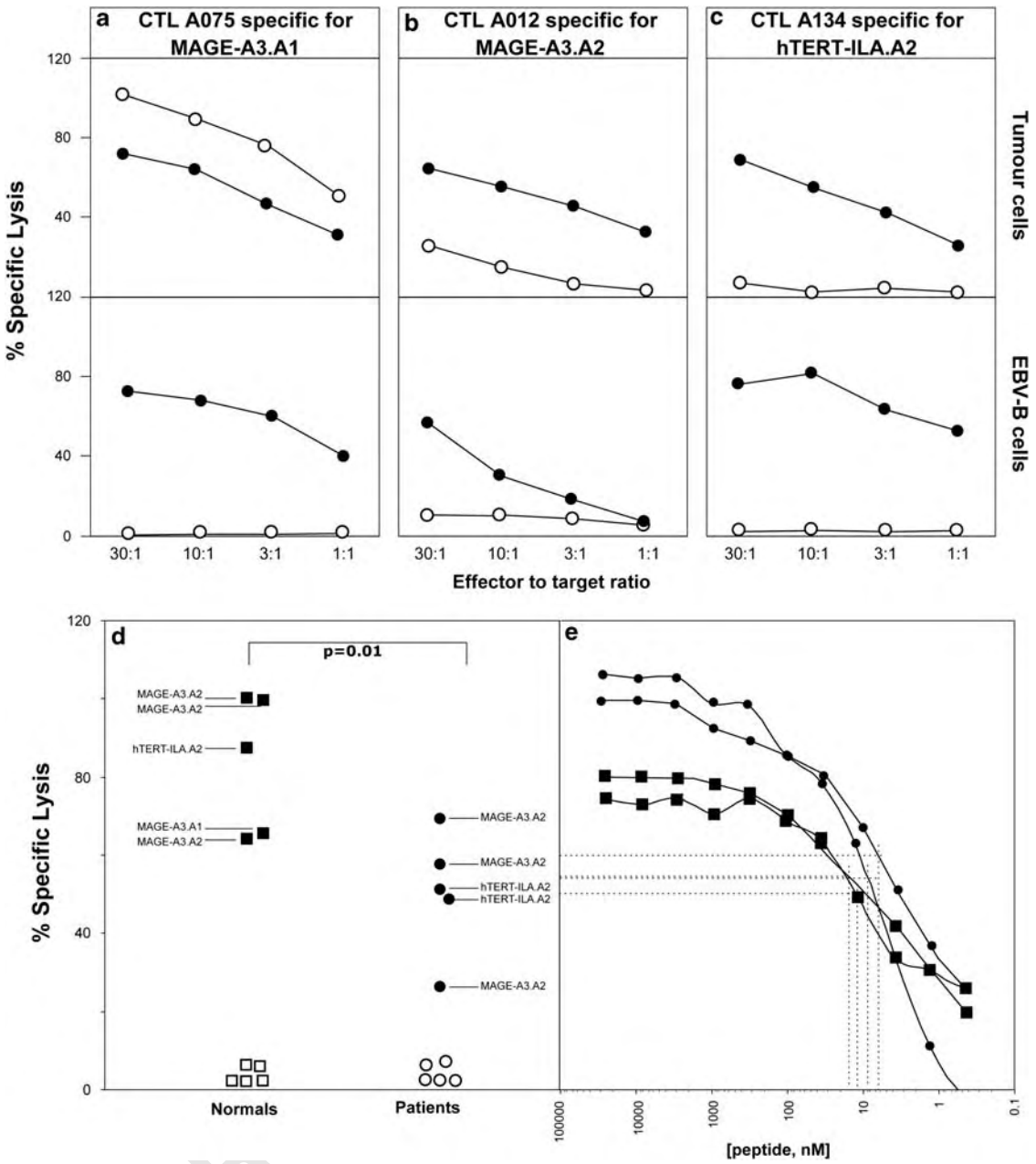


Figure 4 Characterization of the lytic capability of antitumor specific CTL clones. Percent specific lysis of representative clones: anti-MAGE-A3.A1 CTL clone A075 isolated from normal individual no. 3 (**a**); anti-MAGE-A3.A2 CTL clone A012 isolated from patient no. 12 (**b**) and anti-hTERT-ILA.A2 CTL clone A134 isolated from normal individual no. 6 (**c**). All clones in panels **a**–**c** recognized ^{51}Cr-labeled cells loaded with (●) (2.5 μg ml^{-1}ml) or without (○) the relevant peptide (upper panel: tumor cells EB81; lower panel: EBV-B cells). (**d**) Overall specific lysis for all clones isolated from normal individuals (squares) of clones obtained from patients with lung cancer (circles) at an effector:target cell ratio of 10:1 against EBV-B cells loaded with 2.5 μg ml^{-1} relevant peptide (filled symbol) or not (open symbol). The relevant HLA/peptides is indicated for the target loaded with peptide. Each experiment was repeated three times. (**e**) Representative peptide titration curves of anti-MAGE-A3.A2 CTL clones from patients (■) and normal subjects (●) indicating functional avidity against the MAGE-A3.A2 peptide by measuring specific maximal lysis against EBV-B cells loaded with indicated concentrations of peptide. The CTL to target ratio was 10:1. The dotted lines represent peptide concentrations required to obtain 50% maximal lysis of the target cells. Each experiment was repeated twice. CTL, cytolytic CD8$^+$ T-cell; EBV-B, EBV-transformed B- cell; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; HLA, human leukocyte antigen.

of IL-2, IL-4 and IL-5, but their levels did not have any difference between clones derived from patients and normal individuals. Non-pulsed EBV-B cells or EBV-B cells pulsed with a control peptide (BMLF1.A2 or PB1.A1), as well as cells pulsed with a peptide presented by an irrelevant HLA, were not recognized by either clone. To ascertain further the ability of the clones to respond to antigenic stimulus, cytokines were also detected following an intracellular cytokine assay (Figure 5b). All clones were capable of secreting interferon-γ, IL-2 and IL-4 but not IL-10, upon stimulation with the relevant peptides, ensuring the specificity of the cytokine secretion.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

