

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

**CD8 Τ-κυτταρική απάντηση
έναντι των αντιγόνων MAGE
στον καρκίνο του πνεύμονα**

ΜΑΡΙΑ ΖΑΜΑΝΑΚΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Ανοσολογίας

(επιβλέπων)

Ματθαίος Σπελέτας

Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

Γεώργιος Χατζηγεωργίου

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Ανοσολογίας

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς

Καθηγητής Φυσιολογίας

Χρήστος Παπανδρέου

Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας-Παθολογίας

Γεώργιος Σίμος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Ματθαίος Σπελέτας

Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

Γεώργιος Χατζηγεωργίου

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας

*Στους γονείς μου,
δε θα μπορούσα να προχωρήσω χωρίς τη δική τους στήριξη*

Στον αγαπημένο μου Βαγγέλη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.1. Η έναντι των όγκων Ανοσοεπιτήρηση και Ανοσοδιαμόρφωση	17
1.2. CD8 T κυτταρική απάντηση και ανοσοθεραπεία του καρκίνου.....	21
1.3. Τα αντιγόνα των όγκων	24
2. MAGES ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	27
2.1. Καρκινικά αντιγόνα βλαστικής σειράς	27
2.2. MAGEs	29
3. ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.....	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	42
2. ΥΛΙΚΑ	44
2.1. Πεπτίδια	44
2.2. HLA-πολυμερή	44
2.3. Καρκινικές γραμμές - EBV μετασχηματισμένα B κύτταρα	45
2.4. Ορός.....	45
2.5. Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά	46
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	53
3.1. Απομόνωση - Διατήρηση - Ανάκτηση PBMCs	54
3.2. Παρασκευή ορού απο πλάσμα.....	56
3.3. Απομόνωση γραμμών καρκινικών κυττάρων	57
3.4. Καλλιέργεια καρκινικών γραμμών και EBV-B κυττάρων	63
3.5. Ακτινοβόληση κυττάρων	64
3.6. Μεικτή Λεμφοκυτταρική Καλλιέργεια (MLPC)	64
3.7. Καλλιέργεια T γραμμών	68
3.8. Απομόνωση CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων.....	69
3.9. Καλλιέργεια CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων	71
3.10. Εκχύλιση RNA	74
3.11. Σύνθεση cDNA.....	74
3.12. Έκφραση μεταγράφων CD28 και BCL2.....	75
3.13. Ανάλυση του TCR	75
3.14. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός CD8 T κυττάρων	79
3.14.1. Σχεδιασμός πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας ροής	79
3.14.2. CD8 T κυτταρολυτικοί κλώνοι.....	81
3.14.3. CD8 T γραμμές.....	82

3.15. Λειτουργικός χαρακτηρισμός CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων.....	83
3.15.1. Προσδιορισμός κυτταροκινών – Ενδοκυττάρια χρώση	83
3.15.2. Προσδιορισμός κυτταροκινών - Μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία	86
3.15.3. Λυτική ικανότητα	86
3.15.4. Συγγένεια του TcR	88
3.15.5. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρία ροής	89
3.15.6. Λειτουργικός χαρακτηρισμός με χρήση IFN-γ	89
3.16. Στατιστική ανάλυση.....	90
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	91
4.1. Μελέτη της CD8 T απάντησης.....	92
4.2. Επίδραση της χημειοθεραπείας στη συχνότητα των pCTL.....	100
4.3. CD8 T γραμμές.....	101
4.4. CD8 T κυτταρολυτικοί κλώνοι.....	103
4.5. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός CTL	106
4.5.1. Έκφραση δεικτών επιφανείας	106
4.5.2. Έκφραση μεταγράφων CD28 και BCL2	106
4.5.3. Ανάλυση του TCR	108
4.6. Λειτουργικός χαρακτηρισμός CTL	114
4.6.1. Παραγωγή κυτταροκινών.....	114
4.6.2. Λυτική ικανότητα	117
4.6.3. Συγγένεια του TCR	121
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122
5.1. Συχνότητα αντιγονοειδικών CTL	123
5.2. Λειτουργικότητα αντιγονοειδικών CTL.....	131
5.3. Συμπεράσματα	135
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	137
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	141
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	154

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Μαρία Ζαμανάκου του Χρήστου
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 04 Απριλίου 1981
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Λάρισα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Έγγαμη
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Λατταμύα 46 – 41335 Λάρισα
Τηλ.: 2410-623244 – Κιν.: 6976-675504
E-mail: airamzam@hotmail.com
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (άριστα), Ισπανικά (πολύ καλά)

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

- 2004 Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών - Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Λίαν καλώς)
- 2006 Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Εφαρμοσμένη Γενετική και Βιοτεχνολογία", Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών - Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Άριστα)
Διπλωματική Εργασία: Έκφραση της 2,3-διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 2003 Υποτροφία κινητικότητας Erasmus (IKY) διάρκειας 8 μηνών για τη συμμετοχή στο πρόγραμμα Erasmus

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 2008 Έπαινος για την εργασία με τίτλο: Μεταγραφική έκφραση της ανάστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (hTERT) και της 2,3-διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης (IDO) στον καρκίνο του πνεύμονα. *17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος*, Αλεξανδρούπολη
- 2007 Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση με τίτλο: Έκφραση του χαρακτηριστικού των ρυθμιστικών T- κυττάρων γονιδίου Foxp3 στον καρκίνο του πνεύμονα. *16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος*, Αθήνα

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 (in press)
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, [Epub ahead of print], doi:10.1038/icb.2010.8
3. KARANIKAS V, SPELETAS M, **ZAMANAKOU M**, KALALA F, LOULES G, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med* 2008, 6: 19
4. **ZAMANAKOU M**, GERMENIS AE, KARANIKAS V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase *Immunol Lett.* 2007, 111:69-75
5. KARANIKAS V, **ZAMANAKOU M**, KERENIDI T, DAHABREH J, HEVAS A, NAKOU M, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Expression in Lung Cancer *Cancer Biol Ther.* 2007, 6:1257-1262

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. KARANIKAS V, **ZAMANAKOU M**, SOUKOU F, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Tumor Specific CD8+ T Cells in Patients with Lung Cancer and Healthy Individuals. *Journal of B.U.ON* 2009, 14:S153-S157
2. 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
3. KARANIKAS V, SPELETAS M, **ZAMANAKOU M**, KALALA F, LOULES G, BARDA A, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Foxp3 expression in human cancer cells. *Cell Oncol* 2008, 30:128
4. ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, **ZAMANAKOU M**, ΤΣΟΧΑΣ Σ, ΝΑΚΟΥ Μ, ΠΟΥΛΑΡΑΚΗΣ Θ, ΧΕΒΑΣ Α, ΔΑΗΔΡΗ J, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β Μεταγραφική έκφραση της ανάστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (hTERT) και της 2,3- διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης (IDO) στον καρκίνο του πνεύμονα. *Πνεύμων* 2008, 3:14
5. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ, **ZAMANAKOU M**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΛΟΥΛΕΣ Γ, ΜΠΑΡΔΑ Α, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Έκφραση του χαρακτηριστικού των ρυθμιστικών T- κυττάρων γονιδίου Foxp3 στον καρκίνο του πνεύμονα. *Πνεύμων* 2007, (Suppl):24
6. **ZAMANAKOU M**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΝΑΚΟΥ Μ, ΧΕΒΑΣ Α, ΚΑΤΣΑΜΠΕΚΗ Α, ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ Γ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ Α, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β Έκφραση της 2,3- διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης (IDO) στον καρκίνο του πνεύμονα. *Πνεύμων* 2006, (Suppl):23

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, **ZAMANAKOU M**, 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. ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, **ZAMANAKOY M**, ΤΣΟΧΑΣ Σ, ΝΑΚΟΥ Μ, ΠΟΥΛΑΡΑΚΗΣ Θ, ΧΕΒΑΣ Α, DAHADREH J, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β Μεταγραφική έκφραση της ανάστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (hTERT) και της 2,3- διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης (IDO) στον καρκίνο του πνεύμονα. *17th Ελληνικό Συνέδριο Θωρακικών Νοσημάτων*, Αλεξανδρούπολη 2008
3. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΣΟΥΚΟΥ Φ, **ZAMANAKOY M**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΓΡΑΜΜΟΥΣΤΙΑΝΟΥ Ε, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ CD8 T- κυτταρική απάντηση στον καρκίνο του πνεύμονα *Καρκίνος Πνεύμονα*, Κέρκυρα 2008
4. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ V, SPELETAS M, **ZAMANAKOY M**, ΚΑΛΑΛΑ F, LOULES G, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting*, San Diego USA 2008
5. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ V, SPELETAS M, **ZAMANAKOY M**, ΚΑΛΑΛΑ F, LOULES G, BARDA A, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE Foxp3 expression in human cancer cells. *8th International Conference on the trends in Immunosuppression and Immunotherapy*, Berlin 2008
6. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, **ZAMANAKOY M**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, DAHADREH J, ΧΕΒΑΣ Α, ΝΑΚΟΥ Μ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Indoleamine 2,3- dioxygenase (IDO) expression in lung cancer. *4ο Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας - IGBF4*, Αθήνα 2008
7. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ, **ZAMANAKOY M**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΛΟΥΛΕΣ Γ, ΜΠΑΡΔΑ Α, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Foxp3 expression in human cancer cells. *4ο Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας - IGBF4*, Αθήνα 2008
8. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΣΠΕΛΕΤΑΣ Μ, **ZAMANAKOY M**, ΚΑΛΑΛΑ Φ, ΛΟΥΛΕΣ Γ, ΜΠΑΡΔΑ Α, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Έκφραση του χαρακτηριστικού των ρυθμιστικών T- κυττάρων γονιδίου Foxp3 στον καρκίνο του πνεύμονα. *16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος*, Αθήνα 2007
9. **ZAMANAKOY M**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, ΝΑΚΟΥ Μ, ΧΕΒΑΣ Α, ΚΑΤΣΑΜΠΕΚΗ Α, ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ Γ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ Α, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β Έκφραση της 2,3- διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης (IDO) στον καρκίνο του πνεύμονα. *15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος*, Ηράκλειο Κρήτης 2006
10. **ZAMANAKOY M**, ΚΕΡΕΝΙΔΗ Θ, DAHADREH J, ΧΕΒΑΣ Α, ΝΑΚΟΥ Μ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ Έκφραση της 2,3- διοξυγονάσης της ινδολεαμίνης στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. *Ημέρες Πνευμονολογίας*, Λάρισα 2006
11. ΚΟΥΝΑΤΙΔΗΣ Η, **ZAMANAKOY M**, ARANA Ρ Μονοσθενή χρωμοσώματα στο έντομο *Eyregeroscnemis plorans*: Β χρωμοσώματα και ο ρόλος τους κατά την είσοδο στην ανάφαση. *Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, Ναύπλιο 2005
12. **ZAMANAKOY M**, ΚΟΥΝΑΤΙΔΗΣ Η, ARANA Ρ Μονοσθενή χρωμοσώματα στο έντομο *Eyregeroscnemis plorans*: Αυτοσωμικά μονοσθενή χρωμοσώματα και δυναμική της κατάρρευσης της μειωτικής ατράκτου. *Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών*, Ναύπλιο 2005

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος είναι μία καταστροφική νόσος και παρόλη τη πρόοδο στη χειρουργική, την ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία παραμένει η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στο Δυτικό κόσμο. Τα προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα έχουν βελτιώσει την επιβίωση σε αιματολογικές κακοήθειες, αλλά για τους μεταστατικούς συμπαγείς όγκους τα αποτελέσματα δεν είναι ενθαρρυντικά και η ανάπτυξη εναλλακτικών μορφών θεραπείας προβάλλει επιτακτική. Σε αυτό το πλαίσιο η ανοσοθεραπεία εμφανίστηκε σαν μια ελπιδοφόρα θεραπευτική επιλογή, βασισμένη στην παρατήρηση πως το ανοσιακό σύστημα μπορεί να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, μετά από χρόνια ερευνητικής εργασίας, κλινικών δοκιμών και χιλιάδων ασθενών τα συγκεκριμένα αποτελέσματα της ανοσοθεραπείας δεν είναι τα αναμενόμενα. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα αυτά αναφέρεται πως “καμία προσέγγιση δεν ήταν επιτυχής, αλλά περιστασιακά, για λόγους που δεν είναι ξεκάθαροι, παρατηρήθηκε καλή ανταπόκριση, προσφέροντας ικανό κίνητρο για να συνεχιστεί η έρευνα” [1]. Γιατί λοιπόν η επιμονή σε αυτή τη μορφή θεραπείας; Από τη μία μεριά, υπάρχει η κλινική ανταπόκριση κάποιων ασθενών που ωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών επιτυχίας ή αποτυχίας και από την άλλη το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της ανοσοθεραπείας, το γεγονός πως δεν πλήτει ίδια στοιχεία του οργανισμού.

Στην προσπάθεια να επιλεγούν τα καταλληλότερα αντιγόνα για χρήση στην ανοσοθεραπεία, τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωρισθεί πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ειδικά αντιγόνα των όγκων και τα οποία φαίνεται να παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην απάντηση του ανοσιακού συστήματος έναντι κακοηθειών. Μερικά από τα αντιγόνα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές εμβολιασμού, κυρίως σε ασθενείς με μελάνωμα, αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, ένα μικρό μόνο ποσοστό των ασθενών, που δεν ξεπερνά το 5%, παρουσίασε υποχώρηση του όγκου έπειτα από εμβολιασμό με πεπτίδια και μάλιστα, η υποχώρηση αυτή ήταν συνήθως μικρής διάρκειας. Η αιτία αυτού ίσως σχετίζεται με τους μηχανισμούς διαφυγής του καρκίνου από την ανοσιακή απάντηση, αλλά και την επιλογή των αντιγόνων που χρησιμοποιούνται στους εμβολιασμούς. Σαφώς, υπάρχει η ανάγκη κατανόησης των μηχανισμών διαφυγής του όγκου που σχετίζονται με τη ποιότητα και την ένταση της απάντησης, ενώ παράλληλα η καλύτερη επιλογή αντιγόνων των όγκων που επάγουν κυτταρολυτική CD8⁺ T-κυτταρική απάντηση, αποτελεί ίσως την πιθανότερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου με ανοσοθεραπεία.

Η έκφραση των πρωτεϊνών MAGE-A3 και MAGE-A1 έχει μελετηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα και πεπτίδια των πρωτεϊνών αυτών έχει βρεθεί πως επάγουν σημαντική T κυτταρική απάντηση σε ποικιλία καρκινικών τύπων και ιδιαίτερα στο μελάνωμα. Από τα κυριότερα ερωτήματα στα οποία η έρευνα καλείται να δώσει απάντηση είναι εάν τα

αντιγόνα αυτά που εκφράζονται στον καρκίνο του πνεύμονα μπορούν να επάγουν CD8 T απάντηση στους ασθενείς και αν η απάντηση αυτή διαφέρει σε ένταση και ποιότητα από την προϋπάρχουσα απάντηση σε φυσιολογικούς μάρτυρες.

Ανεξάρτητα από τη συχνότητα και την παρουσία T ειδικών κυττάρων έναντι του όγκου, για να είναι η ανοσιακή απάντηση επαρκής, θα πρέπει τα κύτταρα αυτά να είναι και λειτουργικά. Άγνωστος παραμένει ο λόγος για τον οποίο τα αντιγονοειδικά CD8 T κύτταρα δεν καταστρέφουν τελικά τους όγκους, εφόσον αναγνωρίζουν τα καρκινικά αντιγόνα και ανιχνεύονται σε σημαντικούς αριθμούς στο αίμα ασθενών. Ακόμη, δεν έχει προχωρήσει ο χαρακτηρισμός των κλώνων αυτών σε επίπεδο δραστηριότητας, ώστε να διαπιστωθούν ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές που ενδεχομένως υπάρχουν σε κλώνους που ανιχνεύονται σε υγιή άτομα σε σχέση με ασθενείς με καρκίνο.

Ο στόχος της ανοσοθεραπείας είναι η ενίσχυση της προϋπάρχουσας απάντησης. Είναι, όμως, πολύ πιθανό η απάντηση έναντι στα αντιγόνα των όγκων να απαντάται σε πολύ χαμηλή συχνότητα ή να έχει κατασταθεί ανεργική. Σε αυτή τη περίπτωση ο επακόλουθος εμβολιασμός δεν θα έχει καμία επίδραση και φυσικά δεν αναμένεται κλινική ανταπόκριση. Οπότε, η παρουσία ή απουσία, το μέγεθος και η λειτουργικότητα της απάντησης αυτής είναι κρίσιμα στοιχεία για την έκβαση της θεραπείας σε κάθε ασθενή. Εμπεριστατωμένα στοιχεία για το μέγεθος και την δραστηριότητα της προϋπάρχουσας απάντησης λείπουν από τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρονται σε μεμονωμένες περιπτώσεις ασθενών και μελετήθηκαν σε σύγκριση με την απάντηση στη θεραπεία. Για να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε σωστά την προϋπάρχουσα απάντηση θα πρέπει να τη συγκρίνουμε με την απάντηση σε υγιείς, ώστε η μόνη παράμετρος να είναι η παρουσία του παράγοντα που την ενεργοποιεί, η ύπαρξη δηλαδή του όγκου.

Συνεπώς, υπάρχει η ανάγκη για την πλερέστερη κατανόηση της ανοσιακής απόκρισης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα τόσο σε επίπεδο συχνότητας, αλλά και σε επίπεδο λειτουργικότητας. Αυτός ήταν και ο στόχος της παρούσας μελέτης, η αναζήτηση CTL κλώνων έναντι επιτόπων των πρωτεϊνών MAGE-A3 και MAGE-A1 στο αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και ο ποσοτικός και ποιοτικός χαρακτηρισμός τους σε σύγκριση με αντίστοιχους κλώνους που ενδεχομένως ανιχνεύονται σε υγιή άτομα με την χρήση εξελιγμένων τεχνικών μεγάλης ευαισθησίας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι μέγιστης σημασίας για την αξιολόγηση της έναντι του όγκου ανοσιακής απάντησης και το σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών στρατηγικών εμβολιασμού στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του χρηματοδοτούμενου από την Ευρωπαϊκή Ένωση ερευνητικού προγράμματος IRTALUNG. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Επίκ. Καθηγητή κ. Ματθαίο Σπελέτα και Αναπλ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Καθηγητή κ. Αναστάσιο Γερμενή για την ευκαιρία που μου έδωσε και κυρίως για την υποστήριξη, υλική και ψυχολογική, ώστε να είναι δυνατή η ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Ακόμη περισσότερο τον ευχαριστώ για τα μαθήματα ζωής. Στον Αναπλ. Καθηγητή κ. Βάιο Καρανίκα εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου για τη βοήθεια, τη στήριξη και την ανεκτίμητη καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα.

Η έρευνα αυτή, εξαιτίας της πολλαπλότητας και πολυπλοκότητας των πειραμάτων, δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη σημαντική τεχνική υποστήριξη πολλών ανθρώπων. Γι' αυτό το λόγο, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον D. Colau από το ίδρυμα Cancer Research Institute, Brussels, Belgium και ιδιαίτερα τον Prof. P. Coulie και για την ευγενή προσφορά των HLA-πολυμερών και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τις επισκέψεις του στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας.

Ευχαριστώ τη Διευθύντρια του Δρακοπούλειου Κέντρου Αιμοδοσίας του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού κ. Ελένη Πολυχρονάκη και την κ. Ρωξάνη Συριοπούλου για την παροχή του πλάσματος που χρησιμοποιήθηκε στις κυτταροκαλλιέργειες.

Το προσωπικό του Εργαστηρίου Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και ιδιαίτερα τον υπεύθυνο του τμήματος Επίκ. Καθηγητή κ. Παναγιώτη Γεωργούλια για την άδεια χρήσης του μετρητή ακτίνων-γ και την άριστη συνεργασία.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής, Αναπ. Καθηγητή κ. Κων/νο Κάππα, την Επίκ. Καθηγήτρια κ. Κυριακή Θεοδώρου, τον Λέκτορα κ. Ιωάννη Τσούγκο και το λοιπό προσωπικό του Εργαστηρίου για τη δυνατότητα χρήσης του μαγνητικού επιταχυντή.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής Καθηγητή κ. Κων/νο Ι. Γουργουλιάνη για την αμέριστη συμπαράστασή του και από καρδιάς την κ. Νόρα Κερενίδη, καθώς και το λοιπό ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Πνευμονο-

λογικής Κλινικής για τη βοήθεια και την άψογη συνεργασία τους κατά τη συλλογή του υλικού των ασθενών.

Επιθυμώ να τονίσω ιδιαίτερα την πολύτιμη κριτική και τις υποδείξεις πάνω στην πορεία της μελέτης, οι οποίες έγιναν από πολλά μέλη των ερευνητικών εργαστηρίων της χώρας κατά τις συναντήσεις τους, στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, στη Λάρισα και αλλού. Τους ευχαριστώ όλους θερμότατα.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τη Φαίη Σούκου για τις ατελείωτες ώρες συνεργασίας μας, τη βοήθεια, την υποστήριξη και την ατέλειωτη ενέργεια, χωρίς την οποία δεν θα είχαμε ευχαριστηθεί το ταξίδι που κάναμε μαζί.