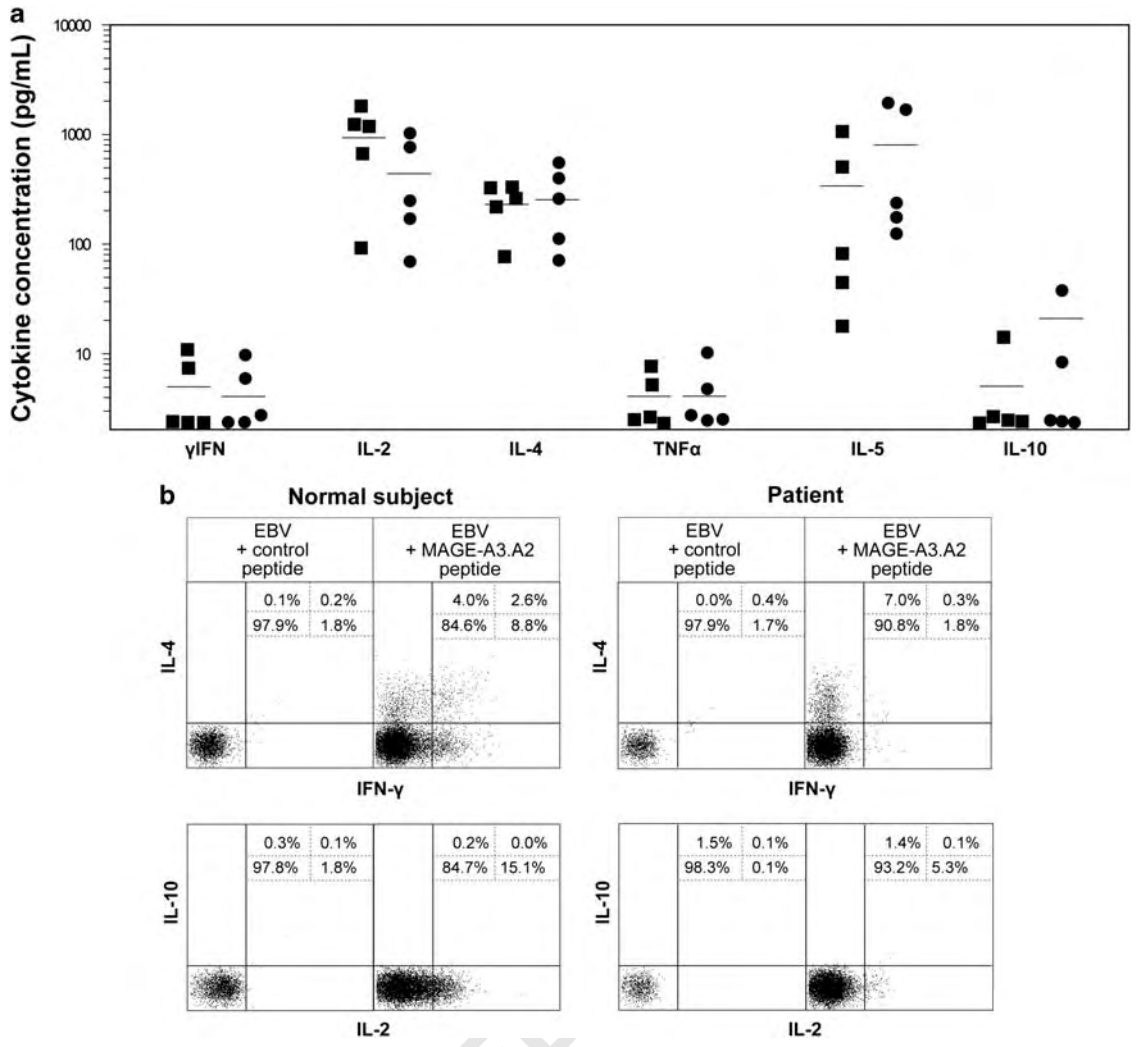


Figure 5 Functional characterization of antitumor specific CTL clones. (**a**) Production of cytokines by isolated CTL clones from normal subjects (■) and cancer patients (●) following peptide-specific stimulation. The results are mean from two independent experiments for each CTL clone. The lines represent the mean cytokine concentration. (**b**) Representative cytokine secretion profiles (repeated twice) of isolated CTL clones from a normal subject or a patient, following stimulation with EBV cells loaded with 2.5 μg ml^{-1}ml of MAGE-A3.A2 peptide or an irrelevant peptide. The indicated percentages refer to cytokine-positive CD8$^+$ cells. CTL, cytolytic CD8$^+$ T-cell.

Finally, all clones expressed CD45RO but not CD28, CD57 and CCR7 (data not shown).

The Vβ TcR repertoire of the isolated clones was analyzed using a panel of Vβ oligonucleotides covering virtually 100% of the TcR repertoire. Clones displayed a large Vβ repertoire in line with studies reporting the heterogeneity of antitumor peptide-specific T-cell clones (data not shown). Both patients and healthy individuals were found to rearrange many distinct Vβ gene segments and no evident constraints on CDR3β size or sequence, nor on Jβ usage, were apparent. All cancer patients and healthy subjects examined presented with an oligoclonal T-cell response (data not shown). For instance, in one patient (no. 23 in Table 2), of the seven MLPCs identified against MAGE-A3.A2 upon diagnosis, clones with three different TcR sequences were found appearing thrice on two occasions and once in another. After treatment, only one TcR sequence could be identified. In another patient (no. 12 in Table 2), upon diagnosis a similar oligoclonal profile was identified against MAGE-A3.A2, giving rise to two TcR clonotypes appearing nine times for one type and two for the other.

DISCUSSION

This study was undertaken in the light of the scarcity of definitive and consistent findings regarding the precise number of pre-existing, naturally occurring antitumor pCTLs and the emerging significance of the role that their frequency might have in the quality of the antitumor immune response.[2] Therefore, the frequency of circulating pCTLs specific for multiple MHC class-I-restricted peptides of hTERT, MAGE-A1 and MAGE-A3 was concomitantly measured in patients with NSCLC and SCLC and in age-matched healthy subjects. Clear evidence is provided, indicating that the proportion of cancer patients presenting with pre-existing cytolytic responses against the examined tumor-antigen peptides (regardless of their frequency) is as high as about 50%, similar to that of healthy subjects. This proportion of positive individuals could only be detected following the application of a sensitive detection method enabling the measurement of what appears as rather rare tumor-specific pCTLs, at frequencies about 100 times lesser than those previously reported.[26]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Direct comparison of the frequencies of pCTLs against the tumor peptides used in this study with those reported in the literature cannot be easily performed as our methodological approach is not broadly used. In the few cases, however, where such an approach has been used, comparable results have been obtained against anti-MAGE-A3.A2 and anti-MAGE-A3.A24-specific pCTL responses,[14,16] but rather lower than those reported against other tumor antigens, like Melan-A or tyrosinase.[19,27] With respect to the MAGE-A3.B35, MAGE-A1.B35 and hTERT-RLF.A2 peptides, this is the first time that estimation of CTL responses against them have been measured. Our data suggest that these responses are very rare and weak in both cancer patients and healthy subjects, questioning their utility in cancer vaccination.

Regarding the CTL responses against various peptides, it appears that cancer patients could respond strongly against one peptide and at the same time have a negligible response against another presented by the same HLA molecule irrespectively of the level of the corresponding tumor antigens expressed by the tumors. Hence, cancer patients might have different levels of tolerance against various tumor-antigen peptides, thus supporting the use of multi-epitope peptide-based anticancer vaccines.[28] In addition, although various tumor antigens can be frequently expressed by lung cancers,[29] detection of CTL against epitopes of these antigens represents a rare event.

Interestingly, the cumulative frequency of peptide-specific pCTLs in the cancer patients group was significantly higher but more widely varying than that in healthy controls. Tumor-specific pCTLs detected in the blood of normal individuals might represent autoreactive clones that have escaped thymic selection, and these become amplified in the cancer patients by the presence of tumors. The question that arises is whether these clones were equally derived from a naïve or memory subpopulation in both groups of individuals. Assuming the absence of tumor antigens in normal individuals, tumor-specific pCTLs might be considered as naïve cells that have homeostatically proliferated. Irrespective of their origin however, tumor-specific CTL clones have the potential to become reactive upon antigenic stimulus provided by emerging cancer cells and the presentation of antigens by tumors is expected to differentiate these clones into memory cells. As the only reliable method to detect these rare pCTLs is by amplifying them first *in vitro*, it was not feasible in our study to perform any direct assessment (for example, stain for CD45 and CCR7) to establish their memory status and determine their origin.[30–32]

It is rather intriguing that the difference in the cumulative frequency of peptide-specific pCTLs between cancer patients and healthy controls results from responses against peptides that are either poorly processed or not processed by tumor cells, that is, the hTERT-ILA.A2, MAGE-A3.A2 and MAGE-A3.A24 peptides.[16,21,33–35] A possible explanation could be that these peptides are cross-presented to T-cells following uptake and processing by the dendritic cell immunoproteasomes or conversely, the inflammatory tumor microenvironment could cause tumor cells to express immunoproteasomes and thus explain in part why with respect to these peptides there are conflicting data as to their capacity or not to be presented by tumor cells. Finally, the question that remains is that if these peptides do not become presented by the tumor cell, then what triggers the increase in the pCTL frequency seen in the patients as opposed to that of the normal healthy donors and what are the factors that have maintained these pCTL in the T-cell repertoire of the aged normal healthy donors?

Beyond differences observed in the specific pCTL frequency between cancer patients and healthy controls, pCTL clones derived from cancer patients appeared with a decreased proliferative capacity, intensity of multimer staining and lytic capacity. The reduced proliferative capacity, as evidenced by the decreased percentage of multimer-positive cells within patients' MLPCs, could be explained by replicative senescence.[31,36] Conversely, regulatory T-cells present in higher number in cancer patients, could play a detrimental role in inhibiting clonal T-cell proliferation and expansion.[37] However, we find the latter very unlikely as in a limited number of samples tested (n=4; 2 from patients and 2 from normal individuals), the number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ cells did not differ between MLPCs from normal individuals or patients, and no relation was identified between the presence of $Foxp3^+$ cells and the existence of tumor-specific pCTL in these samples (data not shown).

Regarding the higher intensity of multimer staining within each MLPC of normal individuals against those of patients, this might reflect a difference in the interaction kinetics between TcR and multimer complexes based on the sum of multiple TcR binding as well as the avidity of TcR-peptide MHC multimer taking place at biologically related temperatures.[25,38–41] Moreover, the strength of post-thymic CD8 TcR/peptide MHC avidity is crucial for a T-cell clone to compete *in vivo* for homeostatic growth.[42] Thus, as T-cell clones detected in both normal individuals and in cancer patients are directed against self-antigens, it is likely that with respect to the patients, antigenic encounter in the periphery could modulate the type and size of the T-cell pool,[43,44] allowing and/or limiting the window of effective signal transduction, giving rise to the dynamic propagation of clones with a low TcR avidity. Our data, albeit using a low number of clones, show decreased ability of CTL clones isolated from patients with cancer, to kill cells expressing the relevant antigen peptide despite an apparent similar capacity to recognize peptide on target cells. The latter might indicate that CD8 T-cells are continuously affected by the tumor microenvironment, thus modulating their ability to respond to antigenic stimulus.[44] Hence, patients might contain circulating pCTL clones with TcR affinities, in the low range, imposing in this way an effective antitumor immune response. To this end, the large repertoire of Vβ in patients and to a lesser extent in healthy individuals supports the heterogeneity of antitumor peptide-specific T-cell clones selected on the basis of poor tumor destruction.[45]

Radiotherapy and some chemotherapeutic agents can augment specific immune responses, opening up the way for combined chemo-immunotherapeutic applications.[22,23,46] Cisplatin is known to induce cell death through apoptosis or necrosis,[47] and apart from the delay or inhibition of tumor growth, its use was considered to generate immunogenic tumors. Hence, its use in experimental models followed by tumor antigen vaccination can lead to improved antitumor $CD8^+$ T-cell responses.[48] However, a precise measurement of this effect has not been undertaken in a human setting. Toward this, we examined whether radiotherapy and/or chemotherapy with cisplatin affected the levels of pCTL detected, but no alterations were observed in the pCTL frequency and in the number of peptides recognized in 16 of our patients tested at least 3 months after the completion of their treatment schedules. These findings place a caveat in extrapolating data from animal tumor model studies, as these cannot always accurately replicate the potentially immunosuppressive human tumor microenvironment.

In conclusion, our study uncovered that cancer patients present with a wide variation in the frequency of peptide-specific pCTLs and this frequency differs greatly between tumor-antigen peptides. In the light of recent evidence provided by animal models,[2] this result might represent an important determinant of the fate of cancer immunotherapy. Furthermore, our results show that tumor-specific pCTLs of cancer patients can have functional differences when compared with

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

those of healthy individuals. In addition, our findings regarding the effect of radiochemotherapy on the frequency of peptide-specific pCTLs, question the expected effectiveness of combined chemo-immunotherapy. Hence, our findings could have an important role for the design of improved immunotherapeutic approaches for lung cancer.

METHODS

Patients

Twenty-five HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24 and/or HLA-B35 patients with primary lung cancer were involved in the study. Fifteen of them were diagnosed with NSCLC (mean age 65.2 ± 9.9 years; 4 females, 11 males) and the remaining 10 with SCLC (mean age 65.8 ± 7.9 years; 1 female, 9 males) (Table 1). Peripheral blood was obtained on diagnosis of the disease from all patients and in 16 of them (10 with NSCLC and 6 with SCLC) after their treatment. Of those 16 patients, five with NSCLC underwent surgery as the only treatment and their post-treatment blood sample was collected 6 months later. From the remaining 5 NSCLC and the 6 SCLC patients, blood samples were obtained 3 months after the completion of various treatment regimens consisting of platinum-based chemotherapy and radiotherapy, as well as surgery in the case of NSCLC. In only eight NSCLC patients, resected tumor material was also obtained and tested for expression of hTERT, MAGE-A1 and MAGE-A3 as described previously, using a testis sample as reference material.[49] Peripheral blood was also obtained from 17 HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24 and/or HLA-B35 healthy individuals (mean age 61.3 ± 5.0 years; 5 females, 12 males). The study conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki and was reviewed and approved by the University of Thessaly Ethics Committee; all participants provided informed consent.

Peptides and HLA-multimers

Peptides of MAGE-A1, MAGE-A3 and hTERT were used on the basis of their ability to induce spontaneous CTL responses in cancer patients or normal individuals (http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm). The peptides used according to the HLA phenotype of the patient, were as follows: EADPTGHSY (MAGE-A1.A1 presented by HLA-A1), EADPTGHSY (MAGE-A1.B35 presented by HLA-B35), EVDPIGHLY (MAGE-A3.A1 presented by HLA-A1), FLWGPRALV (MAGE-A3.A2 presented by HLA-A2), TFPDLESEF (MAGE-A3.A24 presented by HLA-A24), EVDPIGHLY (MAGE-A3.B35 presented by HLA-B35), ILAKFLHWL (hTERT-ILA.A2 presented by HLA-A2), RLFFYRKSV (hTERT-RLF.A2 presented by HLA-A2) and VYAETKHFL (hTERT.A24 presented by HLA-A24). Two EBV peptides, GLCTLVAML (BMLF1.A2 presented by HLA-A2) and RYSIFFDYM (EBNA3C.A24 presented by HLA-A24), and the influenza virus peptide VSDGGPNLY (PB1.A1 binding to HLA-A1) were used as controls. All peptides were synthesized on solid phase using F-moc for transient NH_2-terminal protection, purchased as lyophilized at >90% purity ascertained by mass spectrometry (Abgent, San Diego, CA, USA), dissolved in dimethylsulfoxide at 10 mg ml^{-1} and stored at −20 °C before use.

Class-I HLA-multimers containing the MAGE-A1, MAGE-A3 and hTERT peptides and labeled with phycoerythrin (PE), as well as control multimers containing the EBV and influenza peptides and labeled with allophycocyanin, were prepared as described.[11,15]

Frequency of peptide-specific pCTLs

Peptide-specific pCTLs were detected in peripheral blood and TILs (TILs obtained as described)[50] using a sensitive methodological approach combining HLA-multimer flow cytometric technology with a previous step of *in vitro* amplification with multiple peptides under limiting dilution conditions. On the basis of the number of pCTLs detected in each sample, their frequencies in the peripheral blood and TILs were estimated by the use of Poisson distribution analysis for rare events. A detailed description of this methodology has been recently presented in our previous publication.[15]

In brief, isolated peripheral blood mononuclear cells were pulsed separately with 20 μg ml^{-1} of each test and control peptide (according to the HLA molecules expressed for each sample). After washing off excess peptide, peripheral blood mononuclear cell aliquots were mixed (populations pulsed with test peptides were pooled) and 2×10^5 cells were added in each well of a microwell plate, in 10% human pooled serum-complete Iscove's medium containing IL-2, IL-4 and IL-7. Approximately 150 microcultures were performed for each sample. On day 7 of culture, MLPCs were restimulated for an additional 7 days with irradiated EBV-B pulsed separately with the same peptides used initially. On day 14, antigen-specific pCTLs contained in each microwell of the MLPCs were detected after staining with all relevant HLA-multimers and analyzed by flow cytometry. MLPCs found positive for this pool of HLA-multimers were additionally stained with individual multimers to identify the exact specificity of the stained population (Figure 1). If any MLPC contained a doubtful HLA-multimer-positive population, the corresponding well underwent one or two additional stimulations with the relevant peptide but of a different batch and multimer staining was repeated, ensuring in this way the specificity of the multimer-positive population. Such MLPCs were included in the frequency estimation only if staining with the specific HLA-multimer resulted in a distinct cell cluster that did not stain with control HLA-multimers of different specificity.