Ευχαριστώ, τη Φανή Καλαλά που μοιράστηκε τις γνώσεις της στην κυτταρομετρία ροής, τον Κωνσταντίνο Τσολή για όλη τη βοήθεια του, την Αγγελική Μπάρδα, το Γεδεών Λουλέ, το Στέφανο Τσόχα, καθώς και την υπόλοιπη ομάδα της Μονάδας Ανοσολογίας Καρκίνου, τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές με τους οποίους μοιραστήκαμε το χώρο εργασίας, τις ανησυχίες και τους προβληματισμούς μας και περάσαμε μαζί τόσα χρόνια καλής συνεργασίας και ευχάριστης ατμόσφαιρας και τους εύχομαι από την καρδιά μου καλή σταδιοδρομία. Αν έμαθα κάτι σε όλη αυτή τη διαδικασία, είναι ότι δεν μπορούμε να προχωρήσουμε χωρίς βοήθεια και στήριξη από τους συνεργάτες μας και τους ευχαριστώ όλους για αυτό.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1MW (1-Methyl-Tryptophan)	1-μέθυλο-τρυπτοφάνη
2ME (2-mercaptoethanol)	2-μερκαπτεθανόλη
7-AAD (7-amino actinomycin D)	7-άμινο ακτινομυκίνη D
ACT (Adoptive Cell Transfer Therapy)	Παθητική μεταφορά T κυττάρων
APC (Antigen Presenting Cell)	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
b2m (b2-microglobulin)	β2-μικροσφαιρίνη
BFA (Brefeldin A)	Βρεφελντίνη A
CCR (CC Chemokine Receptor)	Υποδοχέας για τις CC χημειοκίνες
⁵¹Cr (Chromium 51)	Χρώμιο 51
CT antigens (Cancer/Testis Antigens)	Καρκινικά αντιγόνα βλαστικής σειράς
CTL (Cytolytic T Lymphocyte)	CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος
DC (Dendritic cell)	Δενδριτικό κύτταρο
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Διμέθυλο σουλφοξείδιο
EBV (Epstein Barr Virus)	Ιός Epstein Barr
EBV-B (EBV transformed B cells)	EBV-B μετασχηματισμένα κύτταρα
ECD (Phycoerythrin-Texas Red-x)	Φυκοερυθρίνη-Texas Red-x
EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid)	
FA-PBS (Formaldehyde-PBS)	Διάλυμα φορμαλδεΐδης-PBS
FBS (Fetal Bovine Serum)	Βοδινός ορός
FITC (Fluorescein)	Φλουοροσκεΐνη
HLA (Human Leukocyte Antigen)	Ανθρώπινα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας
HS (Human Serum)	Ανθρώπινος ορός
IDc (Iscove's complete medium)	Iscove's θρεπτικό μέσο
IFN (Interferon)	Ιντερφερόνη
IL (Interleukin)	Ιντερλευκίνη
LN₂ (Liquid Nitrogen)	Υγρό άζωτο
mAb (monoclonal Antibody)	Μονοκλωνικό αντίσωμα
MAGE (Melanoma Antigen-Encoding gene)	Γονίδιο που κωδικοποιεί αντιγόνα μελανώματος
MEM (Non essential aminoacids solution)	Διάλυμα αμινοξέων
MHC (Major Histocompatibility Complex)	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

MIC (MHC class I related chain)	ΜHC τάξης I αλυσίδα
ΜΚΠ	Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα
ΜΜΚΠ	Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα
NK (Natural Killer)	Φυσικά κυτταροκτόνο κύτταρο
NKT (Natural Killer T cell)	Φυσικό κυτταροκτόνο Τ κύτταρο
NSCLC (Non Small Cell Lung Cancer)	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells)	Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Ουδέτερο διάλυμα φωσφορικού άλατος
PC5 (Phycoerythrin-Cyanine-5)	Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-5
PC7 (Phycoerythrin-Cyanine-7)	Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-7
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PCR-SSP (PCR Sequence Specific Primer)	PCR με εκκινητές ειδικής αλληλουχίας για κάθε αλληλίο
PE (Phycoerythrin)	Φυκοερυθρίνη
pi (Positivity Index)	Βαθμός έκφρασης
PSG (Penicillin Streptomycin Glutamine)	Διάλυμα πενικιλίνης στρεπτομυκίνης γλουταμίνης
RT (Room Temperature)	Θερμοκρασία δωματίου
SCLC (Small Cell Lung Cancer)	Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
TAA (Tumor Associated Antigens)	Σχετιζόμενα με τον όγκο αντιγόνα
TCR (T Cell Receptor)	Υποδοχέας των Τ-κυττάρων
TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes)	Λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο
TNF-α (Tumor Necrosis Factor -α)	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand)	Σχετιζόμενος με τον TNF συνδέτης που επάγει την απόπτωση
Treg (T Regulatoty Cell)	Τ ρυθμιστικό κύτταρο
TSA (Tumor Specific Antigens)	Ειδικά του όγκου αντιγόνα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

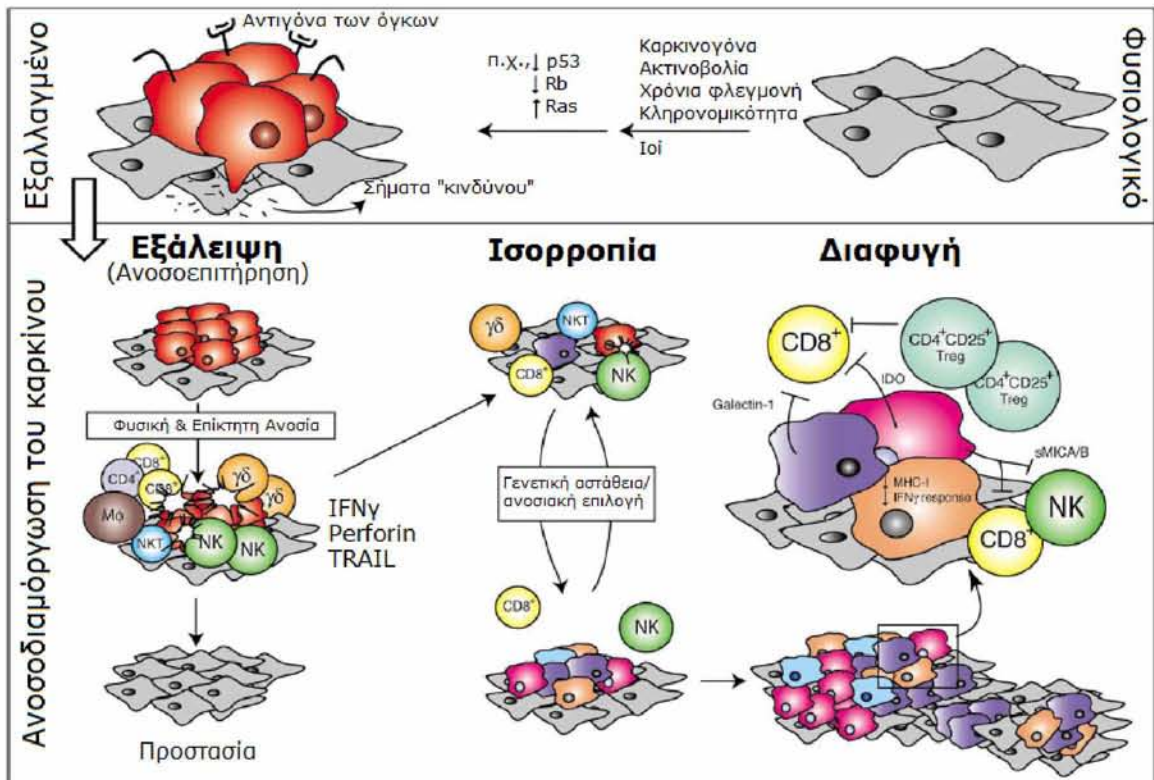
Ο καρκίνος είναι μία καταστροφική ασθένεια που πλήττει ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ατόμων ανά τον κόσμο. Παρά την πρόοδο στις υπάρχουσες τεχνικές αντιμετώπισής του, η θνησιμότητα σε πολλούς καρκινικούς τύπους παραμένει υψηλή, κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών μορφών θεραπείας. Σήμερα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε μερικούς από τους μηχανισμούς της πολύπλοκης σχέσης του καρκίνου με το ανοσιακό σύστημα, ενώ κάποιοι άλλοι παραμένουν ακόμη αδιευκρίνιστοι. Για να είναι δυνατόν να γίνουν τα ερευνητικά μας ερωτήματα κατανοητά, θα αναφερθούμε στην υπάρχουσα γνώση όσον αφορά τη σχέση του καρκίνου με την ανοσιακή απάντηση, την ανάγκη για εναλλακτικές μορφές θεραπείας και την αλληπίδραση των CD8 T κυττάρων με τα καρκινικά κύτταρα

1.1. Η ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΑΝΟΣΟΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ

Η σχέση του ανοσιακού συστήματος με τον καρκίνο έχει αποτελέσει, εδώ και έναν αιώνα περίπου, αντικείμενο εντονότατου ενδιαφέροντος και μελέτης. Η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων αποτελεί ένα συχνό γεγονός το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις δεν οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων. Αυτό, ως ένα βαθμό, φαίνεται ότι οφείλεται στη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος που είναι ικανό να εντοπίζει και να καταστρέφει, τα εξαλλασσόμενα και ενδεχομένως επικίνδυνα κύτταρα. Η άποψη αυτή, η οποία προτάθηκε αρχικά από τον Ehrlich το 1909, και 50 χρόνια αργότερα παρουσιάστηκε από τους Burnett και Thomas, ονομάζεται θεωρία της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου. Σύμφωνα με αυτήν, τα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν με μεγάλη συχνότητα στον οργανισμό αναγνωρίζονται ως ξένα και εξαλείφονται από τη δράση του ανοσιακού συστήματος [2]. Κατόπιν αυτού, οι όγκοι δημιουργούνται όταν τα καρκινικά κύτταρα κατορθώσουν να διαφύγουν από την επιτήρηση του ανοσιακού συστήματος.

Γνωρίζουμε, πλέον, πως το ανοσιακό σύστημα, όχι μόνο καταστρέφει αλλά και διαμορφώνει την εξέλιξη του καρκινικού κυττάρου και πως η σχέση αυτή είναι αμφίδρομη [3,4]. Η ανοσοεπιτήρηση αντιπροσωπεύει μόνο τη μία διάσταση της σύνθετης σχέσης ανάμεσα στο ανοσιακό σύστημα και τον καρκίνο και η σχέση αυτή καθορίζεται από τη δυναμική αλληλεπίδραση της ανοσιακής απάντησης και των καρκινικών κυττάρων καθόλη την ανάπτυξη του όγκου [4]. Το μοντέλο που προκύπτει στηρίζεται στην υπόθεση της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου που αποτελείται από τρεις φάσεις: τη φάση εξάλειψης, ισορροπίας και διαφυγής (**Εικ.1**).

Η φάση της εξάλειψης αντιπροσωπεύει την κλασική έννοια της ανοσοεπιτήρησης, στην οποία τα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν με μεγάλη συχνότητα στον οργανισμό αναγνωρίζονται ως ξένα και εξαλείφονται από τη δράση του ανοσιακού συστήματος. Η φάση της ισορροπίας είναι η λανθάνουσα περίοδος μετά την μη αποτελεσματική



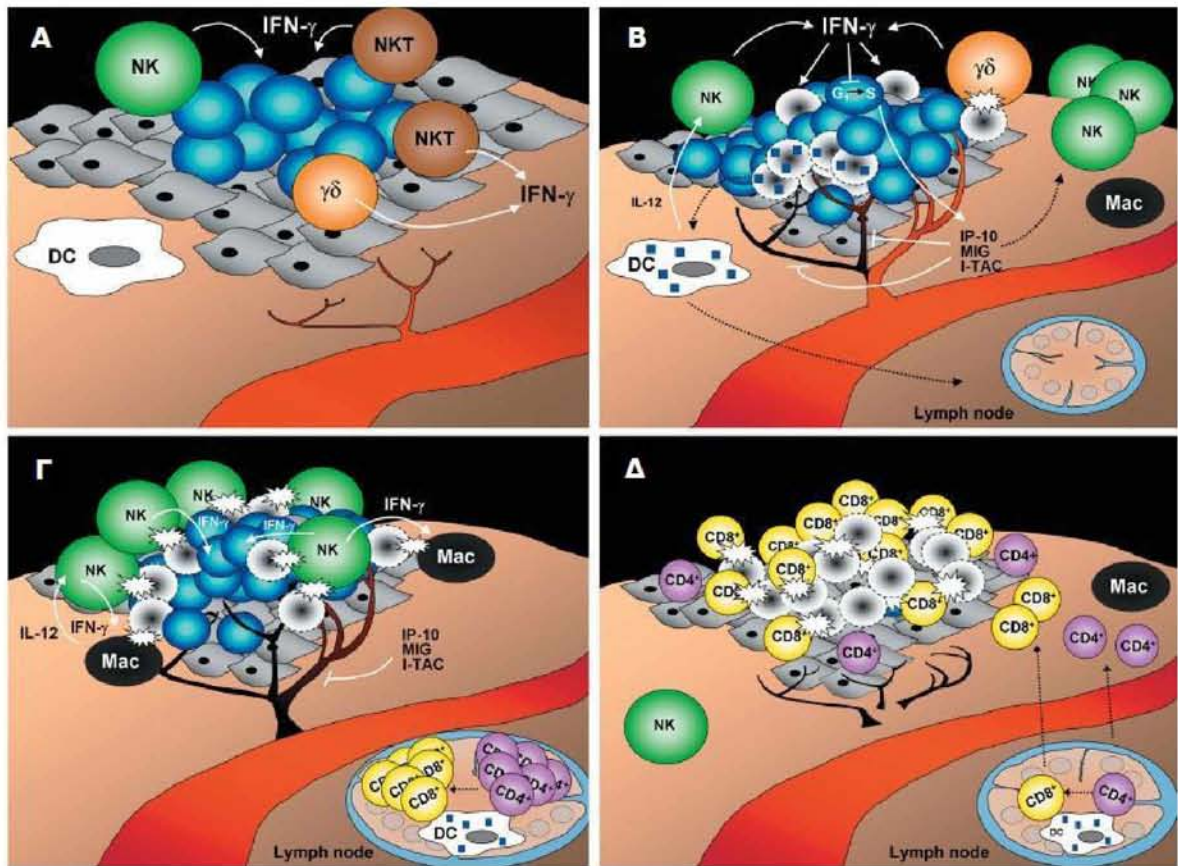
Εικόνα 1: Οι τρεις φάσεις της ανοσοδιαμόρφωσης. Τα φυσιολογικά κύτταρα (γκρι) που υπόκεινται σε ογκογονικά ερεθίσματα, τελικώς μεταλλάσσονται και μετατρέπονται σε καρκινικά (κόκκινο) (επάνω). Ακόμη και σε πρώιμα στάδια της ογκογένεσης, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εκφράζουν ειδικούς δείκτες και να παράγουν σήματα κινδύνου, τα οποία ενεργοποιούν την διαδικασία της ανοσοεπιτήρησης (κάτω). Στην πρώτη φάση της εξάλειψης, κύτταρα και μόρια της φυσικής και επίκτητης ανοσίας μπορούν να καταστρέψουν τον αναπτυσσόμενο όγκο. Ωστόσο, εάν η διαδικασία αυτή δεν είναι επιτυχής, τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στη φάση ισορροπίας στην οποία διαμορφώνονται από την ανοσιακή επιλογή δημιουργώντας συνεχώς νέες παραλλαγές. Σταδιακά, κάποιο από αυτά τα κύτταρα μπορεί να έχει το πλεονέκτημα της διαφυγής από την ανοσιακή επιτήρηση μέσω ποικίλων μηχανισμών και να εξελιχθεί σε κλινικά ανιχνεύσιμο όγκο [4].

απαλοιφή του όγκου κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν συνεχώς λόγω της γενετικής αστάθειας περιορίζονται από τη δράση της ανοσιακής απάντησης. Η διαφυγή αναφέρεται στο τελικό στάδιο της ανάπτυξης του όγκου που προκύπτει όταν τα καρκινικά κύτταρα διαφύγουν στο στάδιο της ισορροπίας από την ανοσιακή αναγνώριση και καταστροφή.

Αν και αμφισβητήθηκε για πολλά χρόνια είναι πλέον καθολικά αποδεκτό ότι το ανοσιακό σύστημα μπορεί να αλληλεπιδράσει και να επηρεάσει την ανάπτυξη του καρκίνου [5]. Η θεωρία της ανοσοεπιτήρησης βασίστηκε: i) σε παρατηρήσεις επιδημιολογικών ερευνών στις οποίες ανοσοκατεσταλμένα άτομα και άτομα με ανοσοανεπάρκεια εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ii) ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις πρωτογενών και μεταστατικών όγκων που δείχνουν θετική συσχέτιση της παρουσίας

TILs και αυξημένης επιβίωσης των ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνου και iii) παρουσία CD8 T κυττάρων σε TILs, που σε *in vitro* καλλιέργεια, παρουσία IL-2, δείχνουν ισχυρή δραστηριότητα έναντι του όγκου [6].

Το μοντέλο που έχει προταθεί για την αναγνώριση και καταστροφή των καρκινικών κυττάρων αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν κύτταρα της ειδικής και μη ειδικής ανοσίας (**Εικ. 2**). Η διαδικασία ξεκινάει όταν ο όγκος αναπτυχθεί πάνω από ένα όριο, το οποίο μένει να καθορισθεί. Μεγαλώνοντας, απαιτεί συνεχώς μεγαλύτερη παροχή αίματος και εισβάλλει στον παρακείμενο ιστό. Η ανάπτυξη αυτή προκαλεί μικρή έκταση διάρρηξη του ιστού και παραγωγή φλεγμονωδών σημάτων. Στην έναρξη της ανοσιακής απάντησης συμμετέχουν κύτταρα της φυσικής ανοσίας (NK, NKT και γδ T κύτταρα, δενδριτικά και μακροφάγα), τα οποία αναγνωρίζουν τα μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα που έχουν συσσωρευτεί [3]. Τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται από την παρουσία των καρκινικών κυττάρων και παράγουν IFN-γ, ξεκινώντας έτσι ένα καταρράκτη δράσεων της μη ειδικής άμυνας (**Εικ. 2Α**). Επάγεται η παραγωγή χημειοκινών και αγγειοστατικών παραγόντων, όπως οι CXCL10 (IP-10), CXCL9 (MIG) και CXCL11 (I-TAC), που μπλοκάρουν την αγγειογένεση και δρουν στη στρατολόγηση NK κυττάρων, δενδριτικών, μακροφάγων και άλλων ανοσοδραστικών κυττάρων στην περιοχή του όγκου. Στο σημείο του όγκου, τα μακροφάγα και NK κύτταρα που κινητοποιούνται ασκούν κυτταρολυτική δράση, ενώ παράλληλα η παραγωγή της IFN-γ έχει αρνητική δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (**Εικ. 2Β**). Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε καταστροφή κάποιων καρκινικών κυττάρων μέσω ανοσολογικών και μη ανοσολογικών μηχανισμών. Στη συνέχεια, τα νεκρά καρκινικά κύτταρα ή θραύσματα καρκινικών κυττάρων φαγοκυτταρώνονται από δενδριτικά κύτταρα, τα οποία ωριμάζουν, μεταναστεύουν στους λεμφαδένες και παρουσιάζουν αντιγόνα των όγκων σε παρθένα λεμφοκύτταρα που εδρεύουν εκεί (**Εικ. 2Γ**). Τα αντιγονοειδικά CD4 και CD8 T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και επιστρέφουν στο σημείο του όγκου, όπου καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν (**Εικ. 2Δ**) [7]. Την ανάπτυξη του όγκου περιορίζουν επίσης η δράση των NK κυττάρων και των ενεργοποιημένων μακροφάγων, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν παράγοντες όπως ο TNF, η περφορίνη και παράγωγα ριζών οξυγόνου και αζώτου. Εάν, η ανοσιακή απάντηση είναι επιτυχής έχει ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική καταστροφή του όγκου, διαφορετικά το σύστημα εισέρχεται στη φάση ισορροπίας.



Εικόνα 2: Το προτεινόμενο μοντέλο της φάσης εξάλειψης στη θεωρία της ανοσοδιαμόρφωσης.

Στη φάση αυτή, η ανοσιακή απάντηση και τα καρκινικά κύτταρα που επιβίωσαν της εξάλειψης εισέρχονται σε δυναμική ισορροπία. Στη διαδικασία αυτή, τα λεμφοκύτταρα και η δράση της IFN- γ ασκούν ισχυρή πίεση επιλογής στα καρκινικά κύτταρα, η οποία είναι ικανή να περιορίσει, αλλά όχι να εξαλείψει πλήρως το καρκινικό στρώμα, που περιλαμβάνει γενετικά ασταθή και συνεχώς εξαλλασσόμενα καρκινικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, που μπορεί να διαρκεί πολλά χρόνια, κάποια από τα αρχικά στελέχη καταστρέφονται, αλλά προκύπτουν διαρκώς νέα στελέχη με διαφορετικές μεταλλάξεις που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα αυξανόμενη ανοχή στην ανοσιακή επιτήρηση [2].

Στη φάση διαφυγής επιβιώνουν τα καρκινικά στελέχη που έχουν αποκτήσει ανοχή στην ανοσιακή επιτήρηση μέσω γενετικών ή και επιγενετικών μηχανισμών (**Πiv. 1**). Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες: σε μηχανισμούς που μειώνουν ενεργά την ανοσιακή απάντηση έναντι του όγκου και σε μηχανισμούς, με τους οποίους τα κύτταρα των όγκων αποφεύγουν την αναγνώριση και καταστροφή που μεσολαβείται από τα T κύτταρα [6]. Εφόσον διαφύγουν της ανοσιακής επιτήρησης τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται χωρίς έλεγχο, οδηγώντας σε κακοήθεια που παρατηρείται κλινικά και αν δεν ελεγχθεί μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του φέροντος.

Πίνακας 1: Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής

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

1.2. CD8 T ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

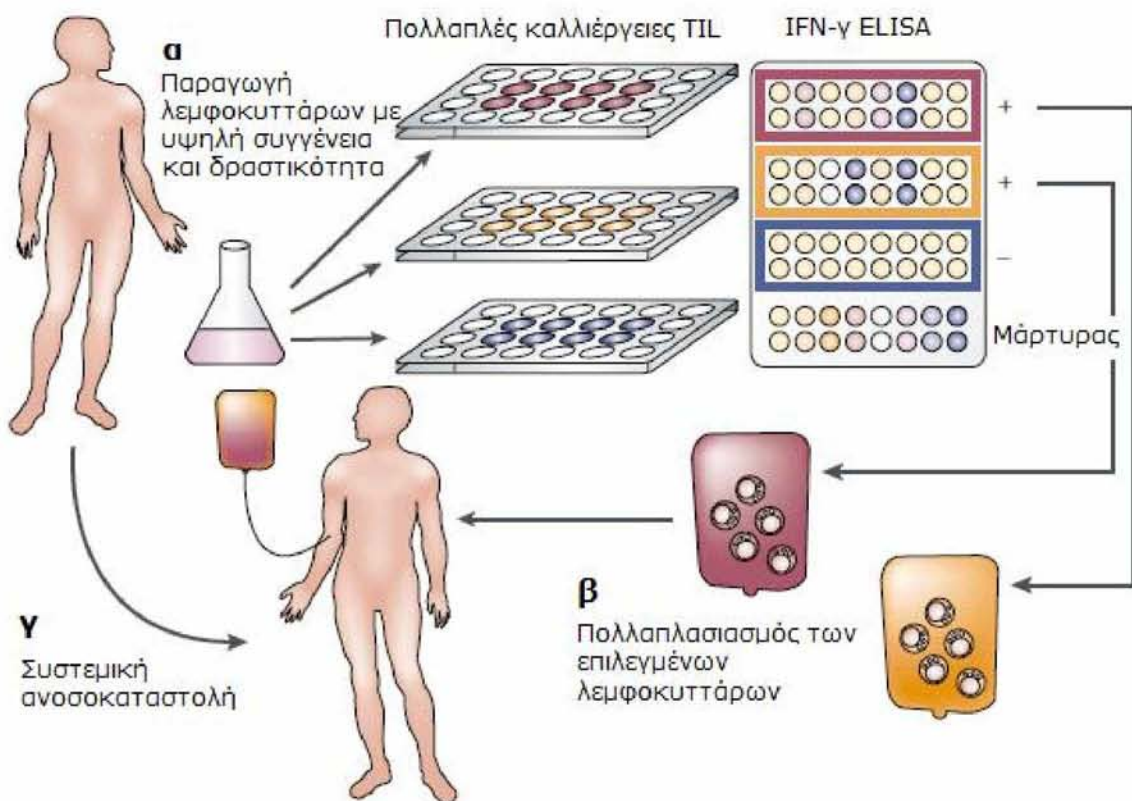
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κυτταρική ανοσία συνδέεται άμεσα με την ανοσική απόρριψη του καρκίνου. Συγκεκριμένα, τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αποτελούν το δραστικό στέλεχος της έναντι του όγκου ανοσιακής απάντησης. Κάθε CTL εκφράζει ένα κλωνοτυπικά μοναδικό υποδοχέα TCR που ανταποκρίνεται ειδικά σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα CTL αποτελούνται από πεπτιδικά τμήματα, τα οποία παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων από τα μόρια του συμπλέγματος MHC. Η επιτυχής σύνδεση του TCR με το κατάλληλο σύμπλοκο MHC/αντιγόνο σε συνδυασμό με συνδιεγερτικά σήματα στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου επάγουν τη δραστική του λειτουργία με αποτέλεσμα την καταστροφή του τελευταίου. Η μεσολαβούμενη από τα CTL κυτταροτοξικότητα προκαλεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο του κυττάρου στόχου, μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών (όπως ο TNF- α και η IFN- γ), την παραγωγή πρωτεϊνών που επάγουν την απόπτωση (συμπεριλαμβανομένων των FASL και TRAIL) και του μηχανισμού αποκοκκίωσης κυτταρολυτικών πρωτεϊνών (περφορίνης-γρανενζύμου) [8].