The proportion of MLPCs containing $CD8^+$ cells specifically stained with HLA-multimers was used to calculate, by the use of Poisson distribution analysis, the frequency of peptide-specific pCTLs among peripheral $CD8^+$ T-cells. The cumulative frequencies of pCTLs directed against all the tumor peptides examined for each subject, were calculated on the basis of the number of MLPCs found positive after staining with the pool of relevant HLA-multimers. Accordingly, the frequencies of peptide-specific pCTLs were calculated on the basis of the number of MLPCs found positive after staining with the specific HLA-multimers.

Obviously, the lower limit of the analytical sensitivity of our methodology is depended upon the maximum number of $CD8^+$ cells obtained from each individual that was widely varying among subjects examined. The presence, however, of specific pCTLs at frequencies lower than the sensitivity level achievable in each individual, cannot be excluded. To present this valuable information, the frequencies in such cases were designated as 'less than' (<) the minimum ones determined on the basis of the maximum number of $CD8^+$ cells obtained, and among which, one specific pCTL could not be found. When the cumulative frequency of anti-TAA pCTL is represented, this refers only to the sum of the detected frequencies.

Finally, the percentage of $CD8^+$ cells stained with a given HLA-multimer inside each MLPC at day 14 of culture as well as the corresponding mean fluorescence intensity were also examined.

T-cell cloning

HLA-multimer-positive populations contained in MLPCs were sorted using an automated magnetic cell sorter, anti-PE-labeled magnetic beads (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and PE-labeled multimers, according to manufacturer's instructions. Having been tested for their purity, isolated lymphocytes were cloned by limiting dilution, seeding 0.1, 1 and 10 cells per microwell, and stimulated by the addition of irradiated EBV-B cells (2×10^4/well) pulsed with the relevant peptide and 100 U ml^{-1} IL-2, 10 ng ml^{-1} IL-4, 10 ng ml^{-1} IL-7 and 100 μM methyl-tryptophan. Microwells were stimulated twice more at 7-day intervals with the same mixture of cells and cytokines. Seven days after the last stimulation, they were transferred into 2-ml wells and maintained by weekly restimulations with allogenic EBV-B cells and peptide-pulsed tumor cells restricted for the HLA recognized by the respective T-cells.

Characterization of CTL clones

Isolated CTL clones were submitted to TcR and functional analysis by measuring their lytic activity, cytokine secretion in culture supernatants and immunophenotyping. All analyses were performed on clones collected 7 days after restimulation with peptide-loaded antigen-presenting cells, feeders and growth factors.

Vβ TcR analysis was attempted on CTL clones isolated only from individuals that had more than one MLPC containing a multimer-positive population, and it was performed exactly as described previously.[11] PCR products were purified and sequenced to obtain a complete identification of the CDR3 region. To confirm that all MLPCs of the same patient contained a multimer-positive population with the same Vβ TcR sequence, primers spanning the

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

relevant CDR3 region were synthesized and MLPCs were subjected to a clonotypic PCR analysis as described previously.[11]

Lytic activity was measured with a conventional 4-h ^{51}Cr-release assay using 5000 target cells per well. The target cells were EBV-B cells expressing HLA-A1 or HLA-A2, and the melanoma tumor cell EB81 (expressing HLA-A1 or HLA-A2)[11] loaded with relevant or irrelevant peptides for 30 min, at room temperature. The EB81 tumor cell expressed MAGE-A1, MAGE-A3 and telomerase as reported previously.[49] To determine TcR avidity, the lytic activity of CTL clones was examined against EBV-B cells loaded with titrated concentrations of relevant peptides.

The ability of each clone to secrete IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-15, IL-17, interferon-γ and tumor necrosis factor-α was assessed after a 20-h stimulation of 2×10^5 CTL clones with a 10 times lesser number of peptide-loaded antigen-presenting cells. The culture supernatant was collected and used to measure the concentrations of cytokines produced by the CTL clones using Multiplex Q3 Bead-based Luminex Technology (Biosource, USA).

The ability of each clone to secrete IL-2, IL-4, IL-10, and interferon-γ was further assessed using an intracellular cytokine assay, as described previously with some modifications.[51] In brief, 2×10^5 CTL clones were stimulated with a 10 times lesser number of EBV cells loaded with 2.5 μg ml^{-1} relevant or irrelevant peptide. Protein secretion was stopped after 90 min with brefeldin-A and cytokine synthesis was measured after an additional 20-h stimulation. Cells were analyzed by flow cytometry.

Immunophenotyping

CTL clones and MLPC populations containing multimer-positive cells were analyzed by flow cytometry using the following monoclonal antibodies conjugated to either fluorescein isothiocyanate, PE, allophycocyanin, ECD or Q4 PC7: SFCI21Thy2D3 (anti-CD8; PC7; Beckman Coulter, CA, USA), CD28.2 Q5 (anti-CD28; fluorescein isothiocyanate; Immunotech, France), UCHL1 (anti-CD45RO; ECD; Beckman Coulter), NC1 (anti-CD57; fluorescein isothiocyanate; Immunotech) and 150503 (anti-CCR7; allophycocyanin; R&D systems, Q6 USA). Cells were washed, stained for 30 min with antibodies at 4 °C before being washed and fixed with formaldehyde. Isotype-matched antibodies were used to verify the staining specificity, and as a guide for setting the markers to delineate positive and negative populations.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± s.d. and were analyzed by Student's two-tailed *t*-test. $P<0.05$ was regarded as significant. Correlation coefficients were calculated by Pearson's product moment to identify the significance of various indices compared.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by (a) a European Union—European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%) (ENTER 04EP09) grant and (b) a Marie Curie Incoming International Fellowship within the 6th European Community Framework Programme (FP6 Contract MIF1-CT-2006-021795, IRTALUNG) grant. We appreciate Professor P Coulie (Christian De Duve Institute of Cellular Pathology, Universite Catholique de Louvain, Brussels, Belgium) for encouraging our work and for the preparation of HLA-multimers. We thank M Speletas for critical discussions, I Tsouggos for help with irradiation of cells, and K Tsolis and G Loules for expert technical assistance.