Από μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί σε ποντίκια προκύπτει πως τα CTL διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία της ανοσιακής απόρριψης του καρκίνου, καθώς αποδείχθηκε ότι: T κύτταρα διηθούν όγκους και μοσχεύματα που υπόκεινται σε ανοσολογική απόρριψη, η μεταφορά T λεμφοκυττάρων και όχι αντισωμάτων προσδίδει προστασία έναντι του όγκου και η απαλοιφή των ενδογενών CD8 T κυττάρων καταργεί κάθε αντικαρκινική και θεραπευτική ενέργεια [9]. Η επαγωγή των CD8 T κυττάρων μπορεί να εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως CD4 T κύτταρα και APCs, αλλά το δραστικό κύτταρο που θα επιφέρει τη καταστροφή του

καρκινικού κυττάρου είναι, κυρίως, το CD8 T κύτταρο [10]. Η ειδικότητα της διαδικασίας αυτής και τα ενθαρρυντικά δεδομένα από πειράματα σε ποντικούς οδήγησαν στον σχεδιασμό πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του καρκίνου που επικεντρώνονται στην ενίσχυση της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης έναντι του όγκου.

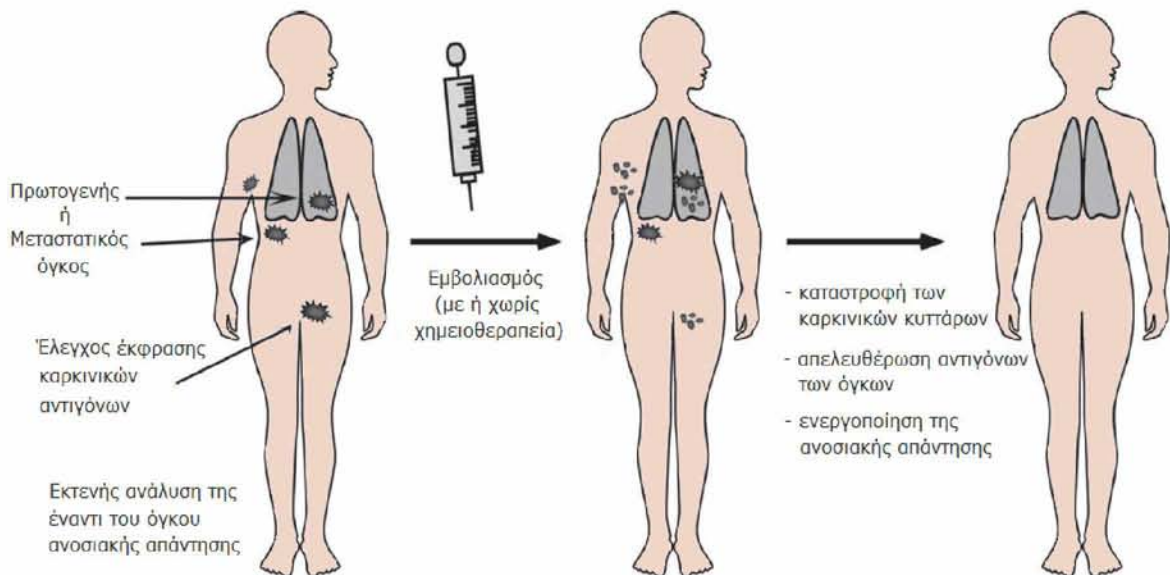
Η δυνατότητα χρήσης των ιδιοτήτων των T κυττάρων για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου προσεγγίζεται κυρίως με δύο τρόπους: την παθητική μεταφορά αντιγονοειδικών T κυττάρων και τον εμβολιασμό.

Στην πρώτη στρατηγική αντιγονοειδικά T κύτταρα πολλαπλασιάζονται *ex vivo* και στη συνέχεια επανεγχέονται στους ασθενείς. Στην προσέγγιση αυτή επιλέγονται CTL με τα καταλληλότερα χαρακτηριστικά, όπως υψηλή συγγένεια, ειδικότητα και δραστηριότητα έναντι στο αντιγόνο που αναγνωρίζουν (**Εικ. 3.α**). Τα επιλεγμένα CTL στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και ενεργοποιούνται *ex vivo*, παρακάμπτοντας *in vivo* ρυθμιστικούς και κατασταλτικούς μηχανισμούς που επιβάλλονται από τον ξενιστή ή τον ίδιο τον όγκο (**Εικ. 3.β**). Παράλληλα, ο ασθενής υπόκειται σε συστηματική ανοσοκατασταλτική χημειοθεραπεία πριν την ACT, η οποία αφενός δεν επηρεάζει τα λεμφοκύτταρα που πολλαπλασιάστηκαν *ex vivo*, αφετέρου δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για να δράσουν (**Εικ. 3.γ**) [11].



Εικόνα 3: Παθητική μεταφορά T κυττάρων για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο.

Οι στρατηγικές εμβολιασμού περιλαμβάνουν την εισαγωγή τροποποιημένων αυτόλογων καρκινικών κυττάρων, καθώς και απομονωμένων καρκινικών αντιγόνων σε πρωτεϊνική μορφή, ως πεπτίδια (φυσικά ή τροποποιημένα), ή νουκλεϊκά οξέα που κωδικοποιούν για το αντιγόνο και εισέρχονται μεμονωμένα, με κυτταρικό ή γενετικό φορέα με και χωρίς ανοσοενισχυτικό [12]. Στόχος είναι η ανοσοποίηση των ασθενών μέσω της ενεργοποίησης της κυτταρικής ή/και χυμικής ανοσίας. Ανάμεσα στις διαφορετικές τεχνικές της ενεργητικής ανοσοθεραπείας ο εμβολιασμός με πεπτίδια έχει ευνοηθεί, καθώς είναι άμεσα εφικτός, μπορεί να παρακολουθείται εύκολα και προσφέρει χαμηλό κίνδυνο παρενεργειών που σχετίζονται με τη θεραπεία. Τα πρωτόκολλα εμβολιασμού στηρίζονται στη χρήση αντιγόνων που εκφράζονται από πρωτογενείς ή μεταστατικούς όγκους (**Εικ. 4**). Παράλληλα, είναι δυνατό να χορηγηθεί συμβατική χημειο- και ραδιοθεραπεία σε μία προσπάθεια επαγωγής της ανοσιακής απάντησης. Για την επιλογή των αντιγόνων και την αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι σημαντική η διερεύνηση της προϋπάρχουσας CTL απάντησης [13]. Τα πρωτόκολλα αυτά στηρίζονται στην παραδοχή πως η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που προκαλείται από το εμβόλιο μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση αντιγόνων των όγκων και την περαιτέρω ενεργοποίηση ανοσιακών μηχανισμών έναντι των καρκινικών κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την εξάλειψή τους. Γι' αυτό το σκοπό, διάφορα αντιγόνα των όγκων αναγνωρίστηκαν, αξιολογήθηκε η καταλληλότητά τους και εξετάστηκαν σε δοκιμές εμβολιασμού, όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια.



Εικόνα 4: Απεικόνιση των στρατηγικών ανοσοθεραπείας με εμβολιασμό [13].

1.3. ΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασής τους, τα αντιγόνα των όγκων κατατάσσονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: α) αντιγόνα διαφοροποίησης, τα οποία εκφράζονται σε φυσιολογικά και καρκινικά της ίδιας κυτταρικής σειράς κύτταρα, β) ειδικά των όγκων αντιγόνα, που εκφράζονται σε ποικίλους όγκους, αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς, με την εξαίρεση των αντιγόνων CT που εκφράζονται στους όρχεις και τον πλακούντα, γ) μεταλλαγμένα αντιγόνα, τα οποία στη φυσιολογική τους μορφή εντοπίζονται σε ποικίλους ιστούς, αλλά η μεταλλαγμένη τους δομή απαντάται μόνο σε καρκινικά κύτταρα και δ) υπερεκφραζόμενα αντιγόνα, τα οποία ανιχνεύονται σε μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στους καρκινικούς ιστούς, σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς [14]. Παραδείγματα της κάθε ομάδας αναγράφονται στον πίνακα 2, ενώ αναλυτικές πληροφορίες έχουν δημοσιευτεί από τους Novellino et al. [15]. Τέλος, μια ξεχωριστή κατηγορία αφορά αντιγόνα μολυσματικών παραγόντων, σε κακοήθειες στις οποίες έχει αποδειχθεί συσχέτιση της ανάπτυξης του όγκου με ιικές ή βακτηριακές μολύνσεις [16].

Πίνακας 2: Παραδείγματα αντιγόνων των όγκων

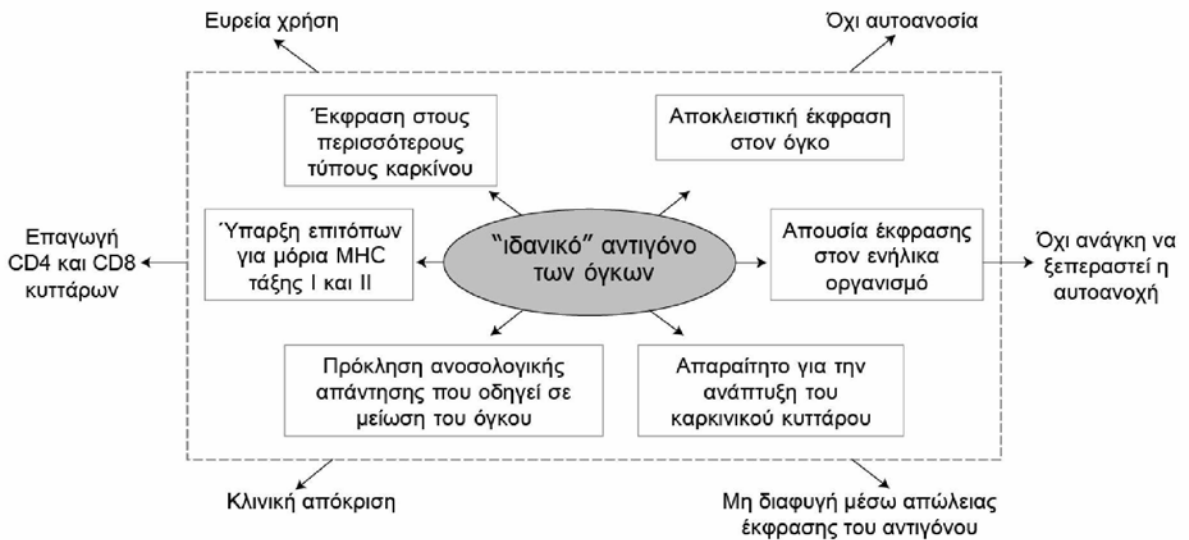
Αντιγόνο	Βιβλιογραφία
Αντιγόνα διαφοροποίησης	
MART-1/Melan-A	[17]
Gp100	[18]
Τυροσινάση	[19]
Σχετιζόμενη με τη τυροσινάση πρωτεΐνη 2	[20]
Ειδικά των όγκων κοινά αντιγόνα	
MAGE-A	[21]
BAGE	[22]
GAGE-1, GAGE-2 και GAGE-8	[23]
TRP-2/INT2	[24]
Ειδικά των όγκων μοναδικά αντιγόνα	
CDK-4	[25]
MUM-1	[26]
β-κατενίνη	[27]
Κασπάση 8	[28]
Υπερεκφραζόμενα αντιγόνα	
MUC1	[29]
Καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο	[30]
Καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης	[31]
Σαρβιβίνη	[32]

Από ολόκληρη την ακολουθία της πρωτεΐνης μόνο μικρές πεπτιδικές αλληλουχίες είναι ανοσογονικές. Οι ακολουθίες αυτές (επίτοποι) παρουσιάζονται από τα μόρια MHC σύμφωνα με κανόνες που επιβάλλονται από τις περιοχές που το πρωτεάσωμα τεμαχίζει την πρωτεΐνη και τις θέσεις πρόσδεσης του πεπτιδίου στη σχισμή του MHC μορίου [33]. Στις μέρες μας νέες τεχνολογίες επιτρέπουν τον ταχύτατο καθορισμό νέων αντιγόνων και αντιγονικών επιτόπων για τον καλύτερο σχεδιασμό ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων [14].

Η κλασική στρατηγική για την αναγνώριση αντιγόνων των όγκων αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90 [21] και χρησιμοποιεί ευαισθητοποιημένα *in vivo*, δραστικά T κύτταρα έναντι του όγκου που απομονώνονται από TILs ή PBL ασθενών με καρκίνο. Αυτά τα κύτταρα απομονώνονται και αναλύονται περαιτέρω για να χαρακτηριστεί ο επίτοπος που αναγνωρίζεται από τον ειδικό υποδοχέα του T κυττάρου. Λόγω δυσκολίας απομόνωσης ειδικών CTL σε πολλούς καρκινικούς τύπους για την αναγνώριση επιτόπων αντιγόνων των όγκων εφαρμόζεται μια εναλλακτική στρατηγική που ονομάζεται "αντίστροφη ανοσολογία" [34]. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι σε προγράμματα υπολογιστών (βλέπε <http://www.syfreithi.de/> και http://bimas.dcrct.nih.gov/molbio/hla_bind/) για να προβλέψουν αλληλουχίες στο αντιγόνο που μας ενδιαφέρει με συγκεκριμένο μοτίβο ώστε να προσδένονται σε επιλεγμένα HLA μόρια. Τα πεπτίδια στη συνέχεια συνθέτονται, εξετάζεται *in vitro* η ικανότητά τους να ενεργοποιούν παρθένα T κύτταρα χρησιμοποιώντας αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα και ελέγχεται εάν τα πεπτίδια επεξεργάζονται και παρουσιάζονται από καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν ενδογενώς το αντιγόνο και το κατάλληλο HLA μόριο. Μία διαφορετική προσέγγιση βασίζεται σε υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας και χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση ατομικών καρκινικών επιτόπων σε ασθενείς [35].

Στόχος είναι να αναγνωριστούν αντιγόνα με τα καταλληλότερα χαρακτηριστικά για την επαγωγή μιας επιτυχούς ανοσιακής απάντησης. Το "ιδανικό" αντιγόνο αναφέρεται πως θα πρέπει να εκφράζεται αποκλειστικά από τα καρκινικά και όχι από τα φυσιολογικά κύτταρα, για να αποκλειστεί η περίπτωση αυτοάνοσων επιπλοκών (**Εικ. 5**). Να εκφράζεται από το σύνολο των καρκινικών κυττάρων και την πλειοψηφία των καρκινικών τύπων. Η έκφρασή του να είναι απαραίτητη για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, να είναι ικανό να επάγει CD8 και CD4 T απαντήσεις και να έχει τη δυνατότητα να παρουσιάζεται από τα πιο συχνά HLA αλληλόμορφα, ώστε να καλύπτει μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Επιπλέον, τα αντίστοιχα πεπτίδια θα πρέπει να επεξεργάζονται αποτελεσματικά από τα καρκινικά κύτταρα και να εμφανίζονται με μεγάλη πυκνότητα σαν σύμπλοκα με τα MHC μόρια στην επιφάνεια του κυττάρου. Τέλος, θεωρείται αναγκαίο το επίπεδο της ανοσολογικής ανοχής στα αντιγόνα αυτά να είναι το ελάχιστο

δυνατόν [36]. Προς το παρόν, δεν έχουν αναγνωρισθεί αντιγόνα που να εκπληρώνουν το σύνολο των συνθηκών αυτών, ωθώντας την έρευνα στην αναζήτηση νέων αντιγόνων των όγκων. Στο μεταξύ, ο σχετικά μεγάλος αριθμός των αντιγόνων που έχουν βρεθεί μας επιτρέπει να επιλέξουμε ανάμεσα σε εκείνα που πληρούν τα περισσότερα από τα παραπάνω κριτήρια.



Εικόνα 5: Χαρακτηριστικά του ιδανικού για χρήση στην ανοσοθεραπεία καρκινικού αντιγόνου [37]

2. MAGEs ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

2.1. ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει πρωτεϊνικά αντιγόνα τα οποία φυσιολογικά εκφράζονται κυρίως στους αρσενικούς γαμέτες και όχι στα σωματικά κύτταρα των ενηλίκων, ωστόσο ενεργοποιούνται και ανιχνεύονται σε ένα ποσοστό σε ποικιλία καρκινικών τύπων. Παραδείγματα αντιγόνων CT και χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στον πίνακα 3.

Τα CT αντιγόνα θεωρούνται κατάλληλα μόρια στόχοι για το σχεδιασμό αντιγονοειδικών εμβολίων έναντι των όγκων. Κοινά χαρακτηριστικά των αντιγόνων αυτών, εκτός από το μοτίβο έκφρασης που περιορίζεται σε συγκεκριμένο ιστό, περιλαμβάνουν την ύπαρξη σε πολυγονιδιακές οικογένειες, συχνό εντοπισμό στο χρωμόσωμα X, ετερογενή πρωτεϊνική έκφραση στον καρκίνο, πιθανή συσχέτιση με την ανάπτυξη του όγκου, επαγωγή της έκφρασής τους μέσω απομεθυλίωσης ή/και ακετυλίωσης των ιστονών και ανοσογονικότητα σε ασθενείς με καρκίνο [38]. Από άποψη ανοσογονικότητας 14/29 CT οικογένειες επάγουν ανοσιακή απάντηση στους ανθρώπους [39]. Αυτόματες χυμικές και κυτταρικές ανοσιακές απαντήσεις έχουν ανιχνευθεί έναντι διαφόρων αντιγόνων CT, που περιλαμβάνουν τα αντιγόνα NY-ESO-1, MAGE-A και SSX [21, 40, 41, 42] και μάλιστα τα αντιγόνα MAGE-A και NY-ESO-1 έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές [43, 44].

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 44 οικογένειες γονιδίων CT, με 89 ξεχωριστά γονίδια ή ισομορφές και η έκφρασή τους μελετήθηκε σε πληθώρα καρκινικών τύπων (ανασκόπηση από Scanlan et al. [39]). Ανάλογα με τον καρκινικό τύπο παρατηρείται διαφορετική έκφραση των αντιγόνων CT, όπως ανιχνεύεται με RT-PCR. Καρκινικοί τύποι, όπως ο καρκίνος ουροδόχου κύστεως, ΜΜΚΠ και μελάνωμα παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό έκφρασης αντιγόνων CT (>50%), στον καρκίνο του μαστού και προστάτη τα ποσοστά είναι χαμηλότερα (30-37%), ενώ στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και στον καρκίνο του παχέως εντέρου χαρακτηρίζονται ως χαμηλά (9-16%). Σε φυσιολογικούς ιστούς, πειράματα έδειξαν πως 19/43 CT αντιγόνα έχουν έκφραση που περιορίζεται στους όρχεις, 10/43 έχουν έκφραση που περιορίζεται σε συγκεκριμένο ιστό, 9/43 είχαν διαφορετική έκφραση και 5/43 είχαν ευρεία έκφραση. Με την εξαίρεση των μεταγράφων που περιορίζονταν στους όρχεις, όλα τα υπόλοιπα CT εντοπίστηκαν σε φυσιολογικό πάγκρεας.

Πίνακας 3: Παραδείγματα αντιγόνων CT και χαρακτηριστικά τους [45].

Οικογένεια γονιδίων αντιγόνων CT	CT No	Αριθμός γονιδίων στην οικογένεια	Θέση στο χρωμόσωμα	Έκφραση κατά την ωρίμανση των γαμετών	Λειτουργία
MAGEA	CT1	12	Xq28	Σπερματογόνα	Μεταγραφικός συνκαταστολέας
MAGEB	CT3	4	Xp21-p22	PGCs	Άγνωστη
GAGE1	CT4	8	Xp11.4-p11.2	MK	Άγνωστη
SSX	CT5	5	Xp11.23-p11.22	MK	Μεταγραφικός καταστολέας
NY-ESO-1	CT6	3	Xq28	Σπερματογονία	Άγνωστη
MAGEC1	CT7	2	Xq26, 27.2	MK	Άγνωστη
MAGEC2	CT10	1	Xq27	MK	Άγνωστη
CTp11/SPANX	CT11	4	Xq27.1	Σπερματίδες	Άγνωστη
XAGE1/GAGE D	CT12	8	Xp11.22-p11.21	MK	Άγνωστη
SAGE1	CT14	1	Xq26	MK	Άγνωστη
PAGE5	CT16	2	Xp11.22	MK	Άγνωστη
NA88	CT18	1	Xp22.12	MK	Άγνωστη
IL13RA1	CT19	1	Xq24	MK	Υποδοχέας IL-13
CSAGE	CT24	2	Xq28	MK	Άγνωστη
CAGE	CT26	1	Xp22.13	Σπερματίδες Σπερματοζώα	Πιθανή ελικάση
HOM-TES-85	CT28	1	Xq23	MK	Πιθανή μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη
E2F-like/HCA661	CT30	1	Xq26.2	MK	Μεταγραφικός παράγοντας
NY-SAR-35	CT37	1	Xq28	MK	Άγνωστη
FTHL17	CT38	1	Xp21	Σπερματογόνα	Πιθανή πρωτεΐνη που μοιάζει με το βαρύ πολυπεπτιδίο της φεριτίνης
NXF2	CT39	1	Xq22.1	Σπερματογόνα	Εξαγωγή mRNA στο κυτταρόπλασμα
TAF7L	CT40	1	Xq22.1	Σπερματογόνα	Πιθανός παράγοντας πρόσδεσης πρωτεϊνών στο κουτί TATA
FATE1	CT43	1	Xq28	MK	Άγνωστη

PGCs: αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, MK: μη καθορισμένο

2.2. MAGEs

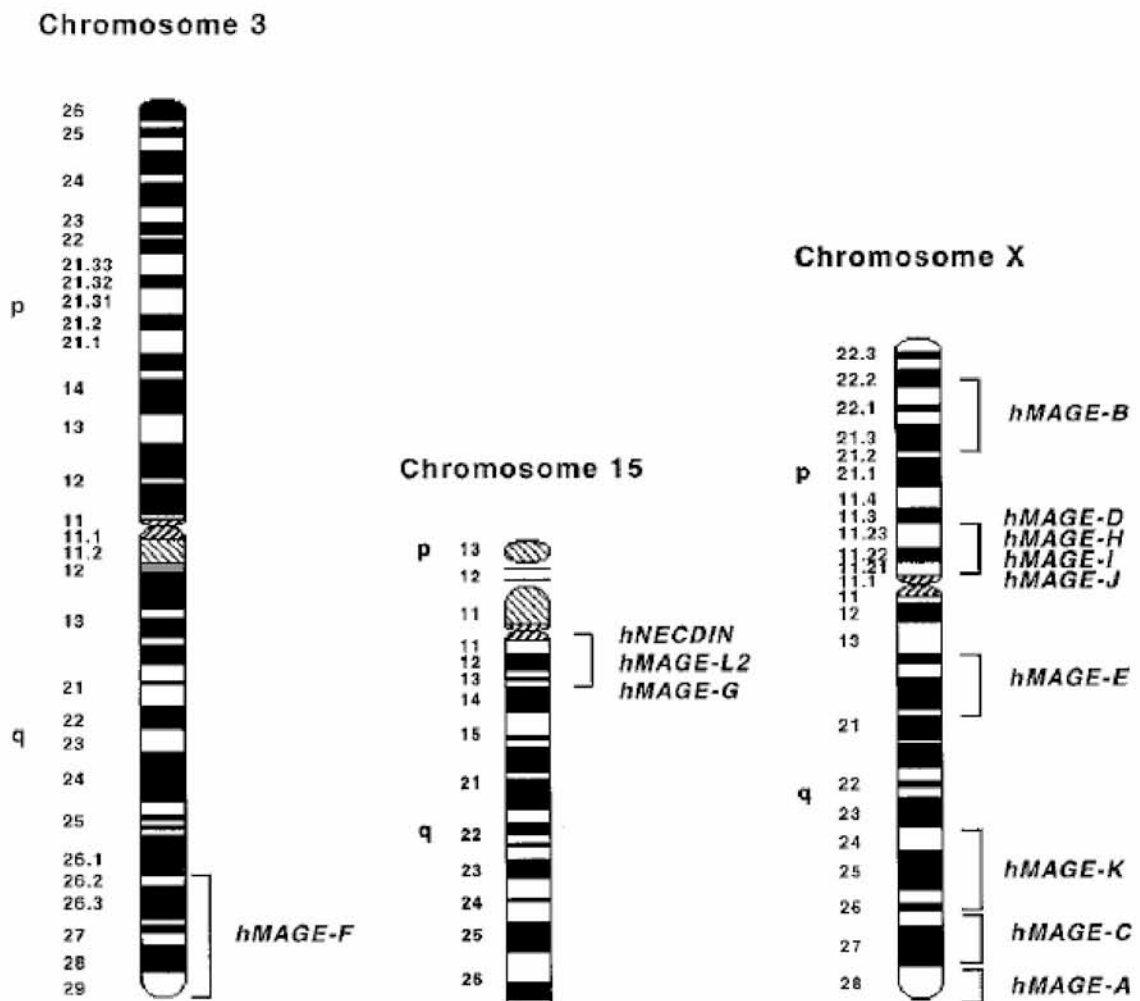
Το πρωτότυπο των αντιγόνων CT ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων MAGE. Η οικογένεια αυτή ήταν η πρώτη που αναγνωρίστηκε και μάλιστα τα πρώτα μέλη της ταυτοποιήθηκαν σαν γονίδια που κωδικοποιούν για ειδικά του όγκου αντιγόνα [21]. Το ιδιαίτερο πρότυπο έκφρασής τους και η αποκάλυψη πως κωδικοποιούν αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα CTL κατεύθυνε την έρευνα στη μελέτη της οικογένειας αυτής και τη χρήση διαφόρων μελών της σαν στόχους σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα.

Η οικογένεια γονιδίων MAGE αποτελείται από 24 γονίδια που ανήκουν σε τρεις κύριες υποοικογένειες: τις MAGE-A, -B και -C, οι οποίες εντοπίζονται σε τρεις διαφορετικές περιοχές του χρωμοσώματος X (**Εικ. 6**). Τα γονίδια MAGE που ανήκουν σε αυτές τις υποοικογένειες χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο τελικό εξώνιο που κωδικοποιεί για ολόκληρη την πρωτεΐνη. Αποσιωπούνται στους φυσιολογικούς ιστούς, με την εξαίρεση της βλαστικής σειράς των αρσενικών ατόμων και κάποια από αυτά εκφράζονται στον πλακούντα [46]. Εκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα ποικίλων ιστολογικών τύπων και μάλιστα η έκφρασή τους έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση (**Πιν. 4**) [47]. Η έκφραση των γονιδίων MAGE στους όγκους φαίνεται να προκαλείται από απομεθυλίωση του υποκινητή τους, ως αποτέλεσμα της γενικής διαδικασίας απομεθυλίωσης που παρατηρείται σε πολλούς καρκινικούς τύπους [48].

Σήμερα, στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν αναγνωριστεί έξι ακόμη υποοικογένειες γονιδίων MAGE (**Εικ. 6**) [46]. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται και στους φυσιολογικούς ιστούς. Ωστόσο, εξαιτίας της μικρής ομοιότητάς τους με τις ακολουθίες των τριών πρώτων υποοικογενειών, κανένα από τα αντιγονικά πεπτίδια των MAGE-A, -B, και -C δεν κωδικοποιείται από τα ευρέως εκφραζόμενα γονίδια MAGE, διατηρώντας την αυστηρή έναντι του όγκου ειδικότητα των αντιγόνων που κωδικοποιούνται από τα MAGE-A, -B, και -C γονίδια.

Βιολογική λειτουργία

Αν και έχουν μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια όσον αφορά την έκφρασή τους και τη χρήση τους στην ανοσοθεραπεία, η βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών MAGE στους γαμέτες, αλλά και στον καρκίνο, δεν έχει διευκρινιστεί. Το ερώτημα που τίθεται είναι εάν η έκφρασή τους συμβάλλει στην καρκινογένεση ή είναι ένα παραπροϊόν της διαδικασίας του κυτταρικού μετασχηματισμού. Καθώς φαίνεται τα γονίδια MAGE κωδικοποιούν πολυλειτουργικά ρυθμιστικά μόρια με ποικίλη δράση που συμβάλλουν άμεσα στον καρκινικό φαινότυπο και στην ανταπόκριση στη θεραπεία [45]. Έκφραση των γονιδίων MAGE υποστηρίζεται ότι προστατεύει τα κύτταρα από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της κακοήθειας [49].



Εικόνα 6: Υποοικογένειες των γονιδίων *MAGE* και χρωμοσωμικός εντοπισμός τους [46].

Πίνακας 4: Έκφραση των αντιγόνων *MAGE* σε καρκινικούς τύπους και συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους [47].

Καρκινικός τύπος	Αντιγόνο	Συσχέτιση
Μελάνωμα	MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4	Πυκνότητα όγκου και μετά- σταση
ΜΜΚΠ	MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, MAGE-C1	Προχωρημένος καρκινικός τύπος, λεμφαδενικό και παθολογικό στάδιο
Καρκίνος παγκρέατος	MAGE-A3	Χαμηλή επιβίωση
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	MAGE-C1	Μειωμένη ολική επιβίωση
Πολλαπλό μυέλωμα	MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-C1	Στάδιο και παράγοντας κινδύνου της ασθένειας
Καρκίνος των ωοθηκών	MAGE-A4	Αντίστροφη συσχέτιση έκφρασης με επιβίωση

Συγκεκριμένα για τη πρωτεΐνη *MAGE-A1* έχει βρεθεί πως δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας [50], αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στη διαφοροποίηση των κυττάρων και συμβάλλοντας στην καρκινογένεση. Έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας *MAGE-A* έχει βρεθεί πως προσδίδει πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού [51], αντοχή σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα [52] και αντοχή σε κυτταροτοξικότητα που μεσολαβείται από τον *TNF* [53].

Έκφραση

Ανεξάρτητα από τη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών, αυτό που ενδιαφέρει περισσότερο τους ερευνητές για τη χρήση τους σε θεραπευτικά πρωτόκολλα είναι η έκφρασή τους από τα καρκινικά κύτταρα και η ανοσογονικότητά τους. Αντιγόνα της υποοικογένειας *MAGE-A* ανιχνεύθηκαν σε πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους ποικίλων ιστολογικών τύπων, όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Η έκφραση καθενός από τα *MAGE-A* αντιγόνα ποικίλει ανάλογα με τον καρκινικό τύπο, αλλά η πλειοψηφία των όγκων εκφράζει τουλάχιστον ένα *MAGE-A* αντιγόνο [54]. Συγκεκριμένα, το *MAGE-A1* αντιγόνο εκφράζεται, ανάμεσα σε άλλα, στο 35% των δειγμάτων ΜΜΚΠ [55], στο 44% των καρκίνων στομάχου [56] και στο 40% των καρκινικών γραμμών και δειγμάτων ασθενών με μελάνωμα [57]. Αντίστοιχα, το *MAGE-A3* εκφράζεται στο 65% των δειγμάτων από μελάνωμα και σε άλλους καρκινικούς τύπους, όπως πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού (45%), ουροδόχου κύστεως (34%), σάρκωμα (22%) και καρκίνο του πνεύμονα σε ποσοστό 31% [58].

Πίνακας 5: Συχνότητα έκφρασης των αντιγόνων *MAGE-A* σε διάφορους καρκινικούς τύπους (από *Graff-Dubois et al.* [54])

Καρκίνος	Συχνότητα έκφρασης %					
	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A2</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>MAGE-A4</i>	<i>MAGE-A6</i>	<i>MAGE-A12</i>
Μελάνωμα	16	E	36	E	64	74
Κεφαλής/Λαιμού	25	42	33	8	N	N
Ουροδόχου κύστεως	21	30	35	33	15	9
Μαστού	6	19	10	13	5	N
Παχέως εντέρου	N	5	5	N	5	N
Πνεύμονα	21	30	46	11	8	N
Στομάχου	30	22	57	N	N	N
Ωοθηκών	55	32	20	E	20	N
Οστεοσάρκωμα	62	75	62	12	62	N
Ηπατοκαρκίνωμα	68	30	68	N	30	30
Νεφροκυτταρικό	22	16	76	30	N	N

E: εκφράζεται, αλλά η συχνότητα δεν αναφέρεται, N: Δεν υπάρχουν δεδομένα

Ανοσογονικότητα

Τα γονίδια MAGE κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν αρκετά αντιγονικά πεπτίδια ικανά να προσδένονται στα μόρια HLA τάξης I και II, να παρουσιάζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και να αναγνωρίζονται από τα T λεμφοκύτταρα [59]. Τα αντιγόνα αυτά χαρακτηρίζονται ειδικά του όγκου αντιγόνα, καθώς τα μόνα φυσιολογικά κύτταρα που τα εκφράζουν, τα σπερματογόνια, στερούνται HLA μορίων και δεν τα παρουσιάζουν [60, 61]. Ειδικά για τα γονίδια MAGE-A1 και MAGE-A3 έχει αναγνωρισθεί μεγάλος αριθμός αντιγονικών πεπτιδίων που παρουσιάζεται από ποικιλία HLA μορίων και αναγνωρίζονται από τα T κύτταρα (**Πιν. 6 και 7**) [62].

Την ανοσογονικότητα πεπτιδίων των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 ενισχύει η ύπαρξη αυτόματων απαντήσεων σε ασθενείς με καρκίνο. Καταρχήν, η ανακάλυψη των πρώτων αντιγονικών πεπτιδίων ήταν αποτέλεσμα της ανίχνευσης κυτταρολυτικών κλώνων σε ασθενείς με μελάνωμα [63], που στη συνέχεια αποκαλύφθηκε πως αναγνώριζαν και πεπτίδια των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 [64, 78]. Αντισώματα έναντι των MAGE-A1 και MAGE-A3 πρωτεϊνών έχουν βρεθεί στο 3% ασθενών με μελάνωμα [47], αποκαλύπτοντας την ύπαρξη και αυτόματων χυμικών απαντήσεων.

Πίνακας 6: Αντιγονικά πεπτίδια της πρωτεΐνης MAGE-A1 [62].

HLA ^α	Συχνότητα ^β HLA (%)	Πεπτίδιο	Θέση	Αναφορά
A1	26	EADPTGHSY	161-169	[64]
A2	44	KVLEYVIK	278-286	[65, 66]
A3	22	SLFRAVITK	96-104	[67]
A68	8	EYVDGREHSA	222-231	[67]
B7	17	RVRFFFPSL	289-298	[68]
B35	20	EADPTGHSY	161-169	[69]
B37	3	REPVTKAEML	120-129	[70]
B53	2	DPARYEFLW	258-266	[67]
B57	8	ITKKVADLVGF	102-112	[71]
Cw2	10	SAFPTTINF	62-70	[67]
Cw3	17	SAYGEPRKL	230-238	[67]
Cw16	7	SAYGEPRKL	230-238	[72]
DP4	75	TSCILESLFRAVITK	90-104	[73]
DP4	75	PRALAETSYVKVLEY	268-282	[73]
DR13	19	FLLLKYRAREPVTKAE	112-127	[74]
DR15	20	EYVIKVSARVRF	281-292	[75]

α: Τα τάξης II HLA μόρια αναγράφονται με πλάγια γραφή, *β:* Συχνότητα στους Καυκάσιους [76, 77]

Πίνακας 7: Αντιγονικά πεπτίδια της πρωτεΐνης *MAGE-A3* [62].

HLA ^α	Συχνότητα ^β HLA (%)	Πεπτίδιο	Θέση	Αναφορά
A1	26	EVDPIGHLV	168-176	[78]
A2	44	FLWGPRLV ^γ	271-279	[58]
A2	44	KVAELVHFL	112-120	[79]
A24	20	TFPDLESEF	97-105	[80]
A24	20	VAELVHFL	113-121	[81]
B18	6	MEVDPIGHLV	167-176	[82]
B35	20	EVDPIGHLV	168-176	[83]
B37	3	REPVTKAEM	127-136	[70]
B40	6	AELVHFLLL ^δ	114-122	[84]
B44	21	MEVDPIGHLV	167-176	[85]
B52	5	WQYFFPVIF	143-151	[86]
Cw7	41	EGDCAPEEK	212-220	[87]
DP4	75	KKLLTQHFVQENYLEY	243-258	[88]
<i>DQ6</i>	63	KKLLTQHFVQENYLEY	243-258	[89]
<i>DR1</i>	18	ACYEFLWGPRLVETS	267-282	[90]
<i>DR4</i>	24	VIFSKASSSLQL	149-160	[91]
<i>DR7</i>	25	VIFSKASSSLQL	149-160	[91]
<i>DR11</i>	25	GDNQIMPKAGLLIIV	191-205	[92]
<i>DR11</i>	25	TSYVKVLHMHVKISG	281-295	[93]
<i>DR13</i>	19	RKVAELVHFLLLKYRA	111-126	[74]
<i>DR13</i>	19	FLLLYRAREPVTKAE	119-134	[74]

α: Τα τάξης II HLA μόρια αναγράφονται με πλάγια γραφή, *β:* Συχνότητα στους Καυκάσιους [76,77], *γ:* Ισχνή επεξεργασία, όμως κάποια CTL αναγνωρίζουν HLA-A2 καρκινικά κύτταρα που το εκφράζουν, *δ:* Η επεξεργασία του πεπτιδίου αυτού απαιτεί το ανοσοπρωτεάσωμα

Στη συνέχεια, πολυάριθμες μελέτες ανακάλυψαν διάφορα *MAGE-A1* πεπτίδια που αναγνωρίζονται από CD8 ή CD4 T κύτταρα (βλέπε **Πιν. 6 και 7**), συμπεριλαμβανομένου και του πεπτιδίου EADPTGHSY που χρησιμοποιείται στη δική μας μελέτη [64, 69, 94].

Ειδικότερα για τα πεπτίδια της *MAGE-A3* πρωτεΐνης, υπάρχουν περισσότερες αναφορές για την παρουσία T κυτταρολυτικών κλώνων που τα αναγνωρίζουν και ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα ή στον καρκινικό ιστό, σε ασθενείς μελάνωμα [58, 95], ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [96, 97] και άλλους τύπους καρκίνου [98]. Μάλιστα, σε μελέτες σε ασθενείς με μελάνωμα υπολογίστηκε η ακριβής συχνότητα προ εμβολιασμού των πρόδρομων T κυττάρων για πεπτίδια της πρωτεΐνης *MAGE-A3*, στα $2,8-5 \times 10^{-7}$ CD8

T κύτταρα [99, 100, 101]. Βέβαια, η συχνότητα στην οποία ανιχνεύονται αντι- MAGE CTL σε μη εμβολιασμένους ασθενείς, όπως προκύπτει από τις παραπάνω μελέτες, είναι μέσα στα πλαίσια που ανιχνεύονται τα κύτταρα αυτά σε άτομα χωρίς καρκίνο. Ωστόσο, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε εάν τέτοια κύτταρα κυκλοφορούν σε ασθενείς με καρκίνο και σε ποια συχνότητα, προτού ξεκινήσουμε οποιαδήποτε προσπάθεια ενίσχυσης της ανοσιακής απάντησης με εμβολιασμό.

T κυτταρικές απαντήσεις σε άτομα χωρίς καρκίνο

Για να αξιολογηθούν οι κυτταρικές απαντήσεις στους ασθενείς πριν και μετά τον εμβολιασμό είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την προϋπάρχουσα αντι-MAGE T κυτταρική απάντηση σε άτομα χωρίς καρκίνο. Οι T κυτταρικές απαντήσεις έναντι αντιγόνων των όγκων σε άτομα χωρίς καρκίνο δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και οι πληροφορίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεν έχουν προκύψει από συστηματική μελέτη αλλά, κυρίως, ως παράπλευρες παρατηρήσεις από μελέτες σε ασθενείς. Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η άποψη πως T κυτταρικές απαντήσεις έναντι TAAs απαντώνται σπάνια σε φυσιολογικά άτομα [102], βασισμένη σε μελέτες στις οποίες δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση T κυτταρικών απαντήσεων έναντι γνωστών TAAs, όπως πεπτιδίων των MAGE-1 [103, 104] και MAGE-3 [103, 105], με την εξαίρεση του Melan-A/MART-1-. Βέβαια, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες αυτές δεν είχε την ευαισθησία που απαιτείται για την ανίχνευση αντιγονοειδικών T κλώνων έναντι του όγκου.

Σύντομα μετά την ανακάλυψη πως T λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς μάρτυρες μπορούν να αναγνωρίσουν καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το MAGE-A3 γονίδιο [21, 106], σχεδιάστηκε η μεθοδολογία για τον υπολογισμό της συχνότητας των κυττάρων αυτών. Στη μεθοδολογία αυτή, αρχικά μεγάλος αριθμός CD8⁺ T-κυτταρικών μικροκαλλιεργειών διεγείρεται με αυτόλογα APCs που έχουν επωαστεί με το πεπτίδιο για διάστημα δύο εβδομάδων παρουσία κυτταροκινών και στη συνέχεια ανιχνεύεται η παρουσία ειδικών CTL με λειτουργικές δοκιμασίες [107]. Με τη διαδικασία αυτή υπολογίστηκε ότι η συχνότητα των αντιγονοειδικών CTL για τα πεπτίδια MAGE-A3.A1₁₆₈₋₁₇₆ και MAGE-3.A2₂₇₁₋₂₇₉ κυμαίνεται στα $0,4-3 \times 10^{-7}$ και $4-17 \times 10^{-7}$ CD8 T κύτταρα αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα αυτά ανήκουν στον CD8⁺CD45RA⁺ υποπληθυσμό αντιπροσωπεύοντας παρθένα T κύτταρα, τα οποία δεν έχουν έρθει σε επαφή με το πεπτίδιο που αναγνωρίζουν. Επεκτείνοντας περαιτέρω τη μεθοδολογία αυτή, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των HLA πολυμερών σαν μέθοδο ανίχνευσης, επαληθεύθηκε ότι η συχνότητα των πρόδρομων T κυττάρων που αναγνωρίζουν το MAGE-A3.A1 πεπτίδιο είναι $\sim 4 \times 10^{-7}$ CD8⁺ T κύτταρα και μάλιστα μετά από ανάλυση του TCR ρεπερτορίου αποδείχθηκε πως αντιπροσωπεύονται από >100 κλωνότυπους [100].

Χρήση σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γονίδια της οικογένειας *MAGE* κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνουν διάφορα αντιγονικά πεπτίδια ικανά να προσδένονται στα μόρια *HLA* τάξης I ή II. Τα συμπλέγματα αυτά αναγνωρίζονται από τα T λεμφοκύτταρα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Καθώς τα αντιγόνα των πρωτεϊνών *MAGE-A1* και *MAGE-A3* δεν εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς αντιπροσωπεύουν ασφαλείς στόχους για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Επιπλέον, εφόσον εκφράζονται από πληθώρα διαφορετικών καρκινικών τύπων, σε αρκετά μεγάλο ποσοστό ασθενών και παρουσιάζονται από τους πιο κοινούς τύπους *HLA*, η στόχευση επιτόπων των αντιγόνων *MAGE-A* βρίσκει ευρεία εφαρμογή έναντι των όγκων. Όλοι οι παραπάνω λόγοι οδήγησαν στη χρήση των αντιγόνων αυτών σαν ανοσογόνα σε κλινικές δοκιμές.

Οι περισσότερες κλινικές δοκιμές που χρησιμοποιούν αντιγόνα των πρωτεϊνών *MAGE* έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με μελάνωμα. Σαν ανοσογόνα προτιμούνται συνθετικά πεπτίδια που συμπεριλαμβάνουν τους επιτόπους των *MAGE* πρωτεϊνών που αναγνωρίζονται από τα CTL. Σε τέτοιου είδους μελέτες, ασθενείς ανοσοποιήθηκαν με αντιγονικά πεπτίδια, με στόχο την επαγωγή της έναντι του όγκου CTL απάντησης [44, 108, 109]. Εξαιτίας του σημαντικού ρόλου των CD4 T κυττάρων στην επαγωγή της CTL απάντησης, κάποια πρωτόκολλα συμπεριέλαβαν και CD4 T κυτταρικούς επιτόπους [110]. Τ απαντήσεις ανιχνεύθηκαν στη μειονότητα των ασθενών που εμφάνισαν υποχώρηση του όγκου [111]. Βέβαια, αξιολογώντας την ανοσιακή απόκριση στον εμβολιασμό αναλύθηκε η CTL απάντηση στους ασθενείς αυτούς, που έδειξε σαφή αύξηση της παρουσίας των αντιγονοειδικών CTL, ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού. Σε μία τέτοια μελέτη, ανιχνεύθηκε σε δύο ασθενείς συχνότητα αντιγονοειδικών CTL 5×10^{-6} και 4×10^{-5} CD8 T κύτταρα αντίστοιχα, 100 φορές μεγαλύτερη από την συχνότητα πριν τον εμβολιασμό [112].

Σε άλλες περιπτώσεις τα εμβόλια αποτελούνταν από ολόκληρη την πρωτεΐνη ή και γενετικά τροποποιημένο ιό (*ALVAC*) που να φέρει την ακολουθία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *MAGE* [113, 114]. Στις δοκιμές αυτές παρατηρήθηκε σαφή συσχέτιση ανάμεσα στην έναντι του εμβολίου T απάντηση και την υποχώρηση του όγκου η οποία κυμαίνονταν από 3×10^{-3} έως 7×10^{-7} CD8 T κύτταρα [100, 115]. Μάλιστα, η ανάλυση του TCR έδειξε ότι η απάντηση αυτή ήταν μονοκλωνική, υποδηλώνοντας πολλαπλασιασμό του προϋπάρχοντος CTL κλωνοτύπου λόγω της ενεργοποίησης από τον εμβολιασμό.

Για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα των εμβολίων, σε επακόλουθα πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας χρησιμοποιήθηκαν DC ως αντιγονοπαρουσιαστικά [116, 117, 118, 119]. Τα πεπτίδια στις δοκιμές αυτές χορηγήθηκαν αφού φορτώθηκαν σε ώριμα DC, τα οποία ως γνωστό ειδικεύονται στην επαγωγή της ανοσιακής απάντησης [120]. Στις περιπτώσεις αυτές, ανιχνεύθηκαν ξεκάθαρες απαντήσεις έναντι των αντιγόνων που

χρησιμοποιήθηκαν μαζί με κλινικής σημασίας αποτελέσματα, τα οποία όμως δεν ήταν θεραπευτικά [121, 122]. Σε τρεις ασθενείς που εμφάνισαν υποχώρηση του όγκου η συχνότητα των αντιγονοειδικών CTL κυμαίνονταν από 3×10^{-6} έως 10^{-3} CD8 T κύτταρα, ενώ αναφέρεται πως σε όλους τους ασθενείς που εμφάνισαν υποχώρηση του όγκου ανιχνεύθηκε T απάντηση [99, 116].

Συγκεντρωτικά από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, ανεξάρτητα από το μικρό ποσοστό της κλινικής ανταπόκρισης, διαφαίνεται μια ξεκάθαρη συσχέτιση ανάμεσα στην CTL απάντηση έναντι των πεπτιδίων MAGE και την υποχώρηση του όγκου σε κάποιους ασθενείς, γεγονός που δίνει το έναυσμα για τη βελτίωση των πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας και την πιθανότητα της αποτελεσματικής χρήσης τους σε άλλους καρκινικούς τύπους.