1 Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; **10**: 909–915.
2 Rizzuto GA, Merghoub T, Hirschhorn-Cymerman D, Liu C, Lesokhin AM, Sahawneh D *et al*. Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. *J Exp Med* 2009; **206**: 849–866.
3 Badovinac VP, Haring JS, Harty JT. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity* 2007; **26**: 827–841.
4 Marzo AL, Klonowski KD, Le Bon A, Borrow P, Tough DF, Lefrançois L. Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat Immunol* 2005; **6**: 793–799.
5 Bricard G, Bouzourene H, Martinet O, Rimoldi D, Halkic N, Gillet M *et al.* Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 2005; **174**: 1709–1716.
6 Shang XY, Chen HS, Zhang HG, Pang XW, Qiao H, Peng JR *et al.* The spontaneous CD8 T-cell response to HLA-A2–restricted NY-ESO-1b peptide in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 6946–6955.
7 Filaci G, Fravega M, Setti M, Traverso P, Millo E, Fenoglio D *et al.* Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in patients with cancer. *Blood* 2006; **107**: 1505–1512.
8 Sato Y, Shomura H, Maeda Y, Mine T, Une Y, Akasaka Y *et al*. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci* 2003; **94**: 802–808.
9 Mine T, Gouhara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T *et al*. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci* 2003; **94**: 548–556.
10 Tanaka S, Harada M, Mine T, Noguchi M, Gohara R, Azuma K *et al.* Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancer based on pre-existing peptide-specific ctotoxic T-lymphocyte precursors in the periphery. *J Immunother* 2003; **26**: 357–366.
11 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**: 4898–4904.
12 Ichiki Y, Hanagiri T, Takenoyama M, Baba T, Fukuyama T, Nagata Y *et al*. Tumor specific expression of survivin-2B in lung cancer as a novel target of immunotherapy. *Lung Cancer* 2005; **48**: 281–289.
13 Hanagiri T, van Baren N, Neyns B, Boon T, Coulie PG. Analysis of a rare melanoma patient with a spontaneous CTL response to a MAGE-A3 peptide presented by HLA-A1. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 178–184.
14 Zhang HG, Chen HS, Peng JR, Shang XY, Zhang J, Xing Q *et al*. Specific CD8(+)T cell responses to HLA-A2 restricted MAGE-A3 p271-279 peptide in hepatocellular carcinoma patients without vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**: 1945–1954.
15 Karanikas V, Soukou F, Kalala F, Kerenidi T, Grammoustianou ES, Gourgoulianis KI *et al.* Baseline levels of CD8+ T cells against survivin and survivin-2B in the blood of lung cancer patients and cancer-free individuals. *Clin Immunol* 2008; **129**: 230–240.
16 So T, Hanagiri T, Chapiro J, Colau D, Brasseur F, Yasumoto K *et al.* Lack of tumor recognition by cytolytic T lymphocyte clones recognizing peptide 195-203 encoded by gene MAGE-A3 and presented by HLA-A24 molecules. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**: 259–269.
17 Romero P. Current state of vaccine therapies in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2008; **9** (Suppl 1): S28–S36.
18 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**: 2727–2734.
19 Coulie PG, 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.
20 Chaux P, Vantomme V, Coulie P, Boon T, Van der Bruggen P. Estimation of the frequencies of anti-Mage-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer. *Int J Cancer* 1998; **77**: 538–542.
21 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**: 673–679.
22 Nowak AK, Lake RA, Robinson BW. Combined chemoimmunotherapy of solid tumors: improving vaccines? *Adv Drug Deliv Rev* 2006; **58**: 975–990.
23 Zitvogel L, Apeth L, Ghiringhelli F, Andrè F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008; **118**: 1991–2001.
24 Scheffer SR, Nave H, Korangy F, Schlote K, Pabst R, Jaffee EM *et al*. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response *in vivo*. *Int J Cancer* 2003; **103**: 205–211.
25 Dutoit V, Guillaume P, Cerottini JC, Romero P, Valmori D. Dissecting TCR-MHC/peptide complex interactions with A2/peptide multimers incorporating tumor antigen peptide variants: crucial role of interaction kinetics on functional outcomes. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 3285–3293.
26 Reynolds SR, Zeleniuch-Jacquotte A, Shapiro RL, Roses DF, Harris MN, Johnston D *et al*. Vaccine-induced CD8+ T-cell responses to MAGE-3 correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 657–662.
27 Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. The human T cell response to melanoma antigens. *Adv Immunol* 2006; **92**: 187–224.
28 Keogh E, Fikes J, Southwood S, Celis E, Chesnut R, Sette A. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity. *J Immunol* 2001; **167**: 787–796.
29 Groeper C, Gambazzi F, Zajac P, Bubendorf L, Adamina M, Rosenthal R *et al.* Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2007; **120**: 337–343.
30 Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V *et al.* Circulating tumor reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(−) effector subset exerting *ex vivo* tumorspecific cytolytic activity. *Cancer Res* 2002; **62**: 1743–1750.

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

31 Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet M, Kurth I, Corthesy P *et al*. *Ex-vivo* characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 2003; **102**: 1779–1787.
32 Prlic M, Williams MA, Bevan MJ. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 315–319.
33 Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, Lienard 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**: 2642–2651.
34 Valmori D, Gileadi U, Servis C, Dunbar PR, Cerottini JC, Romero P *et al*. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med* 1999; **189**: 895–906.
35 Zhou M, Peng JR, Zhang HG, Wang HX, Zhong ZH, Pan XY *et al*. Identification of two naturally presented MAGE antigenic peptides from a patient with hepatocellular carcinoma by mass spectrometry. *Immunol Lett* 2005; **99**: 113–121.
36 Effros RB. Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy. *Vaccine* 2007; **25**: 599–604.
37 Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**: 271–285.
38 Whelan JA, Dunbar PR, Price DA, Purbhoo MA, Lechner F, Ogg GS *et al*. Specificity of CTL interactions with peptide–MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J Immunol* 1999; **163**: 4342–4348.
39 Wooldridge L, Lissina A, Cole DK, van den Berg HA, Price DA, Sewell AK. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology* 2009; **126**: 147–164.
40 Schamel WW, Arechaga I, Risueno RM, van Santen HM, Cabezas P, Risco C *et al*. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med* 2005; **202**: 493–503.
41 Dutoit V, Guillaume P, Ayyoub M, Hesdorffer CS, Luescher IF, Valmori D. Decreased binding of peptides–MHC class I (pMHC) multimeric complexes to CD8 affects their binding avidity for the TCR but does not significantly impact on pMHC/TCR dissociation rate. *J Immunol* 2003; **170**: 5110–5117.
42 Kieper WC, Burghardt JT, Surh CD. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol* 2004; **172**: 40–44.
43 Maile R, Siler CA, Kerry SE, Midkiff KE, Collins EJ, Frelinger JA. Peripheral 'CD8 tuning' dynamically modulates the size and responsiveness of an antigen-specific T cell pool *in vivo*. *J Immunol* 2005; **174**: 619–627.
44 Kroger CJ, Alexander-Miller MA. Dose-dependent modulation of CD8 and functional avidity as a result of peptide encounter. *Immunology* 2007; **122**: 167–178.
45 Pittet MJ, Gati A, Le Gal FA, Bioley G, Guillaume P, de Smedt M *et al*. *Ex vivo* characterization of allo-MHC-restricted T cells specific for a single MHC–peptide complex. *J Immunol* 2006; **176**: 2330–2336.
46 Correale P, Cusi MG, Tsang KY, Del Vecchio MT, Marsili S, Placa ML *et al*. Chemoimmunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 8950–8958.
47 Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; **7**: 3–18.
48 Tseng CW, Hung CF, Alvarez RD, Trimble C, Huh WK, Kim D *et al*. Pretreatment with cisplatin enhances E7-specific CD8+ T-Cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 3185–3192.
49 Karanikas V, Tsochas S, Boukas K, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J *et al*. Coexpression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: implications for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2008; **7**: 345–352.
50 Echchakir H, Mami-Chouaib F, Vergnon I, Baurain JF, Karanikas V, Chouaib S *et al*. A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 4078–4083.
51 Karanikas V, Lodding J, Maino VC, McKenzie IF. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines detects immune responses in MUC1 immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 829–837.