MAGEs και καρκίνος του πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αντιγόνα της οικογένειας MAGE έχουν χαρακτηριστεί στο μελάνωμα, αλλά εκφράζονται και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού, σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού, παχέως εντέρου κ.ά. (βλέπε **Πiv.5**). Τα ευρήματα αυτά καθοδήγησαν τους ερευνητές στη χρήση των αντιγόνων αυτών σε κλινικές δοκιμές έναντι όγκων που εκφράζουν MAGE πέραν του μελανώματος [123, 124]. Στον καρκίνο του πνεύμονα η έκφραση των πρωτεϊνών MAGE έχει μελετηθεί εκτενώς [55, 125, 126, 127] και μάλιστα έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών [128, 129].

Από την άλλη πλευρά, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η συχνότερη αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο, αποτελώντας το 17,8% της συνολικής θνησιμότητας του καρκίνου. Ειδικά οι ασθενείς με μη χειρουργήσιμο καρκίνο πνεύμονα έχουν υψηλή θνησιμότητα, παρά τις προόδους στη ραδιοχημειοθεραπεία. Αν και η 5-ετής επιβίωση είναι ~50% μετά από χειρουργική αφαίρεση του όγκου, η ολική 5-ετής επιβίωση στο σύνολο των ασθενών δεν ξεπερνά το 15%. Η άσχημη πρόγνωση εξαρτάται εν μέρει από τη σχετικά χαμηλή ευαισθησία του καρκίνου του πνεύμονα στη χημειοθεραπεία [130]. Επιπλέον, τα 2/3 των ασθενών αυτών διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο, με αποτέλεσμα η χειρουργική αφαίρεση του όγκου να μη συνιστάται ως θεραπεία. Η έκβαση της θεραπευτικής αγωγής δεν είναι ακόμη ικανοποιητική, παρά την πρόοδο στη χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία και τη χειρουργική παρέμβαση [131]. Σαν αποτέλεσμα, η ανάπτυξη και εφαρμογή νέων θεραπευτικών στρατηγικών κρίνεται επιτακτική για τη βελτίωση της πρόγνωσης στην ασθένεια αυτή [132, 133] και, σύμφωνα με όλα όσα ειπώθηκαν παραπάνω, οι πρωτεΐνες MAGE-A αποτελούν ελκυστικούς στόχους για την ανοσοθεραπεία στο συγκεκριμένο καρκινικό τύπο.

Από ανοσολογικής σκοπιάς βέβαια, ο καρκίνος του πνεύμονα υπόκειται σε κάποιους περιορισμούς, καθώς θεωρείται μη ανοσογονική κακοήθεια, παρεμποδίζοντας τις προσπάθειες κατανόησης των ανοσιακών απαντήσεων εναντίον του και την άμεση θεραπευτική του στόχευση. Ένα ακόμη εμπόδιο που συναντούν οι ερευνητικές προσπάθειες είναι η έλλειψη υλικού του όγκου, καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολο να απομονωθούν και να διατηρηθούν γραμμές καρκινικών κυττάρων του συγκεκριμένου τύπου (ποσοστό επιτυχίας ~3%) [134]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία ανοσιακών απαντήσεων έναντι του ΜΜΚΠ, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και κλινικές δοκιμές στον καρκίνο του πνεύμονα με χρήση των αντιγόνων MAGE-A.

Τ κυτταρικές απαντήσεις έχουν ανιχνευτεί σε περιφερικό αίμα και TILs ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα [135]. Η πλειοψηφία των μελετών αυτών αφορά απαντήσεις έναντι πεπτιδίων που προέρχονται είτε από μεταλλάξεις φυσιολογικών γονιδίων [136, 137] ή από κοινά αντιγόνα των όγκων [138]. Έναντι πεπτιδίων των πρωτεϊνών MAGE-A υπάρχουν ελάχιστες μελέτες στη βιβλιογραφία που να εξετάζουν την ύπαρξη απαντήσεων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η ομάδα των Groeper et al. [126] διερεύνησε σε 33 δείγματα TILs ασθενών με ΜΜΚΠ την έκφραση και την παρουσία απάντησης έναντι CT αντιγόνων συμπεριλαμβανομένων και των MAGE-A1₁₆₁₋₁₆₉ και MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Διαπιστώθηκε δραστικότητα αντιγονοειδικών CTL στα 7/26 δείγματα TILs, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως, ενώ η έκφραση των αντιγόνων αυτών σε ασθενείς με ΜΜΚΚ είναι συχνή, η παρουσία απάντησης σε μη ανοσοποιημένους ασθενείς αντιπροσωπεύει ένα σπάνιο γεγονός. Βέβαια, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη των CTL από τα TILs πιθανότατα δεν ήταν η καταλληλότερη για την ανάπτυξη των αντιγονοειδικών πληθυσμών και τα αποτελέσματα αυτά χρίζουν επιβεβαίωσης.

Καθώς τα αντιγόνα MAGE έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί κατάλληλο στόχο, ξεκίνησαν και κλινικές δοκιμές με τη χρήση των πρωτεϊνών MAGE σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας [139]. Ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο θεωρούνται ιδανικοί υποψήφιοι για ανοσοθεραπεία. Σε αυτό το πλαίσιο η ομάδα των Atanackovic et al. [140] πραγματοποίησε εμβολιασμό με ανασυνδυασμένη MAGE-A3 πρωτεΐνη με και χωρίς ανοσοενισχυτικό, σε 17 ασθενείς σταδίου I και II που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο εμβολιασμός είχε την ικανότητα να επάγει σημαντική CD4 απάντηση που συσχετίστηκε με την παραγωγή αντισωμάτων. Τη μελέτη αυτή ακολούθησε μια μεγαλύτερης κλίμακας δοκιμή (Phase II) σε 183 ασθενείς με ΜΜΚΠ στην οποία παρατηρήθηκε κατά 27% μικρότερος κίνδυνος επανεμφάνισης της νόσου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [141]. Βασισμένη στο ελπιδοφόρο αυτό αποτέλεσμα, μία ακόμη μεγαλύτερη δοκιμή (Phase III) έχει ξεκινήσει στην Ιαπωνία συμπεριλαμβάνοντας 2270 ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. Παράλληλα, διεξάγονται συμπληρωματικές φάσης II δοκιμές με πρωτεΐνες MAGE-A3 για να αξιολογήσουν διαφορετικά ανοσοενισχυτικά [142] ή διαφορετικές

μεθόδους χορήγησης του εμβολίου [143, 144]. Στις δοκιμές αυτές ανιχνεύθηκαν ανοσιακές απαντήσεις σε κάποιους ασθενείς, όμως η κλινική απάντηση ήταν πολύ περιορισμένη, όμοια με μελέτες σε άλλους τύπους καρκίνου. Τα αποτελέσματα αυτά, για άλλη μια φορά, κάνουν επιτακτική τη μελέτη κατανόησης των μηχανισμών ανοσιακής διαφυγής του καρκίνου και ειδικότερα της αδυναμίας των CTL να διεξάγουν μια επιτυχή ανοσιακή απάντηση.

3. ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Στην πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών ανοσοθεραπείας, μόνο ένα μικρό ποσοστό των ασθενών (5%–10%) ανταποκρίνεται κλινικά. Μάλιστα, η ομάδα των Rosenberg et al. [10] αναφέρει ακόμη μικρότερο ποσοστό υπαρκτής κλινικής ανταπόκρισης σε μία συχνότητα του 2,6% σε σύνολο 444 ασθενών μετά από θεραπεία. Οι λόγοι της αποτυχίας της ανοσιακής απόρριψης των όγκων σε ανοσοποιημένους ασθενείς δεν έχουν γίνει κατανοητοί τόσο σε μοριακό, αλλά και κυτταρικό επίπεδο.

Αναφέρεται πως για την εξάλειψη του καρκίνου από την ανοσιακή απάντηση πρέπει να πληρούνται τρία κριτήρια [10]: i) να παράγεται *in vivo* ικανοποιητικός αριθμός ανοσοκυττάρων με υψηλή συγγένεια ως προς τα αντιγόνα των όγκων, ii) τα κύτταρα αυτά να είναι ικανά να μεταναστεύσουν και να διηθήσουν το καρκινικό στρώμα, και iii) τα ανοσοκύτταρα να μπορούν να ενεργοποιηθούν στο σημείο του όγκου, ώστε να εκδηλώσουν τους κατάλληλους δραστικούς μηχανισμούς που διαθέτουν για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Διάφοροι μηχανισμοί μπορεί να παρεμβάλλονται σε καθένα από τα στάδια αυτά οδηγώντας στην αδυναμία των εμβολίων να επάγουν μία επιτυχή ανοσιακή απάντηση.

Οι λόγοι που οδηγούν στη μικρή αποτελεσματικότητα των εμβολίων μπορεί να συμπεριλαμβάνουν χαμηλή έκφραση αντιγόνων των όγκων, αναποτελεσματική επεξεργασία ή και παρουσίαση των αντιγόνων λόγω μειωμένης έκφρασης μορίων HLA και συνδιεγερτικών σημάτων, μειωμένη προσέγγιση δραστικών μορίων και κυττάρων στο σημείο του όγκου, ταχεία ανάπτυξη και εξαλλαγή των καρκινικών κυττάρων που υπερισχύει της ανοσιακής επιτήρησης και ενεργούς παράγοντες από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα [1]. Σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας φαίνεται να διαδραματίζει η επιλογή των αντιγόνων που χρησιμοποιούνται στους εμβολιασμούς. Η καλύτερη επιλογή αντιγόνων των όγκων που επάγουν κυτταρολυτική CD8⁺ T απάντηση, αποτελεί ίσως την πιθανότερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου με ανοσοθεραπεία.

Αντιγόνα των πρωτεϊνών MAGE-A3 και MAGE-A1 θεωρούνται από τα καταλληλότερα για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου καθώς υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, παρουσιάζονται από τα συχνότερα μόρια HLA και είναι απαραίτητα για τη διαφο-

ροποίηση των καρκινικών κυττάρων, επομένως πεπτιδιά τους θα παρουσιάζονται συνεχώς στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας στόχο για τα CTL. Καθώς όμως λίγα είναι γνωστά για την παρουσία CTL που να τα αναγνωρίζουν, μένει να απαντηθεί εάν τα αντιγόνα αυτά που εκφράζονται στον καρκίνο του πνεύμονα μπορούν να επάγουν CD8 T κυτταρική απάντηση στους ασθενείς και αν η απάντηση αυτή διαφέρει σε ένταση και ποιότητα από την προϋπάρχουσα απάντηση σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Η αξιολόγηση της προϋπάρχουσας απάντησης είναι ιδιαίτερης σημασίας τόσο για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των κλινικών δοκιμών, αλλά και για τη βελτίωση των πρωτοκόλλων εμβολιασμού.

Ένας σημαντικός λόγος που τα επαγόμενα από το εμβόλιο CTL κύτταρα δεν είναι σε θέση να καταστρέψουν συμπαγείς όγκους είναι η ανικανότητά τους να διηθήσουν τον όγκο και να ενεργοποιηθούν μετά από την επαφή τους με τα καρκινικά αντιγόνα *in vivo*. Επιπλέον, συμπαγείς όγκοι, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, δεν εκφράζουν συνδεδεγμένα μόρια και δεν παράγουν τα απαραίτητα σήματα κινδύνου, ώστε να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων στο σημείο του όγκου. Στον καρκίνο του πνεύμονα, ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν για την παρουσία αντιγονοειδικών CTL σε TILs καθώς τη λειτουργική τους κατάσταση. Τέτοιες πληροφορίες θα βοηθήσουν ιδιαίτερα στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μεθόδων εμβολιασμού, καθώς η πρόκληση που έχουμε να αντιμετωπίσουμε είναι η επαγωγή παρατεταμένων μνημονικών απαντήσεων δημιουργώντας ένα φλεγμονώδες περιβάλλον που να προάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των δραστικών κυττάρων στο σημείο του όγκου.

Ανεξάρτητα από τη συχνότητα και την παρουσία T ειδικών κυττάρων έναντι του όγκου στο περιφερικό αίμα ή στο σημείο του όγκου των ασθενών, για να είναι η ανοσική απάντηση επαρκής θα πρέπει τα κύτταρα αυτά να είναι και λειτουργικά. Για να είναι δυνατή η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των κλινικών δοκιμών και για να βελτιωθεί η ισχύς τους είναι απαραίτητη η αξιολόγηση της αντιγονοειδικής απάντησης, τόσο σε επίπεδο συχνότητας, αλλά και σε επίπεδο λειτουργικότητας. Αυτή η αξιολόγηση είναι ιδιαίτερα δύσκολη επειδή η CTL απάντηση έναντι συγκεκριμένου πεπτιδίου του όγκου είναι μικρής κλίμακας. Για να γίνει εφικτός ο λειτουργικός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αντιγονοειδικών CTL είναι απαραίτητη η απομόνωσή τους και ο *in vitro* πολλαπλασιασμός τους. Στο σύνολο των μελετών που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, ελάχιστες είναι οι αναφορές στις οποίες οι ερευνητές προχώρησαν στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό των αντιγονοειδικών CTL. Μάλιστα αναφέρεται πως οι περισσότερες λειτουργικές μελέτες έχουν διενεργηθεί σε μεμονωμένες περιπτώσεις με ασυνήθιστα πολυάριθμα αντιγονοειδικά CTL [124], αφήνοντας υπονοούμενα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών.

Συνεπώς, υπάρχει η ανάγκη για τη βαθύτερη κατανόηση της ανοσιακής απόκρισης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα τόσο σε επίπεδο συχνότητας, αλλά και σε επίπεδο λειτουργικότητας. Αυτός ήταν και ο στόχος της παρούσας μελέτης, η αναζήτηση CTL κλώνων έναντι επιτόπων των πρωτεϊνών MAGE-A3 και MAGE-A1 στο περιφερικό αίμα και σε TIL ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και ο ποσοτικός και ποιοτικός χαρακτηρισμός τους σε σύγκριση με αντίστοιχους κλώνους, που ενδεχομένως ανιχνεύονται σε υγιή άτομα, με την χρήση εξελιγμένων τεχνικών μεγάλης ευαισθησίας. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι μέγιστης σημασίας για τη διασαφήνιση της έναντι του όγκου ανοσιακής απάντησης και το σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών στρατηγικών εμβολιασμού στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 25 ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, και 15 υγιείς μάρτυρες (**Πιν. 8-9**). Οι δεκαπέντε από τους ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με ΜΜΚΠ (μέσος όρος ηλικίας 65.2 ± 9.9 έτη; 4 γυναίκες, 11 άντρες) και οι υπόλοιποι 10 με ΜΚΠ (μέσος όρος ηλικίας 65.8 ± 7.9 έτη; 1 γυναίκα, 9 άντρες) (**Πιν. 8**). Από τους υγιείς μάρτυρες (μέσος όρος ηλικίας 58.4 ± 5.6 έτη; 4 γυναίκες, 11 άντρες) συλλέχθηκε περιφερικό αίμα, ενώ από τους ασθενείς λήφθηκε περιφερικό αίμα κατά τη διάγνωση της ασθένειας και για 16 από αυτούς (10 με ΜΜΚΠ και 6 με ΜΚΠ) η αιμοληψία επαναλήφθηκε μετά την ολοκλήρωση της θεραπευτικής αγωγής. Επίσης, σε όσους ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση έγινε συλλογή καρκινικού ιστού, όταν αυτό ήταν δυνατό. Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη πραγματοποιήθηκε HLA τυποποίηση με PCR-SSP και διαπιστώθηκε η παρουσία τουλάχιστον ενός από τα αλληλία των μορίων ιστοσυμβατότητας HLA-A1, HLA-A2, HLA-A24 και/ή HLA-B35. Σημειώνεται πως η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, είχε λάβει έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πως οι συμμετέχοντες είχαν δώσει την έγγραφη συγκατάθεσή τους.

Πίνακας 8: Δημογραφικά χαρακτηριστικά των υγιών μαρτύρων.

Δότης	Φύλο	Ηλικία (έτη)	HLA
N#1	A	51	A24, B35
N#2	Θ	54	A01
N#3	A	54	A01, 02
N#4	A	54	A02
N#5	A	55	A02
N#6	A	55	A01
N#7	A	57	A24
N#8	A	60	A02
N#9	A	60	A02, A24, B35
N#10	Θ	60	A01,A24
N#11	A	62	A01
N#12	A	64	A02
N#13	Θ	63	A02, B35
N#14	A	73	A02
N#15	Θ	54	A24, B35

^a A: Άρρεν, Θ: Θήλυ

Πίνακας 9: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Ασθενής	Φύλο ^α	Ηλικία (έτη)	HLA	Ιστολογικός τύπος	TNM στάδιο	Στάδιο
P#1	A	74	A02, A24, B35	ΜΜΚΠ	T2N2M0	IIIA
P#2	A	75	A02	ΜΜΚΠ	T4N0M0	IIIB
P#3	A	73	A24, B35	ΜΜΚΠ	T4N2M0	IIIB
P#4	A	45	A24, 24	ΜΜΚΠ	T2N2M0	IIIA
P#5	A	81	A02	ΜΜΚΠ	T2N1M0	IIB
P#6	A	69	A02	ΜΜΚΠ	T2N0M0	IB
P#7	Θ	59	A24, B35	ΜΜΚΠ	T2N2M0	IIIA
P#8	Θ	56	A01, B35	ΜΜΚΠ	T1N1M0	IIA
P#9	Θ	48	A02	ΜΜΚΠ	T1N0M0	IA
P#10	A	67	A02, B35	ΜΜΚΠ	T1N0M0	IA
P#11	A	70	A02, B35	ΜΜΚΠ	T2N0M0	IB
P#12	A	79	A02	ΜΜΚΠ	T2N0M0	IB
P#13	Θ	63	A02, 24	ΜΜΚΠ	T2N1M0	IIB
P#14	A	81	A24	ΜΜΚΠ	T2N0M0	IB
P#15	A	68	A01, B35	ΜΜΚΠ	T3N1M1	IV
P#16	A	69	A24, 24	ΜΚΠ	T2N1M0	IIB
P#17	A	56	A02, 02	ΜΚΠ	T4N2M1	IV
P#18	A	71	A24, 68	ΜΚΠ	T4N2M1	IV
P#19	A	74	A24, B35	ΜΚΠ	T3N0M0	IIB
P#20	Θ	54	A02	ΜΚΠ	T1N3M0	IIIB
P#21	A	74	A24, 03	ΜΚΠ	T4N2M0	IIIB
P#22	A	70	A02	ΜΚΠ	T2N2M0	IIIA
P#23	A	63	A01, 02	ΜΚΠ	T2N3M0	IIB
P#24	A	56	B35	ΜΚΠ	T2N2M1	IV
P#25	A	71	A02	ΜΚΠ	T4N3M0	IIIB

^α A: Άρρεν, Θ: Θήλυ

2. ΥΛΙΚΑ

2.1. ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν εννιαμερή πεπτίδια, γνωστής ικανότητας σύνδεσης με τα HLA-A1, -A2, -A24 ή -B35, που παρασκευάζονται με τη μεθοδολογία F-μος 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 πεπτίδια των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 και ως μάρτυρες τμήματα πρωτεϊνών που προέρχονται από ιούς (**Πίν. 10**). Όλα τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφικά επιβεβαιωμένη ικανότητά τους να επάγουν αυτόματες ανοσιακές απαντήσεις σε ασθενείς με καρκίνο ή υγιή άτομα [59].

Πίνακας 10: *Πεπτίδια (ελέγχου και μάρτυρες) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.*

Πρωτεΐνη	HLA	Πεπτίδιο	Θέση	Βιβλιογραφία
MAGE-A1	A1, B35	EADPTGHSY	161-169	64,145
MAGE-A3	A1, B35	EVDPIGHLY	168-176	146
MAGE-A3	A02	FLWGPRALV	271-279	58
MAGE-A3	A24	TFPDLESEF	97-105	80
PB1	A01	VSDGGPNLY	591-599	147
BMLF1	A02	GLCTLVAML	280-288	148
EBNA3C	A24	RYSIFFDYM	246-254	149

2.2. HLA-ΠΟΛΥΜΕΡΗ

HLA-πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν για την άμεση ανίχνευση αντιγονοειδικών CD8-T κυττάρων σε μεικτούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς και την απεικόνιση της ειδικότητας των CTL. Πρόκειται για σύνθετα μόρια που αποτελούνται από τέσσερα ή περισσότερα πανομοιότυπα MHC μόρια τάξης I, καθένα από τα οποία παρουσιάζει το πεπτίδιο ενδιαφέροντος, τα οποία συνδέονται μέσω βιοτίνης σε ένα κεντρικό μόριο αβιδίνης. Στο σύμπλεγμα προσδένεται φθοριόχρωμα συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη.

Τα διαλυτά 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 T κυττάρων για το περιφερικό αίμα [150]. Για τους λόγους αυτούς CD8 T κύτταρα τα οποία συνδέονται με

τα πολυμερή θεωρείται ότι αντιστοιχούν με αντιγονοειδικούς T πληθυσμούς που ανιχνεύονται άμεσα με κυτταρομετρία ροής.

Στη μελέτη αυτή HLA-πολυμερή παρασκευάστηκαν για καθένα από τα παραπάνω πεπτίδια στο Ludwig Institute for Cancer Research (Brussels, Belgium), προτυπώθηκαν για χρήση σε κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται από τους Karanikas et al. [151], και προσφέρθηκαν ευγενώς από τον Prof. P. Coulie. Τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων ελέγχου ήταν συνδεδεμένα με φθοριόχρωμα PE, ενώ τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων-μαρτύρων ήταν συνδεδεμένα με φθοριόχρωμα APC.

2.3. ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΓΡΑΜΜΕΣ – EBV-B ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και κύτταρα-τροφοί στις καλλιέργειες των CTL χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα και EBV-B μετασχηματισμένα κύτταρα (EBV-B) κατάλληλου HLA, τα οποία απομονώθηκαν στο Ludwig Institute for Cancer Research (Brussels, Belgium). Στις γραμμές καρκινικών κυττάρων συμπεριλαμβάνεται και μία σειρά που απομονώθηκε από το δείγμα των ασθενών, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. (P#8). Τα χαρακτηριστικά των κυτταρικών αυτών γραμμών αναφέρονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά των καρκινικών και EBV-B κυττάρων

Όνομα γραμμής	Προέλευση	HLA	Ανάπτυξη	Χρόνος διαίρεσης
GERL	Μελάνωμα	A01, A02	προσκολλημένα	40-45 h
DAJU 2.7	Μελάνωμα	A01, A02	προσκολλημένα	45-50 h
P#8	ΜΜΚΠ	A01, B35	προσκολλημένα	50-65 h
DAJU EBV	EBV B κύτταρα	A01, A02	σε διάλυμα	30-35 h
ROSI EBV	EBV B κύτταρα	A24	σε διάλυμα	55-60 h
SEE EBV	EBV B κύτταρα	B35	σε διάλυμα	40-45 h

2.4. ΟΡΟΣ

Για την καλλιέργεια των CTL χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές παρτίδες ορού ανθρώπινης προέλευσης, οι οποίες παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο (βλέπε παρ. 3.2) Αντίθετα, για την καλλιέργεια των γραμμών καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε βοδινός ορός. Οι παρτίδες του HS παρασκευάστηκαν από πλάσματα που χορηγήθηκαν από το Δρακοπούλειο Κέντρο Αιμοδοσίας και το τμήμα αιμοδοσίας του Κουτλιμπάνειου Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Οι ασκοί με το πλάσμα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

2.5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

α) Κυτταροκίνες

Για τη διατήρηση και διέγερση των CTL χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταροκίνες IL-2, IL-4 και IL-7 (Πίν. 12). Οι κυτταροκίνες διαλύθηκαν σε DMSO στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον πίνακα 12 και διατηρήθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

β) Μονοκλωνικά αντισώματα

Στις κυτταρομετρικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε πληθώρα μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στους πίνακες 13-15.

γ) Λοιπά αντιδραστήρια

Στο σύνολο των διεγερσιών που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πληθώρα αντιδραστηρίων, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στον πίνακα 16.

δ) Αναλώσιμα υλικά

Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αναφέρονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 12: Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των CTL

Κυτταροκίνη	Όνομα αντιδραστηρίου	Συγκέντρωση	Αριθμός καταλόγου	Εταιρία
IL-2	Recombinant Human IL-2	1×10^4 U/mL	Cat 202-IL	R&D Systems
IL-4	Recombinant Human IL-4	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Cat 204-IL	R&D Systems
IL-7	Recombinant Human IL-7	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Cat 207-IL	R&D Systems

Πίνακας 13: Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενδοκυττάρια χρώση κυτταροκινών

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Προέλευση	Αρ.καταλόγου
IL2	FITC	BD Biosciences	340448
IL4	PE	BD Biosciences	559333
IL10	PE	BD Biosciences	559337
IFNg	FITC	BD Biosciences	340449

Πίνακας 14: Βιολογικός ρόλος και κυτταρική κατανομή των επιφανειακών αντιγόνων που μελετήθηκαν

Αντιγόνο	Φθορ ^α	Προέλευση	Cat.No.	Περιγραφή	Κυτ
CD3	ECD	Beckman Coulter, USA	IM2705U	Τμήμα του συμπλέγματος του TcR	Θυμοκύτταρα
CD4	PE	Beckman Coulter, USA	A07751	Συνυποδοχέας των τάξης II MHC μορίων Υποδοχέας της gp120 του HIV-1	T – βοηθητικά
CD8	FITC	Beckman Coulter, USA	A07756	Συνυποδοχέας των τάξης I MHC μορίων	T κυτταρολύτα
	PC5	Beckman Coulter, USA	A07758		
	PC7	Beckman Coulter, USA	737661		
CD28	FITC	Immunotech, France	1236	Ενεργοποίηση παρθένων T-κυττάρων, συνδέεται με τα CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2)	Υποπληθυσμός CD4+), Εν
	PE	Beckman Coulter, USA	IM2071U		
CD45	ECD	Beckman Coulter, USA	A07714	Ευοδώνει τη μεταβίβαση του μηνύματος του BcR και του TcR	
CD45RA	FITC	Beckman Coulter, USA	A07786	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμός και B-κυττάρων
CD45RO	ECD	Beckman Coulter, USA	IM2712U	Ισότυπος του CD45	Υποπληθυσμός B-κυττάρων
CD57	FITC	Immunotech, France	466	Ολιγοσακχαρίτης, βρίσκεται σε πληθώρα επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών	NK κύτταρα, υ
	FITC	Beckman Coulter, USA	IM0466U		
CD69	PC5	Beckman Coulter, USA	IM2656	Πρώιμος δείκτης ενεργοποίησης	Ενεργοποιημένα
CCR7	APC	R&D Systems, USA	FAB197A	Υποδοχέας χυμοκινών για μετακίνηση στους λεμφαδένες	Υποπληθυσμός κυττάρων
	PE	R&D Systems, USA	FAB197P		

^α φθοριόχρωμα συνδεδεμένο με το αντίστοιχο αντίσωμα, ^β βιβλιογραφική αναφορά

Πίνακας 15: Χαρακτηριστικά των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των γραμμών κα

Δείκτης	Φθορ ^α	Προέλευση	Cat.No.	Περιγραφή	Κ
HLA ABC	FITC	Beckman Coulter, USA	IM1838U	Μόριο MHC τάξης I, συνδέεται με τη β2m και συμμετέχει στην αντιγονοπαρουσίαση	
HLA DR	PE	Beckman Coulter, USA	IM0464U	Μόριο MHC τάξης II, συμμετέχει στην αντιγονοπαρουσίαση και συνδέεται με το CD4	Μονοκύτταρα κύτταρα
CD80	FITC	Beckman Coulter, USA	IM1853U	Συνδιεγερτικό μόριο, συνδέτης του CD28 και του CTLA-4	Αντιγό
CD86	PE	Beckman Coulter, USA	IM2729U	Συνδέτης του CD28 και του CTLA-4	Αντιγό
MUC1	FITC	Immunotech, France	IM2397	Γλυκοσυλιωμένη μεμβρανική φωσφοπρωτεΐνη, ανίχνευση όγκων επιθηλιακής προέλευσης	Φυσιολογ
Cytokeratin	FITC	Immunotech, France	IM2356	Πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων, δείκτης συγκεκριμένων τύπων καρκινώματος	Φυσιολογ
BerEP-4	FITC	Dako, France	F0860	Συνδέεται στην επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη EpCAM, καρκινικός δείκτης	
EMA	FITC	Dako, France	F0797	Μεμβρανική πρωτεΐνη του επιθηλίου, αναγνώριση όγκων του μεσεγχύματος	Φυσιολογ

^α φθοριόχρωμα συνδεδεμένο με το αντίστοιχο αντίσωμα, ^β βιβλιογραφική αναφορά

Πίνακας 16: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου
1-μέθυλοτροπτοφάνη	1-Methyl-DL-tryptophan 97%	860646
2-μερκαπτεθανόλη	2ME	31350-010
BFA	Fast Immune Brefeldin A solution	347688
DMSO	DMSO	D5879
DNάση	Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, 100 mg/mL	DN25
EDTA	UltraPure EDTA	15575-038
IFN-γ	IFN-γ, 0,717 mg/mL	285-IF/CF
Kit Luminox για παραγωγή κυτταροκινών	Fidis Human Extracellular Protein	MXHB0001
Kit αλληλούχισης	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	4336917
Kit ανάλυσης TCR	IOTest Beta Mark	IM3497
Kit εκχύλισης RNA	Rnase Free Dnase Set	79254
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QIAquick Gel Extraction Kit	28706
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	PCR Purification Kit	28106
Kit μαγνητικού διαχωρισμού CD8	CD8 positive selection kit, EasySep	18053
Kit μαγνητικού διαχωρισμού PE	Positive Selection Human PE Selection Kit, EasySep	18051
SYBR Green	platinum SYBR Green qPCR, Supermix-UDG	11733-046
Αγαρόζη	Agarose	16500-500
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C1
Αναστολέας RNAσών	RNAasin Rnase Inhibitor, 2,500 U/mL	27632304
Αντίστροφη Μεταγραφή	M-MLV reverse transcriptase	28025-013
Απορρυπαντικό TritonX	TritonX	X-100
Βοδινός ορός	Heat inactivated FBS, Gibco	12319018
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	161-0433
Διάλυμα CaCl ₂	Calcium Chloride 10%	-
Διάλυμα HBSS	HBSS	14175-053
Διάλυμα PBS	10X PBS	70013-065
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer,	15581-028

Πίνακας 16: (συνέχεια)

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου
Διάλυμα TRI	TRI Reagent Solution	AM9738
Διάλυμα αμινοξέων	MEM aminoacids	11140-035
Διάλυμα αντιβιοτικών	PSG	10378-016
Διάλυμα διαπερατότητας	Fixation/permeabilization solution	00-5521
Διάλυμα διαχωρισμού	Robosep Buffer, EasySep	20104
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780
Διάλυμα τρυψίνης	Trypsin, 0.25% (1X) with EDTA 4Na, liquid	25200-056
Εκκινητής θυμιδίνης	Oligo dt 15 primer	C110A
Ηπαρίνη	Heparin Leo	-
Θρεπτικό μέσο	Iscoves (IMDM)	21980-065
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805
Νερό ελεύθερο Rησών	Ultra Pure Water	10977-015
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTP set	10297-018
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042
Τρυβλία με άγαρ	Gelose Count Tact	43501
Τυχαίοι εκκινητές	Primer Random p(dN) ROCHE	14292421
Φικόλη	Ficoll Histopaque	1077-1
Χλωροφόρμιο	Acid phenol Chloroform	9720
Χρώμιο 51	Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	NEZ03002MC
Χρωστική	Trypan Blue	15250-061

Πίνακας 17: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλ
Πλάκα μέτρησης Neubauer	Counting chamber Neubauer	3390054
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510
Βαμβακορόρος στυλεός	Sterile cotton swabs, Portagerm	41999
Γυάλινες πιπέτες Pasteur	Pasteur glass pipette	3411020
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	95200100
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282
Ξύστρο	Cell scraper	3010
Πιάτο Petri	Cell Culture Dish, 100 mm x20 mm	430167
Πιάτο Petri	Cell Culture Dish,60mmx15mm,	430196
Πιάτο καλλιέργειας F96	96 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates,	3596
Πιάτο καλλιέργειας M24	24 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates	3524
Πιάτο καλλιέργειας M48	48well Cell Culture Cluster, flat bottom	3548
Πιάτο καλλιέργειας M6	6 well Cell Culture Cluster	3516
Πιάτο καλλιέργειας U96	96well Cell Culture Cluster, round bottom	3799
Πιάτο καλλιέργειας V96	96well Cell Culture Cluster, V- bottom	3894
Πιπέτα μεταφοράς 3 mL	3 mL transfer pipet, Polyethylene, Individually packaged,sterile	357575
Ρύγχη Robosep	Robosep tip racks	3520105
Ρύγχη πιπέτας 10 µL	10 µL sterilised long tips	DL10ST
Ρύγχη πιπέτας 100 µL, με φίλτρο	100 µL sterilised filter tips	DF100ST
Ρύγχη πιπέτας 1000 µL	1000 µL sterilised filter tips	DF1000ST
Ρύγχη πιπέτας 200 µL	200 µL sterilised tips	D200ST

Πίνακας 16: (συνέχεια)

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

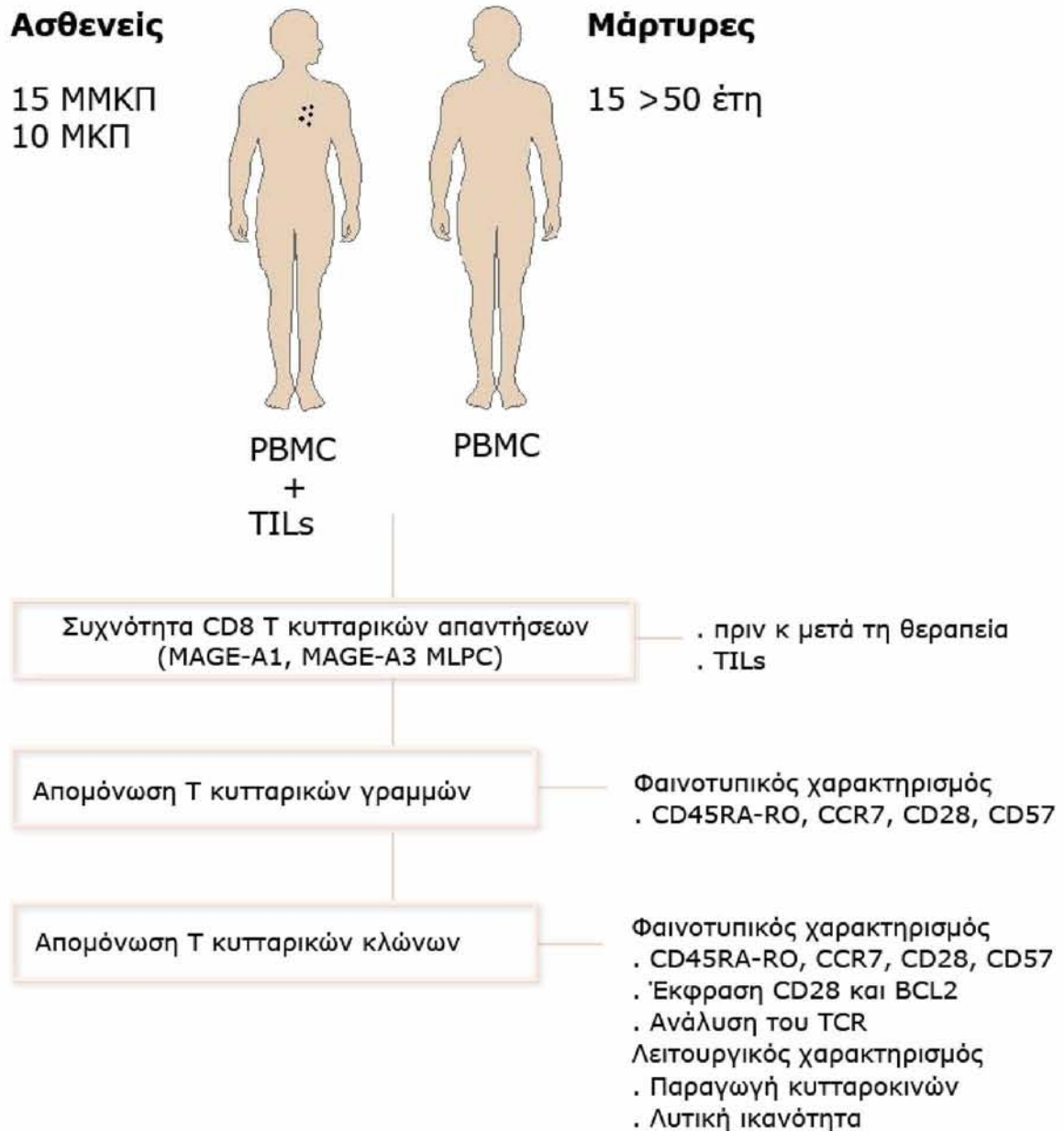
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε υλικό από 25 ασθενείς και 15 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 (βλ. παρ. 3.1.). Σε όλα τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων υπολογίστηκε η συχνότητα των αντιγονοειδικών CTL έναντι πεπτιδίων των πρωτεϊνών MAG-E-A3 και MAG-E-A1, καθώς και των πεπτιδίων ελέγχου με τη μέθοδο του MLPC (βλ. παρ. 3.6.). Από τη διαδικασία του MLPC απομονώθηκαν οι T κυτταρικές γραμμές και χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά με βάση εξωκυττάριους δείκτες που καθορίζουν το στάδιο διαφοροποίησης. Στις T κυτταρικές γραμμές ασθενών και μαρτύρων πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες απομόνωσης κλώνων (βλ. παρ. 3.8.) και οι κλώνοι που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και λειτουργικά.

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός περιελάμβανε κυτταρομετρική ανάλυση για εξωκυττάριους δείκτες που καθορίζουν το στάδιο διαφοροποίησης (βλ. παρ. 3.14.2.), πλήρη αλληλούχηση της β αλυσίδας του TCR (βλ. παρ. 3.13.) και μελέτη της έκφρασης με PCR πραγματικού χρόνου σημαντικών μορίων για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (βλ. παρ. 3.12.). 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 (βλ. παρ. 3.15.1-2). Η λυτική ικανότητα των CTL ελέγχθηκε με τη δοκιμασία της απελευθέρωσης ⁵¹Cr (βλ. παρ. 3.15.3.). Με την ίδια μέθοδο υπολογίστηκε και η συγγένεια του TCR των CTL ασθενών και μαρτύρων.

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 (βλ. παρ. 3.2.)
- τη μεθοδολογία απομόνωσης γραμμών καρκινικών κυττάρων (βλ. παρ. 3.3.)
- την καλλιέργεια των κυττάρων στόχων (βλ. παρ. 3.4.)
- την ακτινοβόληση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις δοκιμασίες σαν κύτταρα στόχοι ή τροφοί (βλ. παρ. 3.5.)



Εικόνα 7: Συνολικό πλάνο της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για τη προσέγγιση της ερευνητικής υπόθεσης

3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ - ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ – ΑΝΑΚΤΗΣΗ PBMCs

Μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από ολικό αίμα παρουσία πολυσακχαρίτη με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας και διαδοχικούς καθαρισμούς. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία 60-120 mL φλεβικού αίματος από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα αλλά και υγιείς μάρτυρες, σε ηπαρινισμένη σύριγγα (2-5 U ηπαρίνης/mL αίματος, Heparin). Ακολούθησε προσθήκη του ολικού αίματος με αργή έγχυση πάνω στη στιβάδα της φικόλης σε αναλογία 20-30 mL αίματος/20 mL φικόλης. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 min (400 g), σε RT. Εν συνεχεία, έγινε συλλογή της στιβάδας των μονοπύρνων κυττάρων και τοποθέτησή της σε καινούριο

αποστειρωμένο σωληνάριο 50 mL. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με ισοτονικό διάλυμα που περιείχε 1xPBS, 1 mM EDTA και 1% HS για 8 min στους 4 °C με σταδιακή μείωση της ταχύτητας περιστροφής (370 g, 300 g και 210 g αντίστοιχα), ώστε να επιτευχθεί ο καθαρισμός του δείγματος από τα αιμοπετάλια.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των PBMC σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer με τη χρήση της χρωστικής Trypan blue και ακολούθησε μία τελευταία φυγοκέντρηση (300 g, 8 min, 4°C). Προκειμένου να διατηρηθούν τα κύτταρα έως την ημέρα επεξεργασίας τους έγινε εναιώρησή τους σε ψυκτικό διάλυμα. Το ψυκτικό διάλυμα περιείχε 10% HS, 80% SF-IDc (489,5 mL IMDM, 5 mL PSG, 5ml MEM, 0,5 mL 2ME) και 10% DMSO. Η εναιώρηση των κυττάρων στο ψυκτικό διάλυμα έγινε με βάση την συγκέντρωσή τους, περίπου 20×10^6 PBMC/mL. Αρχικά τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε ισοπροπανόλη στους -80°C σε ειδικά φιαλίδια (Cryogenic vials) και την επόμενη μέρα τοποθετήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη στο υγρό άζωτο (-196 °C) μέχρι την επεξεργασία τους.

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για μοριακές αναλύσεις συγκεκριμένοι αριθμοί κυττάρων παγώθηκαν ως ίζημα και αποθηκεύθηκαν στους -80 °C. Στη διαδικασία αυτή χρειαζόταν ιδιαίτερη προσοχή, καθώς έπρεπε να αποφευχθεί η αποδιάταξη του RNA το οποίο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο τόσο στην θερμοκρασία, αλλά πρωτίστως στην παρουσία RNασών. Για το λόγο αυτό όλες οι επιφάνειες καθαρίστηκαν με ειδικό διάλυμα RNase Zap για την απενεργοποίηση των ενζύμων αυτών και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τον κατασκευαστή τους ελεύθερα RNασών.

Τα κύτταρα είτε συλλέχθηκαν απευθείας από την καλλιέργεια, είτε αποψύχθηκαν από το υγρό άζωτο. Στην δεύτερη περίπτωση ακολούθησε εναιώρησή τους σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 1% ορό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (400 g, 6 min, 21 °C) και επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια erpendorf ελεύθερα RNασών και ακολούθησε πλύση στη μικροφυγόκεντρο (4000 rpm; 4 min). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με προσοχή, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε PBS και η πλύση επαναλήφθηκε στις ίδιες συνθήκες. Απομακρύνθηκε όλη η ποσότητα του υπερκείμενου και το ίζημα παγώθηκε στιγμιαία σε LN₂. Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν σε κατάψυξη -80 °C μέχρι τη χρήση τους.

3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΡΟΥ ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΑ

Οι παρτίδες του ορού παρασκευάστηκαν από πλάσμα που προήλθε από κέντρα αιμοδοσίας και αποθηκεύθηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το πλάσμα είχε ελεγχθεί για HBV, HCV, HIV, HTLV I, HTLV II 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 h και την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\sim 30\text{ min}$) 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 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1-2 h) 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 min), συγκέντρωση του ορού σε μπουκάλι 1000 mL και επώαση σε υδατόλουτρο ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 min) με συχνή ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε άμεσα σε παγωμένο νερό και αποθηκεύθηκε στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να διαπιστωθεί η στειρότητα της διαδικασίας.

Για τον έλεγχο της στειρότητας λήφθηκαν 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 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 48 h 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 h και στη συνέχεια λήφθηκαν διπλά δείγματα των 500 μL από το καθένα για έλεγχο στειρότητας. Τέλος, τα μπουκάλια των 125 mL αποθηκεύθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους. Για την απόψυξη ποσότητας ορού, το μπουκάλι των 125 mL τοποθετούνταν στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 h. Η ποσότητα μεταφέρονταν σε φιαλίδια 50 mL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (3500 rpm; 15 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΡΑΜΜΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Απομόνωση γραμμών καρκινικών κυττάρων από τμήμα καρκινικού ιστού πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε ολική ή μερική λοβεκτομή του ενός πνεύμονα. Τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν σε μικτή καλλιέργεια με τις T κυτταρικές γραμμές που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς, ώστε να διαπιστωθεί η δραστικότητα των τελευταίων στο περιβάλλον του όγκου.

α) Ομογενοποίηση του ιστού

Ως μέρος της θεραπείας τους, οι 11/15 ασθενείς με ΜΜΚΠ υποβλήθηκαν σε ολική ή μερική λοβεκτομή του ενός πνεύμονα. Από το υλικό του χειρουργείου λήφθηκε τμήμα καρκινικού ιστού σε φιαλίδιο 50 mL που περιείχε τουλάχιστον 30mL 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 min). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επαναλήφθηκε η πλύση στις ίδιες συνθήκες. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε SF-IDc, καταμετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer, παγώθηκαν σε ψυκτικό διάλυμα ($15-20 \times 10^6$ TILs/φιαλίδιο) και αποθηκεύθηκαν σε LN₂ μέχρι τη χρήση τους.

Για την απομόνωση καρκινικών κυττάρων από το εναιώρημα, έγινε απόψυξη ενός εκ των φιαλιδίων και διάλυση του περιεχομένου σε 20 mL/φιαλίδιο 1% FBS-IDc. Αμέσως ακολούθησε φυγοκέντρηση (400 g, 6 min, 21 °C) και επαναδιάλυση των κυττάρων σε ζεστό 10% FBS-IDc. Προστέθηκε DNάση (20 μg/mL) και το δείγμα τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C για 10 min, ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα που σχηματίστηκαν από την παρουσία νεκρών κυττάρων και ιστών. Στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην πλάκα Neubauer και υπολογισμός της βιωσιμότητας του δείγματος. Ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων τα δείγματα χωρίζονταν σε τρία φιαλίδια: $0,5 \times 10^6$ κύτταρα παγώθηκαν ως ίζημα, $0,1-0,2 \times 10^6$ κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για φαινοτυπικό χαρακτηρισμό και τα υπόλοιπα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των καρκινικών κυττάρων του εναιωρήματος.

Σε τέσσερις ασθενείς υπήρξε η δυνατότητα επεξεργασίας του καρκινικού ιστού για την προσπάθεια απομόνωσης καρκινικών σειρών. Και στα τέσσερα δείγματα η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν χαμηλή (10-29%), γεγονός που έκανε ιδιαίτερα δύσκολο τον περεταίρω χειρισμό των δειγμάτων (**Πιν. 18**).

Πίνακας 18: Χαρακτηριστικά των δειγμάτων TILs από τους ασθενείς.