UNCORRECTED PROOF

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research

RESEARCH Open Access

Cytolytic T-cell response against Epstein-Barr virus in lung cancer patients and healthy subjects

Vaios Karanikas*[1], Maria Zamanakou[1], Faye Soukou[1], Theodora Kerenidi[2], Ioannis Tsougos[3], Kiki Theodorou[3], Panagiotis Georgoulias[4], Konstantinos I Gourgoulianis[2] and Anastasios E Germenis[1]

Abstract

Background: This study aimed to examine whether EBV seropositive patients with lung cancer have an altered virus-specific CTL response, as compared to age-matched healthy controls and whether any variation in this response could be attributed to senescence.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells from lung cancer patients, age-matched and younger healthy individuals were used to measure EBV-specific CTLs after in vitro amplification with the GLCTLVAML and RYSIFFDYM peptides followed by HLA-multimer staining.

Results: Lung cancer patients and aged-matched controls had significantly lesser EBV-specific CTL than younger healthy individuals. Multimer positive populations from either group did not differ with respect to the percentage of multimer positive CTLs and the intensity of multimer binding.

Conclusions: This study provides evidence that patients with lung cancer exhibit an EBV-specific CTL response equivalent to that of age-matched healthy counterparts. These data warrant the examination of whether young individuals have a more robust anti-tumor response, as is the case with the anti-EBV response.

Introduction

Evidence suggests that cancer patients present with a compromised immune response of multifactorial origin, including the tumor itself. It seems that the early stages of tumor growth appear not to elicit systemic immune deficiency and are sometimes associated with antigen-specific tolerance, while generalized immunodeficiency can arise during the late stages of tumor development [1]. Related data are mainly derived either from in vitro experiments or from DTH measurements in the context of cancer immunotherapy [2]. Therefore, the existing evidence remains inconclusive, while the significance of the described immune alterations in relation to the ability of cancer patients to mount effective responses against pathogens has not been clarified. Finally, there is existing controversy regarding the efficacy of influenza vaccination in patients with cancer [3,4].

This study was scheduled in order to examine whether, at diagnosis, EBV seropositive patients with lung cancer, have a compromised virus-specific CTL response, as compared to age-matched healthy controls. A group of younger healthy individuals was also examined to ascertain whether a possible reduction in the anti-EBV CTL responses of the above patients and age-matched controls could be attributed to senescence. Lung cancer was selected because although such cancers express several tumour antigens [5] and T cells infiltrating these tumours have been identified [6], the outcomes of specific immunotherapy for patients with lung cancer is rather poor [7].

Subjects and methods

Patients and controls

PBMC were isolated from whole blood collected at diagnosis from 19 patients with primary lung cancer. Thirteen of them were diagnosed with NSCLC (mean age 66.8 ± 11.8 years; 3 females, 10 males) and the remaining 6 with SCLC (mean age 67.0 ± 7.4 years; 1 female, 5 males). PBMC were also collected from 14 age-matched healthy individuals (mean age 58.2 ± 5.8 years; 4 females, 10

* Correspondence: vkaran@med.uth.gr
[1] Cancer Immunology Unit, Department of Immunology & Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2010 Karanikas et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

males) as well as from 7 healthy younger individuals (mean age 26.7 ± 1.0 years; 4 females, 3 males). All PBMC were kept frozen till required. Subjects expressed HLA-A2 and/or -A24 (patients: 11 HLA-A2, 6 HLA-A24, 2 HLA-A2/-A24; age-matched healthy individuals: 8 HLA-A2, 5 HLA-A24, 1 HLA-A2/-A24; young healthy individuals: 5 HLA-A2, 2 HLA-A2/-A24) and there were positive for IgG antibodies against the EBV nuclear antigen 3C (EBNA3C). The study conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki, it was reviewed and approved by the University of Thessaly Ethics Committee, and all participants provided informed consent.

Detection of EBV-specific CTLs

Peptide-specific CTLs were detected using HLA-multimer flow cytometry after a previous step of in vitro amplification of MLPCs with peptides under limiting dilution conditions, exactly as described in detail previously [8]. Two EBV peptides, GLCTLVAML (BMLF1.A2 presented by HLA-A2) and RYSIFFDYM (EBNA3C.A24 presented by HLA-A24) were used. These were synthesized on solid phase using F-moc for transient NH2-terminal protection, purchased as lyophilised at > 90% purity ascertained by mass spectrometry (Abgent, San Diego, USA), dissolved in DMSO at 10 mg/mL, and stored at -20 °C before use. Specific multimers labelled with APC and control multimers with PE were used to stain MLPC. Each MLPC was considered to contain a multimer positive population, only if staining with the specific HLA-multimer resulted in a distinct cell cluster that did not stain with control HLA-multimers of different specificity.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD and were analyzed using two tailed chi-square analysis without Yate's correction. The level of significance was 0.05 (two-sided). The commercially available statistical software (SPSS for Windows, release 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL.) was used.

Results

EBV-specific CTL responses were detected in the peripheral blood of 8/19 lung cancer patients (42%) and 5/14 (36%) aged-matched controls (p = 0.713). Both of these proportions were statistically significantly different than

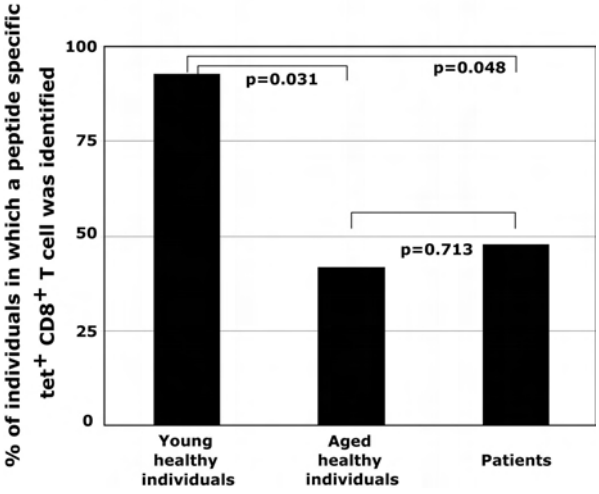


Figure 1 Proportion of individuals (young healthy, aged healthy and patients) containing an EBV peptide specific tet + CD8 + T cell amongst peripheral blood CD8 T cells.

86% (6/7) of younger healthy individuals (p = 0.048 and p = 0.031, respectively) that presented with an EBV-specific CTL response (Figure 1). When we examined whether corresponding alterations could be observed against other viruses such as CMV, our findings indicated that the anti-CMV response was similar to that described in the literature [9]. Hence, although all subjects had prior exposure to CMV as determined by serology, younger individuals appeared to have a lesser response as compared to aged individuals (p = 0.046) and aged individuals had a higher response than that observed with patients (p = 0.025) (Table 1).

Despite the above, the frequency of EBV specific CTL amongst peripheral CD8 T cells was almost the same in the subjects of all groups (Table 2). In all groups, the response against the BMLF1.A2 peptide was more frequent than that against the EBNA3C.A24 peptide (7 patients out of the possible 13, 3 aged-matched controls out of the possible 9 and 6 younger healthy individuals out of the possible 7).

In the process of determining the pCTL frequencies in the peripheral blood, we collected and evaluated flow cytometric data obtained from the analysis of each individual MLPCs. Interestingly, although MLPC containing

Table 1: Anti-CMV serological response amongst each group

Subject group	Mean ± Standard deviation[a]	Range[a]	p
Young healthy individuals	267 ± 183	8-486	Young vs Aged: 0.049
Aged healthy individuals	377 ± 83	411-612	Young vs Patients: 0.466
Patients with lung cancer	341 ± 199	22-831	Aged vs Patients: 0.024

[a]Values represent U/mL of anti-CMV IgG antibodies

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Table 2: Number of EBV specific CTL amongst each group

Subject group	Mean ± Standard deviation[a]	Range[a]
Young healthy individuals	24.3 ± 17.9	3.1 - 54.8
Aged healthy individuals	25.2 ± 17.2	10.4 - 53.9
Patients with lung cancer	21.8 ± 18.7	1.9 - 60.2

[a]Values represent number of EBV specific CTL amongst one million peripheral CD8 T cells.

a multimer positive population, amongst all three groups appeared to have similar multimer positive populations (Figure 2), interesting findings were observed when these were analysed in detail. In particular, the mean percentage of multimer$^+$CD8$^+$ T cells inside the positive MLPCs was found significantly higher ($p < 0.0001$) in age-matched healthy subjects (26.6 ± 26.4%, range 0.4--80.7%) than in lung cancer patients (2.7 ± 3.3%, range 0.1-19.0%) and younger healthy individuals (2.4 ± 1.7%, range 0.2-7.0%) (Figure 3A). This reflects an increased proliferative capacity against the antigenic stimulus of the peptide-specific pCTLs in the older healthy subjects. On the other hand, no statistically significant difference was observed among the three groups with respect to the intensity of multimer binding by each multimer positive population (patients; MFI 6.9 ± 12.3, range 2-115, older healthy subjects; MFI 6.0 ± 4.1, range 2-23, younger healthy subjects; MFI 5.1 ± 3.7, range 2-19) (Figure 3B). This indicates that all antiviral T cells had TCR with a similar avidity towards the peptide/MHC complex and no difference in the kinetics of interaction between TcR and multimer complexes could be observed [10]. Regarding the above, a significant correlation was observed between the percentage of multimer$^+$CD8$^+$ and the multimer MFI within the patient ($r = 0.15$, $p < 0.0001$) and the aged-matched healthy individual group ($r = 0.504$, $p < 0.0001$) but not within the young healthy individual group ($r = 0.016$, $p = 0.435$).

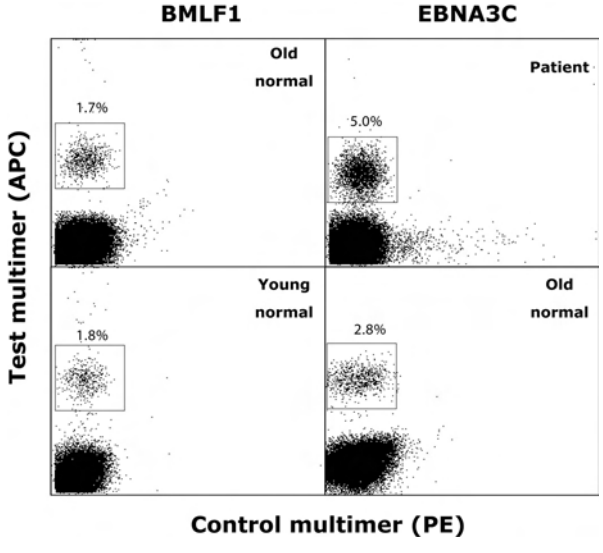


Figure 2 EBV multimer positive populations from patients, age-matched healthy individuals and healthy younger individuals. MLPC, were stained with test multimers folded with BMLF1.A2 or EBNA3C.A24 labelled with APC (y axis) and control multimers folded with irrelevant HLA-A2 or -A24 peptides labelled with PE (x axis). Each plot represents live CD8 lymphocytes with the multimer positive population indicated in each gate.

Finally, we examined whether the presence of an anti-EBV CTL response lung cancer patients correlated with any clinicopathological parameter (age, sex, performance status, loss of weight, stage of disease etc). No significant correlations were uncovered with either group (Table 3).

Discussion

This study provides direct evidence that lung cancer patients dispose an EBV-specific CTL response equivalent to that of age-matched healthy counterparts. Moreover, it was demonstrated that the EBV-specific CTL response mounted by subjects of this age group, either with cancer or not, was twice as less than that elicited by younger healthy individuals. Regarding the healthy individuals, our results are in accordance to those reported recently by Colonna-Romano et al [11] demonstrating an inverse correlation between age and the percentage of circulating EBV-specific CTLs. Most likely, these observations can be explained in the context of the complex process of T cell immunosenescence [9,12].

With respect to cancer patients, it is interesting that they present with the same age-related alteration of EBV-specific CTL response as their healthy counterparts. In other words, neither the antigenic burden of the tumor nor any other cancer-related factor affected their ability to mount a CTL response against the virus. Assuming that the CTL response of cancer patients against other pathogens follows a similar pattern of alterations, no special vaccination strategy [4] is required other than that followed for elderly people in general, except when they are under the influence of immunosuppressive therapies. To this end, it must be noted that considering the low frequencies detected in our study population (3-60/million CD8), one has no other alternative but to attempt to amplify these cells first in order to understand their reac-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

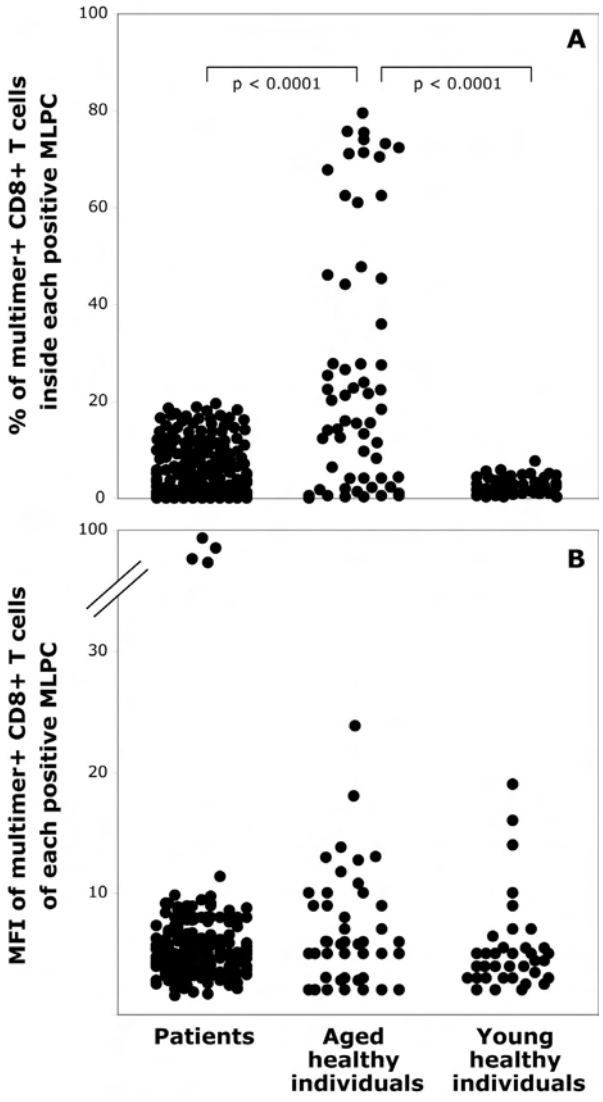


Figure 3 Flow cytometric characteristics of circulating anti-EBV specific pCTL from patients, age-matched healthy individuals and healthy younger individuals. *(A)*Percentage of multimer$^+$CD8$^+$ T cells inside each positive MLPCs (significance is indicate for comparisons between each group). *(B)*Mean Fluorescence Index (MFI) of HLA-multimers inside the positive MLPCs for each group.