Ασθενής	Αριθμός κυττάρων x 10 ⁶			Ανάκτηση	Βιωσιμ.	Καρκινικά κύτταρα	Ινοβλάστες
	Αρχικός	Ζωντανά	Νεκρά				
#8	12,6	2,5	9,6	96%	21%	++	-
#9	23	1,4	12,2	59%	10%	+	+
#13	17,6	0,9	2,2	18%	29%	++	-
#14	16,6	2,2	9,6	71%	19%	-	+

β) Φαινότυπος

Η διαδικασία της χρώσης πραγματοποιήθηκε για να γνωρίζουμε τα ποσοστά των διαφορετικών πληθυσμών στην καλλιέργεια, θεωρώντας ότι τα CD3⁺ κύτταρα αντιπροσωπεύουν κατά μεγάλο βαθμό τα καρκινικά κύτταρα που βρισκόταν στο εναιώρημα. 0,1-0,2x10⁶ κύτταρα συλλέχθηκαν σε φιαλίδιο χρώσης και ακολούθησε πλύση (4000 rpm; 4 min) με 1% FBS-PBS. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μL 1% FBS-PBS που περιελάμβανε αντισώματα αντι-CD3-ECD (1/10), αντι-CD4-PE (1/10) και αντι-CD8-FITC (1/25). Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν για επώαση (30 min; 4 °C) σε σκοτάδι. Τέλος, τα κύτταρα πλύθηκαν με 1% FBS-PBS (4000 rpm; 4 min), επαναδιαλύθηκαν σε 0,5% FA-PBS και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα ποσοστά των διαφορετικών πληθυσμών για κάθε δείγμα, όπως προέκυψαν από το φαινότυπο, φαίνονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19: Φαινοτυπική ανάλυση των TILs.

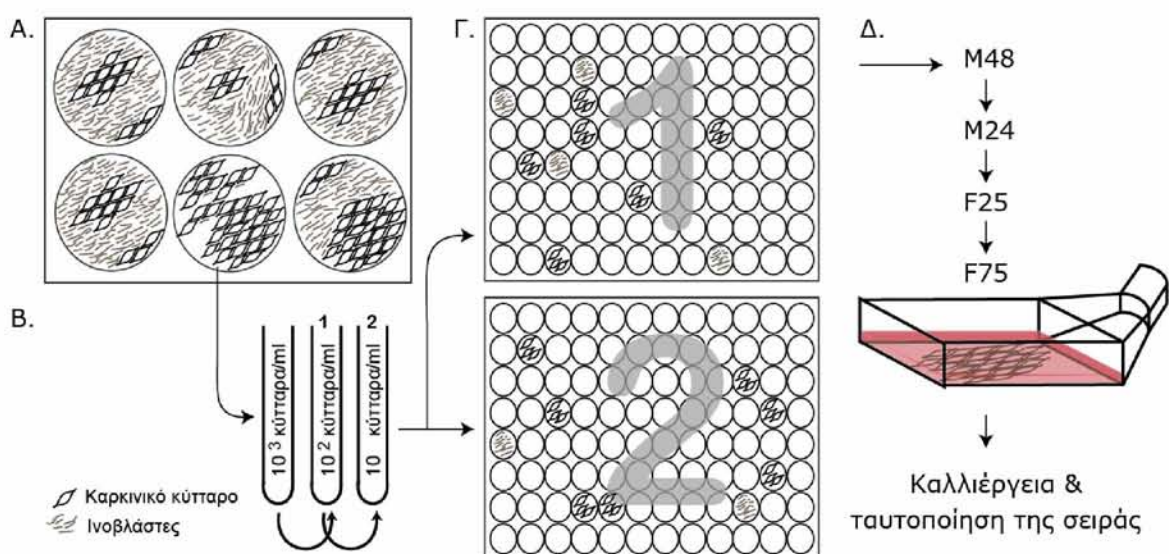
Ασθενής	Λεμφοκύτταρα (%)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)
#8	18,3	59	29	23
#9	19,3	66	44	19
#13	10,4	73	32	39
#14	15,6	64	30	29

γ) Απομόνωση καρκινικών κυττάρων

Τα κύτταρα που προορίζονταν για την απομόνωση καρκινικών κυττάρων φυγοκεντρήθηκαν (400 g, 6 min, 21 °C) και επαναδιαλύθηκαν σε ζεστό 10% FBS-IDc που περιελάμβανε και 10% HITES. Το HITES είναι ένα επιλεκτικό θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων και περιέχει υδροκορτιζόνη (10 nM), 17 β-εστραδιόλη (10 nM), σεληνιτικό νάτριο (30 nM), ινσουλίνη (5 μg/mL) και τρανσφερίνη (100 μg/mL). Παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί από τους Carney et al [170]. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10% FBS-IDc+HITES και τοποθετήθηκαν σε φρεάτια

πλάκας M6 σε συγκέντρωση $0,5-1 \times 10^6$ κύτταρα/φρεάτιο. Ακολούθησε παρατήρηση της ανάπτυξης των κυττάρων στα φρεάτια. Το HITES περιέχει ανασταλτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων, οπότε αυτό που αναμενόταν να αναπτυχθεί είναι καρκινικά κύτταρα, ενώ ήταν δυνατόν να παρατηρηθεί και ανάπτυξη ινοβλαστών.

Στην περίπτωση που τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονταν σε όλη την επιφάνεια του φρεατίου M6 επιλέχθηκε το φρεάτιο με την καλύτερη ανάπτυξη και τα κύτταρα συλλέχθηκαν για την απομόνωση καθαρής σειράς καρκινικών κυττάρων (**Εικ. 8.A.**). Εάν στο δείγμα παρατηρούνταν και ανάπτυξη ινοβλαστών, επιλεγόταν μια περιοχή ελεύθερη ινοβλαστών και κάτω από το μικροσκόπιο με τη χρήση ξύστρου αποκολλούνταν μόνο τα καρκινικά κύτταρα και με προσοχή συλλέγονταν με το υπερκείμενο. Εφόσον δεν παρατηρούνταν ανάπτυξη ινοβλαστών γινόταν μεταφορά όλων των κυττάρων του M6. Αρχικά, συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε φιαλίδιο 50 mL. Το φρεάτιο πλύθηκε με ζεστό PBS και το υλικό μεταφέρθηκε στο ίδιο φιαλίδιο. Στο φρεάτιο προστέθηκαν 3 mL διαλύματος PBS-EDTA με 1/5 Trypsin-Versene 0,25% και τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο 37°C για 5 min. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα αποσπαστήκαν από το πλαστικό με ισχυρή ανάδευση και τοποθετήθηκαν στο ίδιο φιαλίδιο 50 mL. Το φρεάτιο πλύθηκε ξανά με 3 mL ζεστό PBS (400 g; 6 min). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ζεστό 10% FBS-IDc και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer. Ακολούθησαν προσαρμογή της συγκέντρωσης των κυττάρων στα 10^3 κύτταρα/mL και δύο διαδοχικές αραιώσεις 1/10 με 10% FBS-IDc+HITES (10^2 κύτταρα/mL και 10 κύτταρα/mL) (**Εικ. 8.B.**). Οι δύο τελευταίες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τοποθέτηση σε πλάκες 96 φρεατίων με επίπεδη επιφάνεια 100 μL /φρεάτιο, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν σε φρεάτια M6.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση απομόνωσης καθαρής καρκινικής σειράς από εναιώρημα καρκινικού ιστού.

Οι πλάκες F96 παρακολουθούνταν για ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (**Εικ. 8.Γ.**). Λόγω του μικρού αριθμού κυττάρων σε κάθε φρεάτιο (μέχρι 1 κύτταρο/φρεάτιο) ήταν πιθανό να μην είναι εμφανής η ανάπτυξη για διάστημα αρκετών εβδομάδων. Στο διάστημα αυτό γινόταν αλλαγή του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο 10% FBS-IDc+HITES και παρακολούθηση των μικροκαλλιιεργειών. Όταν παρατηρούνταν ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων σε κάποιο φρεάτιο αυτά μεταφέρθηκαν σταδιακά σε μεγαλύτερα φρεάτια πλάκας M48, M24, M6 και τελικά σε φλάσκες F25 και F75 (**Εικ. 8.Δ.**). Η επανακαλλιέργεια της καρκινικής σειράς πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.. Ένα μέρος των κυττάρων παγώθηκε σε ψυκτικό διάλυμα ($3-6 \times 10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο), ένα μέρος ως ίζημα ($1-2 \times 10^6$ κύτταρα) και ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό της γραμμής των καρκινικών κυττάρων.

Όλα τα δείγματα των ασθενών χειρίστηκαν με τον ίδιο τρόπο, όπως περιγράφεται παραπάνω. Εντούτοις, οι καλλιέργειες παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών. Στον ασθενή #9 παρατηρήθηκε ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, αλλά και ινοβλαστών. Εξαιτίας της υπέρμετρης ανάπτυξης των τελευταίων, δεν ήταν δυνατή η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και κατά συνέπεια η απομόνωση καρκινικής σειράς. Στους ασθενείς #8 και #13 παρατηρήθηκε ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στα φρεάτια M6 και μικρή παρουσία ινοβλαστών, η οποία δεν επηρέασε την καλλιέργεια. Παρόλα αυτά, μετά τις διαδοχικές αραιώσεις των καρκινικών κυττάρων μόνο για τον ασθενή #8 ήταν δυνατή η απομόνωση καρκινικής σειράς, καθώς τα καρκινικά κύτταρα του ασθενή #13 δεν αναπτύχθηκαν στα φρεάτια F96. Στον ασθενή #14 η καλλιέργεια του εναιωρήματος είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ινοβλαστών, ενώ παρατηρήθηκαν ελάχιστα καρκινικά κύτταρα, τα οποία δεν αναπτύχθηκαν στην καλλιέργεια.

Στον ασθενή #8, στον οποίο παρατηρήθηκε η καλύτερη ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, κατέστη δυνατή και η απομόνωσή τους. Στα φρεάτια F96 που αντιστοιχούσαν σε αρχική συγκέντρωση 1 κύτταρο/φρεάτιο υπήρξε ανάπτυξη αποκλειστικά καρκινικών κυττάρων σε 8 φρεάτια. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερα φρεάτια M48-M24 και η σειρά με την καλύτερη ανάπτυξη επιλέχθηκε για επανακαλλιέργεια και ταυτοποίηση με εξωκυττάρους δείκτες. Μακροσκοπικά τα κύτταρα είχαν μεγάλο μέγεθος και παρουσίαζαν πλακώδη εμφάνιση. Αναπτύσσονταν σε πλάγια παράταξη και προσκολλημένα στην πλαστική επιφάνεια. Ο χρόνος διπλασιασμού τους υπολογίστηκε στις 50-65 ώρες.

δ) Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

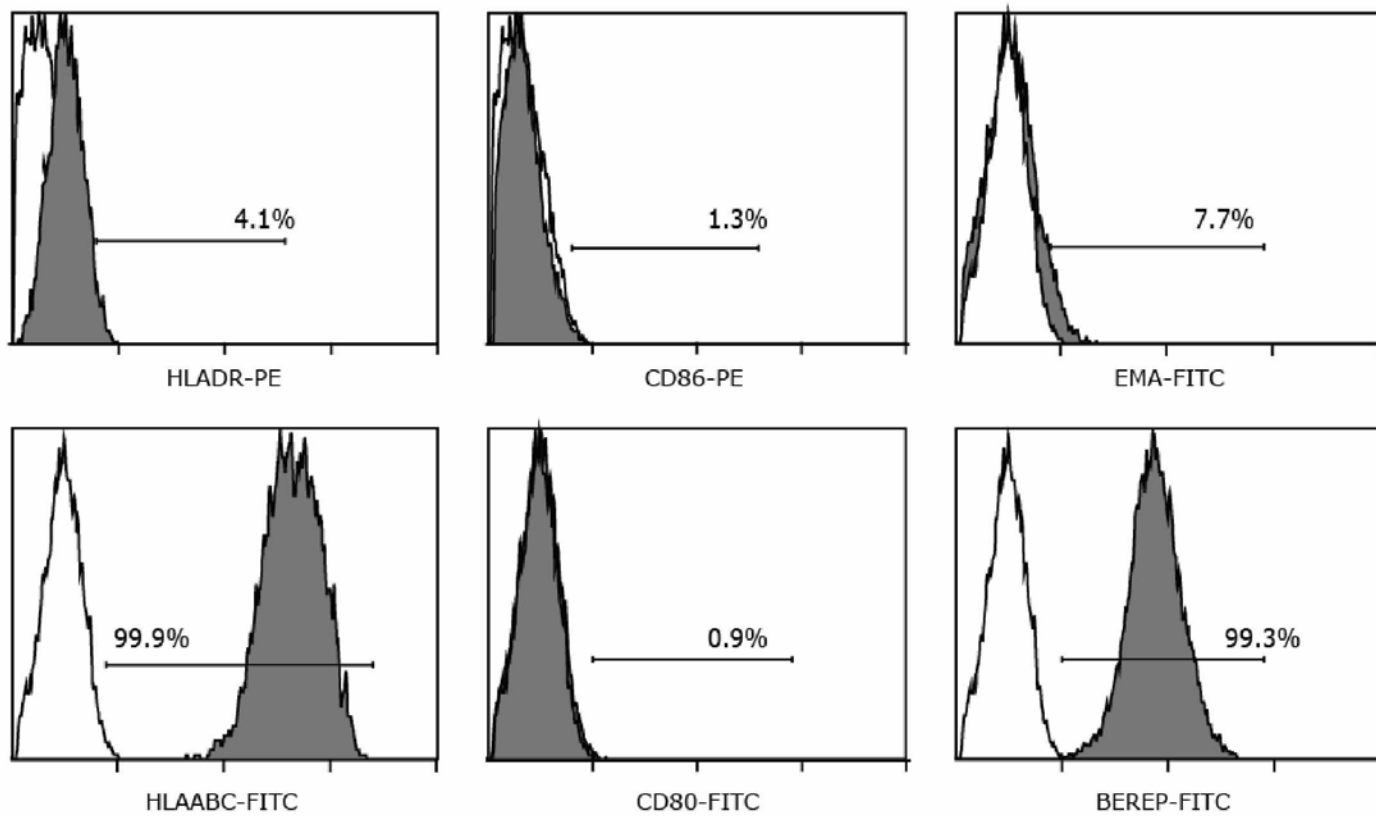
Οι εξωκυττάριοι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των καρκινικών σειρών παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 15. Τα καρκινικά κύτταρα χωρίστηκαν σε 7 διαφορετικά φιαλίδια χρώσης ($0,5 \times 10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο) και φυγοκεντρήθηκαν (4000 rpm; 4 min) σε 1% HS-PBS. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1% HS-PBS και προστέθηκε το αντίστοιχο αντίσωμα, όπως φαίνεται στον πίνακα 20:

Πίνακας 20: Συνδυασμοί αντισωμάτων για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό της γραμμής καρκινικών κυττάρων του ασθενή #8.

Φιαλίδιο	1% HS-PBS	Αντίσωμα 1	Αντίσωμα 2
1	60 μ L	20 μ L IgG1-FITC	20 μ L IgG1-PE
2	60 μ L	20 μ L HLA ABC-FITC	20 μ L HLA DR-PE
3	60 μ L	20 μ L CD80-FITC	20 μ L CD86-PE
4	80 μ L	20 μ L MUC1-FITC	
5	80 μ L	20 μ L CYTOKERATIN-FITC	
6	80 μ L	20 μ L BerEP4-FITC	
7	80 μ L	20 μ L EMA-FITC	

Τα κύτταρα επωάστηκαν στο σκοτάδι για 30 min στους 4 °C και τέλος, ακολούθησε πλύση με 1% FBS-PBS (4000 rpm; 4 min), επαναδιάλυση σε 0,5% FA-PBS και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Η ανάλυση έδειξε τα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον ασθενή #8 είχαν μόρια HLA ABC στην επιφάνειά τους, αλλά όχι HLA DR, CD80 και CD86. Όσον αφορά τους δείκτες φυσιολογικού και καρκινικού επιθηλίου, η γραμμή καρκινικών κυττάρων του συγκεκριμένου ασθενή εξέφραζε τον δείκτη των επιθηλιακών κυττάρων BEREP-4 (>99%) και σε μικρότερα ποσοστά τους υπόλοιπους δείκτες: CYTOKERATIN (20%), MUC1 (17%) και EMA (7,7%) (**Εικ. 9**).



Εικόνα 9: Έλεγχος έκφρασης με κυτταρομετρία ροής των επιφανειακών δεικτών της καρκινικής σειράς #9. Με λευκό φόντο απεικονίζεται ο φθορισμός των ιστοτυπικών μαρτύρων για το κάθε χρώμα.

3.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΓΡΑΜΜΩΝ ΚΑΙ EBV-B ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι καρκινικές γραμμές και τα EBV-B μετασχηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν είτε ως κύτταρα στόχοι είτε ως APCs για την ενεργοποίηση ειδικών CD8⁺ T κυτταρικών πληθυσμών.

Αρχικά, γινόταν απόψυξη των κυττάρων ($2-4 \times 10^6$ 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. Αμέσως ακολουθούσε φυγοκέντρηση (400 g, 6 min, 21 °C) και επαναδιάλυση των κυττάρων σε ζεστό (37 °C) θρεπτικό μέσο 10% FBS-IDc. Τα κύτταρα παρέμεναν στο πλήρες θρεπτικό μέσο 10-15 min σε RT, ώστε να ανακάμψουν και να διαχυθεί το υπολειπόμενο DMSO από τις μεμβράνες τους. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση του αριθμού των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην πλάκα Neubauer και υπολογισμός της βιωσιμότητας του δείγματος. Ακολουθούσε πλύση και τοποθέτησή τους σε δύο φλάσκες καλλιέργειας 75 cm², 1/3 και 2/3 των ανακτημένων κυττάρων αντίστοιχα. Οι φλάσκες τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης (37 °C, 8% CO₂).

Ανάλογα με το χρόνο διαίρεσής τους οι καλλιέργειες παρατηρούνταν και όταν έφταναν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, γινόταν συλλογή των κυττάρων για χρήση τους και επανακαλλιέργεια. Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε διάλυμα γινόταν συλλογή του θρεπτικού μέσου από την φλάσκα, πλύση της φλάσκας με ζεστό PBS και φυγοκέντρηση των κυττάρων (400 g; 6 min). Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 10% FBS-IDc και μετριοταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε μονήρη στιβάδα προσκολλημένα στο πλαστικό ακολουθούσε διαφορετική διαδικασία συλλογής. Αρχικά, συλλεγόταν το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο 50 mL. Ακολουθούσε πλύση της φλάσκας με 10 mL PBS και προσθήκη διαλύματος 2 mM EDTA-PBS. Τα κύτταρα τοποθετούνταν 5-10 min στους 37 °C, ώστε προκληθεί αποκόλληση από την πλαστική επιφάνεια. Γινόταν ανακίνηση της φλάσκας 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 min). Τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 10% FBS-IDc και μετριοταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Κατάλληλος αριθμός κυττάρων συλλεγόταν για χρήση, $2-4 \times 10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο παγώνονταν και διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων (2×10^6 , 1×10^6 και $0,5 \times 10^6$) τοποθετούνταν σε νέες φλάσκες F75 για επανακαλλιέργεια. Η καλλιέργεια συνεχιζόταν μέχρις ότου σημειώνονταν μείωση του χρόνου διαίρεσης των κυττάρων κατά 10%. Στην περίπτωση αυτή η καλλιέργεια τερματιζόταν και ξεπαγώνονταν νέο φιαλίδιο.

3.5. ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ακτινοβολήση ήταν καρκινικές γραμμές και EBV μετασηματισμένα κύτταρα που χρησιμοποιούνταν ως αντιγονοπαρουσιαστικά, καθώς και PBMCs που χρησιμοποιούνταν ως κύτταρα τροφοί. Η ακτινοβολήση έχει ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του DNA, έτσι ώστε τα κύτταρα που ακτινοβολούνται να μπορούν εκτελέσουν τις λειτουργίες τους έως την πρώτη τους διαίρεση, όπου αποπίπτουν και έτσι δεν αναπτύσσονται εις βάρος των κυττάρων της καλλιέργειας.

Αρχικά έγινε συλλογή των κυττάρων όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4. και επαναδιάλυσή τους σε 1% FBS-IDc. Στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων και ακολούθησε πλύση (400 g; 6 min), επαναδιάλυση σε ~70 mL 1% FBS-IDc και τοποθέτησή τους σε φλάσκα ακτινοβολήσης. Η ακτινοβολήση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μαγνητικό επιταχυντή στα 100 Gray για 15 min. Με το πέρας της ακτινοβολήσης, τα κύτταρα συλλέχτηκαν από τη φλάσκα και μετρήθηκαν με πλάκα Neubauer. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων (6 διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από 1×10^6 /φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε φρεάτια πλάκας M6 και χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγμα ελέγχου της θνησιμότητας των ακτινοβολημένων κυττάρων και της στειρότητας της διαδικασίας. Τα υπόλοιπα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (400 g; 6 min) και παγώθηκαν σε ψυκτικό διάλυμα με 10% FBS σε συγκέντρωση 5×10^6 /φιαλίδιο για κύτταρα που προορίζονταν για αντιγονοπαρουσιαστικά και 10×10^6 /φιαλίδιο για τα κύτταρα τροφούς.

3.6. ΜΕΙΚΤΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MLPC)

Η καλλιέργεια αυτή σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αυξήσει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει την ειδική απάντηση έναντι των αντιγόνων που εξετάζονται. Μονοπύρηννα περιφερικού αίματος διεγέρθηκαν σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των αντιγονοειδικών CD8 T κυττάρων, έτσι ώστε αυτά να μπορέσουν να ανιχνευθούν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, όπως έχει ήδη περιγραφεί [171].

α) Αρχική ενεργοποίηση

Την πρώτη μέρα γινόταν απόψυξη των PBMC τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο. Ακολουθούσε εναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα 1% HS-IDc, φυγοκέντρηση (400 g; 6 min; 21 °C) και μέτρηση του αριθμού τους στην πλάκα Neubauer, ώστε να διαπιστωθεί ο αριθμός των ζώντων και νεκρών μονοπύρηννων. Από αυτά, 1×10^6 κύτταρα παγώνονταν ως ίζημα και 3×10^5 κύτταρα χρησιμοποιούνταν για χρώση με αντι-CD3, αντι-CD4 και αντι-CD8 (βλέπε παρ. 3.3.β), ώστε να γνωρίζουμε τα ακριβή ποσοστά των διαφόρων υποπληθυσμών της μικροκαλλιέργειας (**Εικ. 10.B**). Τα υπόλοιπα κύτταρα ($\sim 60 \times 10^6$ PBMC) χωρίζονταν σε αντίστοιχα σωληνάρια για ξεχωριστή διέγερση με το κάθε πεπτίδιο ανάλογα με τον HLA γονότυπο του δότη, ενώ ένας μικρός

αριθμός κυττάρων ($\sim 5 \times 10^6$ PBMC) διεγείρονταν με το πεπτίδιο ελέγχου. Η διέγερση πραγματοποιούνταν σε συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένο με 1% HS (60 min; RT) με 20 $\mu\text{g/mL}$ τελική συγκέντρωση πεπτιδίου σε κάθε φιαλίδιο. Ακολουθούσε πλύση των κυττάρων και ανάμειξη όλων των φιαλιδίων εκτός του πεπτιδίου ελέγχου και κατανομή τους σε φρεάτια πλάκας μικροκαλλιιεργειών U96 σε συγκέντρωση 2×10^5 κύτταρα/φρεάτιο σε 0,2 mL 10% HS-IDc και τελική συγκέντρωση 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 200 μM 1MW. Την 3^η και 5^η ημέρα της καλλιέργειας γινόταν παρατήρηση των μικροκαλλιιεργειών σχετικά με το χρώμα του θρεπτικού μέσου, το μέγεθος του ιζήματος και την παρουσία μονοκυττάρων καθώς και αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 100 μM 1MW).