Table 3: Correlations of anti-EBV T cell response upon diagnosis with clinicopathological parameters

		Anti-EBV T cell response[a]		
		Yes	**No**	**p-value[b]**
Age[c]	≤ 65	4 (54; 48-63)	2 (43; 43-59)	0.294
	> 65	4 (74; 69-79)	9 (71; 66-81)	0.515
Histiotype	NSCLC	5	8	0.837
	SCLC	3	3	0.734
Sex	M	5	10	0.601
	F	3	1	0.231
Performance Status[d]	0	6	10	0.782
	1	2	1	0.427
Loss of weight	< 5%	6	8	0.966
	≥ 5%	2	3	0.932
Stage	I-II	5	5	0.684
	III-IV	3	6	0.657
Survival status	Alive	5	6	0.657
	Dead	3	5	0.824
Survival	Days	843.88 ± 235.59	757.89 ± 292.30	0.512

[a] Patients were grouped according to whether they had a detectable anti-EBV T cell response; [b] p values were obtained after comparing for each group every parameter; [c] In parentheses, the median and range is indicated (years); [d] ECOG Performance status

tivity. This is not unusual since other we and others have confirmed that in most cases CTL responses detected after in vitro stimulation reflect the true number of these cells circulating in vivo [13,14].

Beyond differences observed in the specific pCTL frequency related to age, cancer patients also appeared with a decreased proliferative capacity of virus specific pCTL. Most likely these differences could be explained by replicative senescence [15,16], whereby viral specific CTL in patients have multiplied several times over their lifetime and present with a reduced ability to further respond to an antigenic stimulus. This does not exclude their presence but rather supports the fact that T cell clonal exhaustion results in the accumulation of oligoclonal dysfunctional cells followed by repertoire shrinkage due to clonal deletion, maintaining however, the actual number of dysfunctional cells [17], as has recently being demonstrated in patients with renal cell cancer [18].

Many investigators relate the immune dysfunction of cancer patients with both the inefficient anti-tumor response and a reduced efficacy of immunotherapy [19,20]. To this end, we have recently identified that patients with lung cancer present with a tenfold higher number of anti-tumor CTL as compared to the age-matched controls [13]. These results suggest that such patients do not have an immunocompromised CD8 T cell response but the ineffective anti-tumor response, is most likely a reflection of the age-associated changes that take place in individuals [21] impacting on their capacity to respond effectively against the tumor. Under the light of the data presented herein, it is worth examining whether young individuals have a more robust anti-tumor response, as is the case with the anti-EBV response.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75

Conclusions

In conclusion, this study provides evidence that lung cancer patients dispose an EBV-specific CTL response equivalent to that of age-matched healthy counterparts. Our study suggests that possibly the poor outcome of cancer immunotherapeutic approaches in lung cancer can be a result of the underlying effects of senescence on the immune system rather than an inefficient anti-tumor response. These data warrant the examination of whether young individuals have a more robust anti-tumor response, as is the case with the anti-EBV response.

List of Abbreviations

APC: allophycocyanin; CMV: cytomegalovirus; CTL: cytolytic $CD8^+$ T cell; DTH: delayed-type hypersensitivity; EBV: Eptein-Barr virus; MLPCs: mixed lymphocyte-peptide cultures; NSCLC: non-small cell lung carcinoma; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PE: phycoerythrin; SCLC: small cell lung carcinoma;

Acknowledgements

This work was supported by (a) a European Union - European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%) (ENTER 04EP09) grant and (b) a Marie Curie Incoming International Fellowship within the 6th European Community Framework Programme (FP6 Contract MIF1-CT-2006-021795, IRTALUNG) grant.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VK and AEG conceived and designed the study, analysed and interpreted the data and drafted the manuscript. MZ and FS carried out most of the experiments. TK collected samples. IT, KT and PG assisted with cell culture. KIG assisted with the critical revision of the manuscript.

Author Details

[1]Cancer Immunology Unit, Department of Immunology & Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece, [2]Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece, [3]Department of Medical Physics, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece and [4]Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece

Received: 6 April 2010 Accepted: 4 June 2010
Published: 4 June 2010

References

1. Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjöberg J, Pisa P, Petersson M: **Tumor-induced immune dysfunction.** *Cancer Immunol Immunother* 1999, **48:**353-362.
2. Hadden JW: **The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update.** *Int J Immunopharmacol* 1999, **21:**79-101.
3. Brydak LB, Guzy J, Starzyk J, Bachala M, Góźdź SS: **Humoral immune response after vaccination against influenza in patients with breast cancer.** *Support Care Cancer* 2001, **9:**65-68.
4. Earle CC: **Influenza vaccination in elderly patients with advanced colorectal cancer.** *J Clin Oncol* 2003, **21:**1161-1166.
5. Karanikas V, Tsochas S, Boukas K, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gourgoulianis KI, Germenis AE: **Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7:**345-352.
6. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, Kennedy MM, King G, Cockburn JS, Jeffrey RR: **Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung.** *Lung Cancer* 2000, **27:**27-35.
7. Romero P: **Current state of vaccine therapies in non-small-cell lung cancer.** *Clin Lung Cancer* 2008, **9(Suppl 1):**S28-S36.
8. Karanikas V, Soukou F, Kalala F, Kerenidi T, Grammoustianou ES, Gourgoulianis KI, Germenis AE: **Baseline levels of CD8 + T cells against survivin and survivin-2B in the blood of lung cancer patients and cancer-free individuals.** *Clin Immunol* 2008, **129:**230-240.
9. Nikolich-Žugich J: **Ageing and life-long maintenance of T cell subsets in the face of latent persistent infections.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8:**512-522.
10. Dutoit V, Guillaume P, Cerottini JC, Romero P, Valmori D: **Dissecting TCR-MHC/peptide complex interactions with A2/peptide multimers incorporating tumor antigen peptide variants: crucial role of interaction kinetics on functional outcomes.** *Eur J Immunol* 2002, **32:**3285-3293.
11. Colonna-Romano G, Akbar AN, Aquino A, Bulati M, Candore G, Lio D, Ammatuna P, Fletcher JM, Caruso C, Pawelec G: **Impact of CMV and EBV seropositivity on CD8 T lymphocytes in an old population from West-Sicily.** *Exp Gerontol* 2007, **42:**995-1002.
12. Weng NP: **Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt?** *Immunity* 2006, **24:**495-499.
13. Karanikas V, Zamanakou M, Soukou F, Kerenidi T, Gourgoulianis KI, Germenis AE: **Naturally occurring tumor-specific CD8(+) T-cell precursors in individuals with and without cancer.** *Immunol Cell Biol* 2010 in press.
14. Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V, Boon T: **A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98:**10290-10295.
15. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet M, Kurth I, Corthesy P, *et al.*: **Ex-vivo characterization of human CD8 + T subsets with distinct replicative history and partial effector functions.** *Blood* 2003, **102:**1779-1787.
16. Effros RB: **Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy.** *Vaccine* 2007, **25:**599-604.
17. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Effros R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A: **Is immunosenescence infectious?** *Trends Immunol* 2004, **25:**406-410.
18. Walter S, Bioley G, Bühring HJ, Koch S, Wernet D, Zippelius A, *et al.*: **High frequencies of functionally impaired cytokeratin 18-specific CD8 + T cells in healthy HLA-A2 + donors.** *Eur. J. Immunol* 2005, **35:**2876-2885.
19. Malmberg KJ: **Effective immunotherapy against cancer: A question of overcoming immune suppression and immune escape?** *Cancer Immunol Immunother* 2004, **53:**879-892.
20. Kiewe P, Wojtke S, Thiel E, Nagorsen D: **Antiviral cellular immunity in colorectal cancer patients.** *Hum Immunol* 2009, **70:**85-88.
21. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M: **The immune system in extreme longevity.** *Exp Gerontol* 2008, **43:**61-65.

doi: 10.1186/1756-9966-29-64
Cite this article as: Karanikas *et al.*, Cytolytic T-cell response against Epstein-Barr virus in lung cancer patients and healthy subjects *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010, **29**:64

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
18/04/2024 11:15:14 EEST - 3.17.6.75