β) Επανενεργοποίηση

Την 7^η ημέρα γινόταν επαναδιέγερση με τα πεπτίδια με τη χρήση ακτινοβολημένων EBV μετασχηματισμένων κυττάρων ως APC και ταυτόχρονη αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80 °C αποψύχονταν και τοποθετούνταν σε διάλυμα 1% HS-IDc. Μετά τη μέτρηση τους χωρίζονταν σε αντίστοιχα σωληνάρια για χωριστή διέγερση με το κάθε πεπτίδιο, ανάλογα με τον HLA γονότυπο του δότη, ενώ ένας ανάλογος με τον αριθμό των φρεατίων αριθμός κυττάρων διεγείρονταν με το πεπτίδιο ελέγχου. Ακολουθούσε πλύση των κυττάρων και ανάμειξη όλων των φιαλιδίων εκτός του πεπτιδίου ελέγχου και κατανομή τους στα φρεάτια της πλάκας μικροκαλλιιεργειών (2×10^4 EBV κύτταρα/φρεάτιο) σε 0,1 mL 10% HS-IDc και τελική συγκέντρωση 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 200 μM 1MW. Την 7^η, 9^η και 11^η ημέρα της καλλιέργειας γινόταν παρατήρηση των μικροκαλλιιεργειών σχετικά με το χρώμα του θρεπτικού μέσου και το μέγεθος του ιζήματος. Εάν το χρώμα του θρεπτικού μέσου ή/και το μέγεθος του ιζήματος δήλωναν πως δεν υπήρχε πλέον χώρος για περαιτέρω ανάπτυξη των κυττάρων γινόταν διαίρεση των μικροκαλλιιεργειών σε καινούργιες πλάκες, διαφορετικά γινόταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 20 U/mL IL-2 και 100 μM 1MW). Στην περίπτωση που απαιτούνταν διαίρεση των μικροκαλλιιεργειών γινόταν αντικατάσταση 0,1 mL θρεπτικού μέσου με νέο χωρίς την προσθήκη κυτταροκινών, ανάδευση των μικροκαλλιιεργειών με τα ρύγχη, μεταφορά του 50% της μικροκαλλιέργειας σε νέα πλάκα και προσθήκη 0,1 mL θρεπτικού μέσου με 20 U/mL IL-2 και 100 μM 1MW και στις δύο πλάκες. Με μέγιστο αριθμό διαιρέσεων τις δύο καταλήγαμε σε 2-4 αντίγραφα των αρχικών μικροκαλλιιεργειών.

γ) Ανίχνευση θετικών μικροκαλλιιεργειών

Την 13^η ημέρα γινόταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο και στο ένα αντίγραφο της καλλιέργειας γινόταν χρώση με τα πολυμερή για την ανίχνευση των ειδικών πληθυσμών. Αρχικά, η πλάκα φυγοκεντρούνταν (800 rpm; 5 min) και ακολουθούσαν δύο πλύσεις με ισότονο διάλυμα χρώσης 1% HS-PBS. Στη συνέχεια προσθέτονταν το πολυμερές σε συγκέντρωση 8,3 μM και η πλάκα επωαζόταν για 30 min στους 37 °C. Ακολουθούσε προσθήκη αντι-CD8-FITC σε συγκέντρωση 1/30 και περαιτέρω επώαση για 30 min στους 37 °C. Προσθέτονταν 1% HS-PBS και πραγματοποιούνταν δύο πλύσεις (800 rpm; 5 min). Τέλος, το δείγμα μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 0,5% FA-PBS και αναλυόταν με κυτταρομετρία ροής.

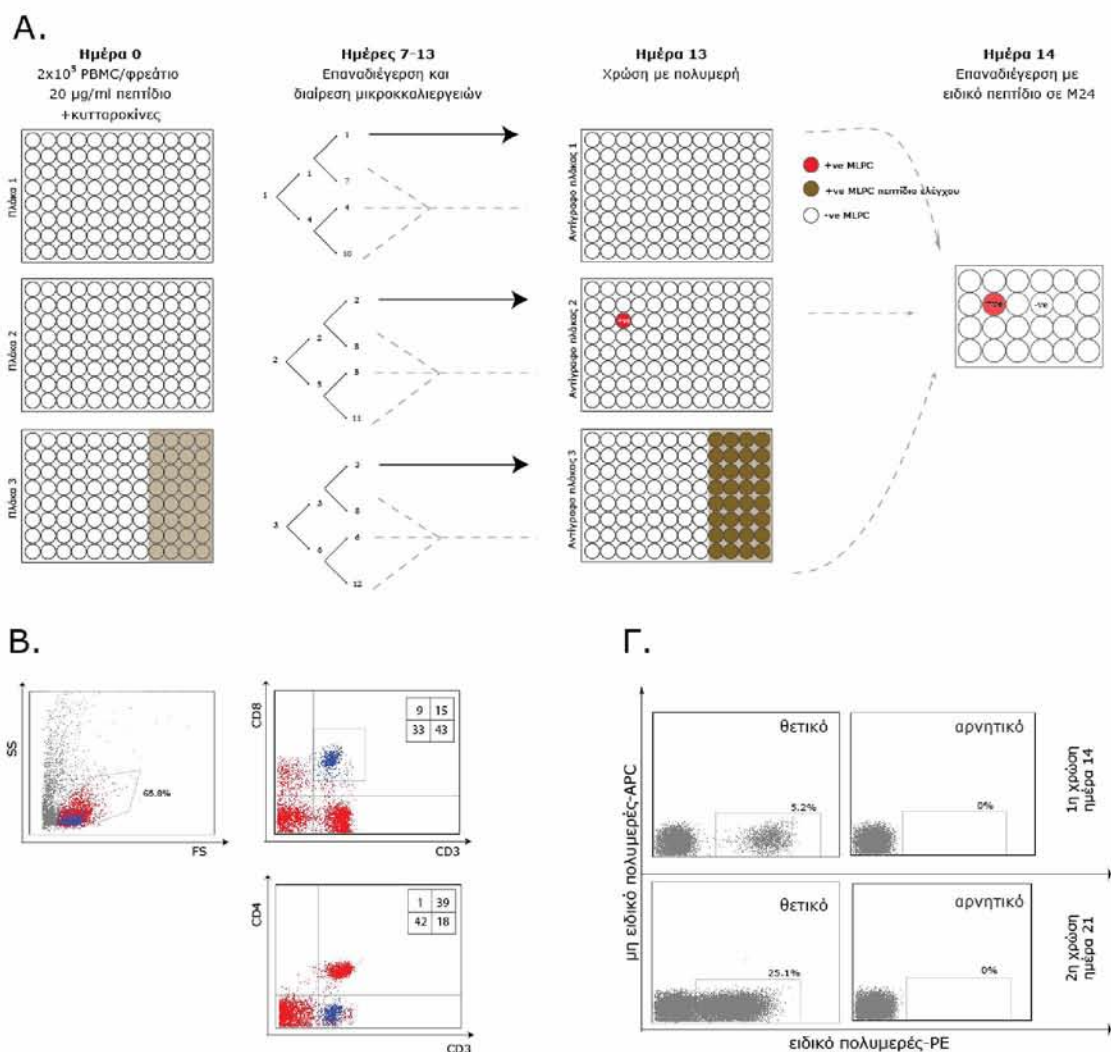
Στις πιθανά θετικές για το πολυμερές μικροκαλλιέργειες επαναλαμβάνονταν η χρώση για το κάθε πολυμερές χωριστά, ώστε να διαπιστωθεί η ειδικότητα του θετικού πληθυσμού. Οι μικροκαλλιέργειες στις οποίες ανιχνεύονταν ειδικός CD8 θετικός για το πολυμερές πληθυσμός συλλέγονταν από τα υπολειπόμενα αντίγραφα και μεταφέρονταν σε μεγαλύτερα φρεάτια, όπου γινόταν επαναδιέγερση με το ειδικό πεπτίδιο χρησιμοποιώντας ακτινοβολημένα EBV μετασχηματισμένα κύτταρα σαν APC και ακτινοβολημένα PBMC σαν κύτταρα τροφούς (0,6x10⁶ κύτταρα/M24 φρεάτιο με 20 x10⁴ EBV, 1 x10⁶ PBMC και 40 U/mL IL-2, 20 ng/mL IL-4, 20 ng/mL IL-7 και 200 μM 1MW). 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 μικροκαλλιιεργειών ανάλογα με την ανάπτυξη των κυττάρων. Την 7^η ημέρα συλλέγονταν μία μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιούνταν χρώση με το ειδικό MHC-πολυμερές και με μη ειδικό MHC-πολυμερές, με τη διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω (**Εικ. 10.Γ**). Εφόσον επαληθεύονταν η ειδικότητα του πληθυσμού τα κύτταρα συλλέγονταν, μετρούνταν στην πλάκα Neubauer και παγώνονταν ως κυτταρικές γραμμές (2-6x10⁶ κύτταρα/φιαλίδιο).

δ) Υπολογισμός της συχνότητας

Με βάση τον αριθμό των θετικών μικροκαλλιιεργειών στο σύνολο της πλάκας υπολογίζονταν η συχνότητα της ειδικής T κυτταρικής απάντησης έναντι των αντιγόνων MAGΕ-A1 και MAGΕ-A3 με βάση την κατανομή Poisson διορθωμένη για σπάνια φαινόμενα κατά Bernoulli [107]:

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

όπου e είναι η βάση των φυσικών λογαρίθμων (~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.



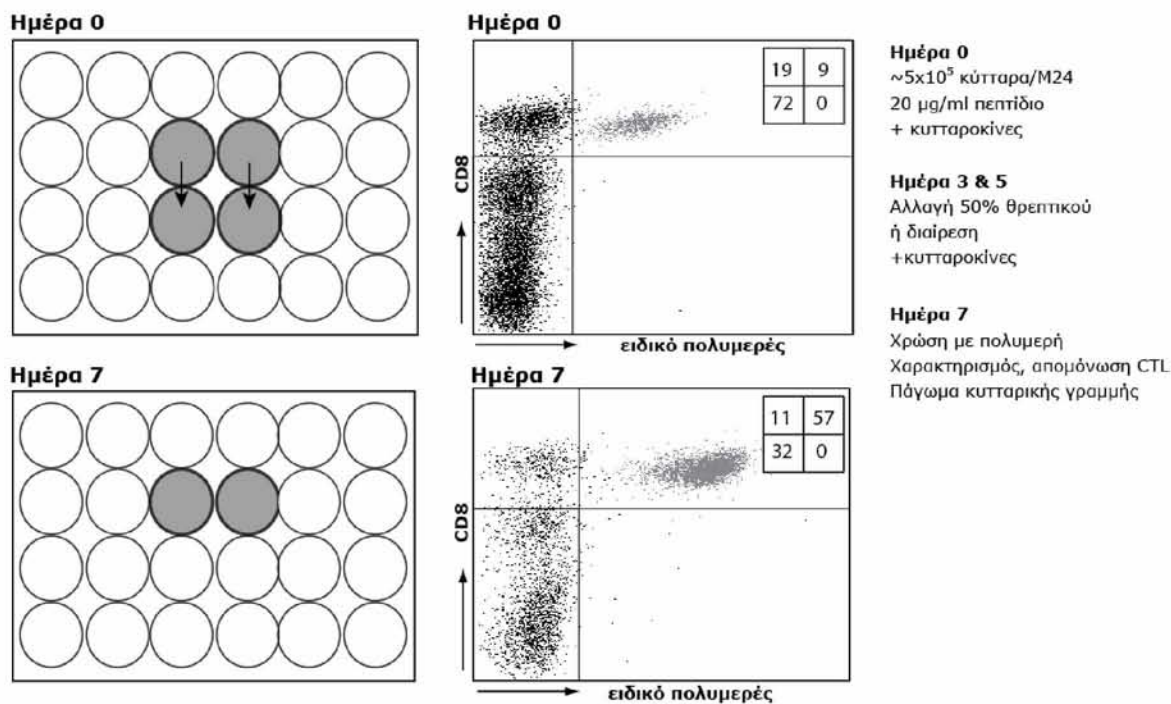
Εικόνα 10: A. Σχηματική απεικόνιση της Μικτής Λεμφοκυτταρικής Καλλιέργειας (η ανάλυση στο κείμενο). **B.** Κυτταρομετρική ανάλυση των πλυθυσμών των PBMCs που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μικροκαλλιέργεια. Στα τετράγωνα διακρίνονται τα ποσοστά των πληθυσμών στο κάθε τεταρτημόριο. **Γ.** Χρώση με ειδικό πολυμερές και πολυμερές ελέγχου μια θετικής και αρνητικής μικροκαλλιέργειας την 14η και 21η ημέρα της καλλιέργειας.

3.7. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ Τ ΓΡΑΜΜΩΝ

Ως κυτταρική γραμμή αναφέρεται ένας μικτός πληθυσμός κυττάρων που περιλαμβάνει τον ειδικό για το πεπτιδίο που εξετάζεται πληθυσμό μαζί με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, CD8⁺ T κύτταρα άλλης ειδικότητας, NK κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα κ.ά. Σκοπός της καλλιέργειας αυτής ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός του ειδικού μόνο CD8 T κυτταρικού πληθυσμού. Για το σκοπό αυτό οι κυτταρικές γραμμές που προέκυπταν από την διαδικασία του MLPC επαναδιεγείρονταν με το ειδικό πεπτιδίο παρουσία όλων των παραγόντων που ευνοούν την ανάπτυξη των CD8 T κυττάρων.

Πιο αναλυτικά, οι κυτταρικές γραμμές χρησιμοποιήθηκαν είτε απευθείας από την καλλιέργεια του MLPC είτε ξεπαγώθηκαν από το υγρό άζωτο με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Τα κύτταρα μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φρεάτια ανάλογα με τον αριθμό τους (4-6x10⁵ κύτταρα/M24 φρεάτιο). Στη συνέχεια αποψύχθηκαν τα ακτινοβολημένα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως APC. Στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα αντιγονοπαρουσίασης, εναλλάξ σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης: ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα ή ακτινοβολημένα EBV B μετασχηματισμένα κύτταρα κατάλληλου HLA. Τα κύτταρα διεγέρτες μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια 15 mL σε 1% HS-IDc με μέγιστη συγκέντρωση 6x10⁶ κύτταρα/mL. Ακολούθησε η προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20 µg/mL και επώαση για 60 min σε RT. Τα κύτταρα αναδεύονταν κάθε 15 min. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρήθηκαν και επιλέχθηκε ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια (10-20x10⁴ κύτταρα/M24 φρεάτιο). Ακολούθησε πλύση (400 g; 6 min; 21 °C), 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 προστέθηκαν στην κυτταρική γραμμή και τα πιάτα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (37 °C, 8%CO₂).

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. 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 συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και είτε παγώθηκαν (2-6x10⁶ κύτταρα/φιαλίδιο) είτε χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω εφαρμογές, όπως ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και η απομόνωση των CD8 T κυτταρικών κλώνων (**Εικ. 11**).



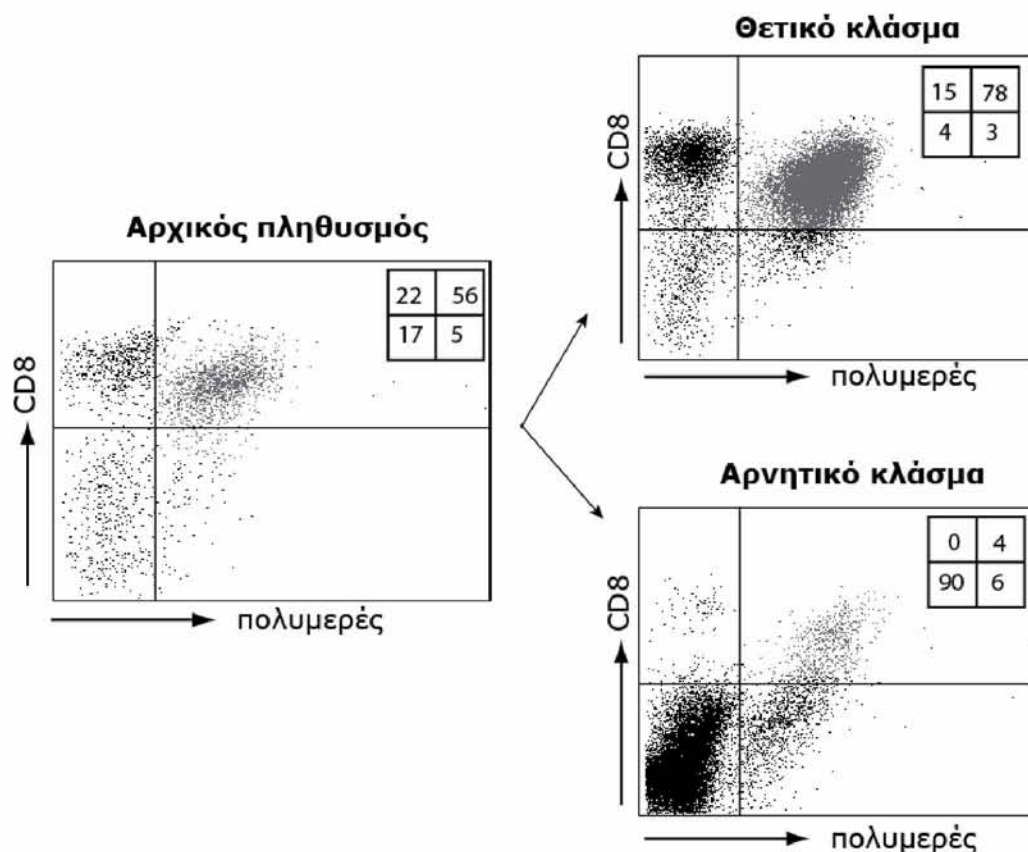
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της καλλιέργειας των T κυτταρικών γραμμών και κυτταρομετρική ανάλυση του ειδικού για το πολυμερές πλυσμού τις ημέρες 0 και 7 της καλλιέργειας. Στα τετράγωνα διακρίνονται τα ποσοστά των πληθυσμών στο κάθε τεταρτημόριο.

3.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ CD8 T ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

Οι ειδικοί CTL κλώνοι απομονώθηκαν από το γενικότερο πληθυσμό της καλλιέργειας με μαγνητικό διαχωρισμό και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν 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 (θετική επιλογή) και στον αρνητικό πληθυσμό που δεν συνδέεται στους μαγνήτες (αρνητική επιλογή). Για την απομόνωση των CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων το πιο ειδικό επιφανειακό μόριο είναι ο TCR και κατ' επέκταση το καταλληλότερο αντίσωμα για να συνδεθεί με τους μαγνήτες είναι το αντίστοιχο MHC-πολυμερές.

Αρχικά, οι CD8 T γραμμές είτε αποψύχθηκαν, είτε συλλέχθηκαν απευθείας από την καλλιέργεια. Ακολούθησε καλλιέργεια των γραμμών για μία εβδομάδα, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός τους ή/και το ποσοστό του θετικού πληθυσμού στην καλλιέργεια (βλέπε παρ. 3.7.). Την 7^η ημέρα γινόταν χρώση με MHC-πολυμερές και όταν επιβεβαιωνόταν η παρουσία του θετικού πληθυσμού ακολουθούσε μαγνητικός διαχωρισμός. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε σωληνάριο 15 mL και φυγοκεντρήθηκαν (400 g; 6 min). Επαναδιαλύ-

θηκαν σε 0,2 mL διαλύματος χρώσης 1% HS-PBS και ακολούθησε χρώση με το MHC-πολυμερές για 20 min στους 37 °C και στη συνέχεια με αντίσωμα αντι-CD32 σε αναλογία 1/10 για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (400 g; 6 min) σε διάλυμα χρώσης, επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL διαλύματος διαχωρισμού και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια πολυστυρενίου 15 mL. Τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν στη συσκευή διαχωρισμού ROBOSEP™ και πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας το Positive Selection Human PE Selection Kit της EasySep. Με την ολοκλήρωση του διαχωρισμού προστέθηκε μία ποσότητα (~1-2 mL) πλήρους θρεπτικού μέσου, αφού πρώτα καταγράφηκαν οι όγκοι του θετικού και αρνητικού κλάσματος, και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων σε κάθε κλάσμα. Ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων (20,000-100,000 κύτταρα) από κάθε κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος με χρώση με MHC-πολυμερή (**Εικ. 12**). Το αρνητικό κλάσμα παγώθηκε, ενώ το θετικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης.



Εικόνα 12: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρικής ανάλυσης του θετικού και αρνητικού κλάσματος ύστερα από μαγνητικό διαχωρισμό με τη χρήση του ειδικού πολυμερούς. Στα τετράγωνα διακρίνονται τα ποσοστά των πληθυσμών στο κάθε τεταρτημόριο.

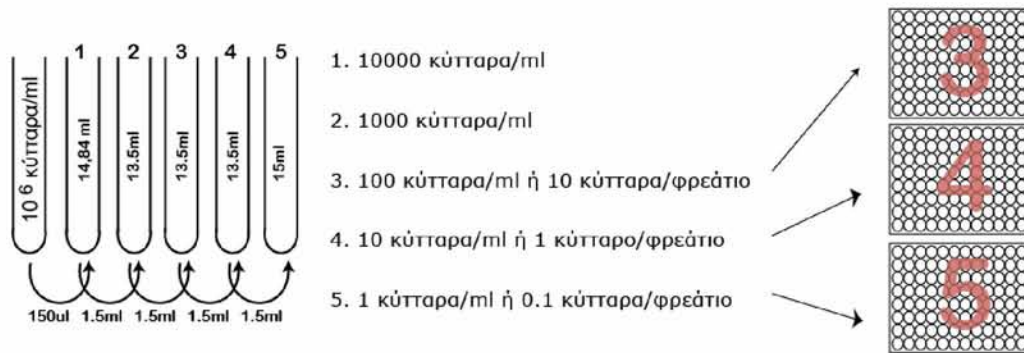
Ο θετικά επιλεγμένος πληθυσμός φυγοκεντρήθηκε (400 g; 6 min) και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο 10 %HS-IDc ώστε να βρεθεί σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/mL. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και οι αραιώσεις 10-0,1 κύτταρα/φρεάτιο τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας U96 (**Εικ. 13.A**). Στις πλάκες αυτές προστέθηκαν 20×10^3 EBV-B κύτταρα/φρεάτιο σαν APC μετά από επώαση με το ειδικό πεπτίδιο και 1×10^5 PBMCs/φρεάτιο σαν κύτταρα-τροφοί σε θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc με 100 U/mL IL-2, 20 ng/mL IL-4, 20 ng/mL IL-7 και 100 μM 1MW. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν για μία εβδομάδα σε θάλαμο επώασης (37 °C, 8% CO₂) και επαναδιεγέρθηκαν την 7η ημέρα με τις ίδιες αναλογίες κυττάρων και κυτταροκινών. Από την 9η μέχρι και την 14η 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 (**Εικ. 13.B**). Ακολούθησε χρώση με MHC-πολυμερή και εφόσον ανιχνεύονταν θετικός για το MHC-πολυμερές πληθυσμός >90% (**Εικ. 13.B.iv.**) τα κύτταρα επαναδιεγέρθηκαν για μία εβδομάδα, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά καρκινικά κύτταρα σαν APC και EBV-B κύτταρα σαν κύτταρα τροφούς με 100 U/mL IL-2, 20 ng/mL IL-4, 20 ng/mL IL-7 και 100 μM 1MW. Την 3η μέχρι και την 5η ημέρα μετά τη διέγερση πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου ή/και διαίρεση των κυττάρων σε νέα φρεάτια. Την 7η ημέρα επαναλήφθηκε η χρώση με MHC-πολυμερή και εφόσον επαληθεύθηκε η ύπαρξη καθαρού πληθυσμού τα κύτταρα παγώθηκαν ως CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος ($2-6 \times 10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο) ή επαναδιεγέρθηκαν για να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω εφαρμογές.

3.9. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ CD8 T ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

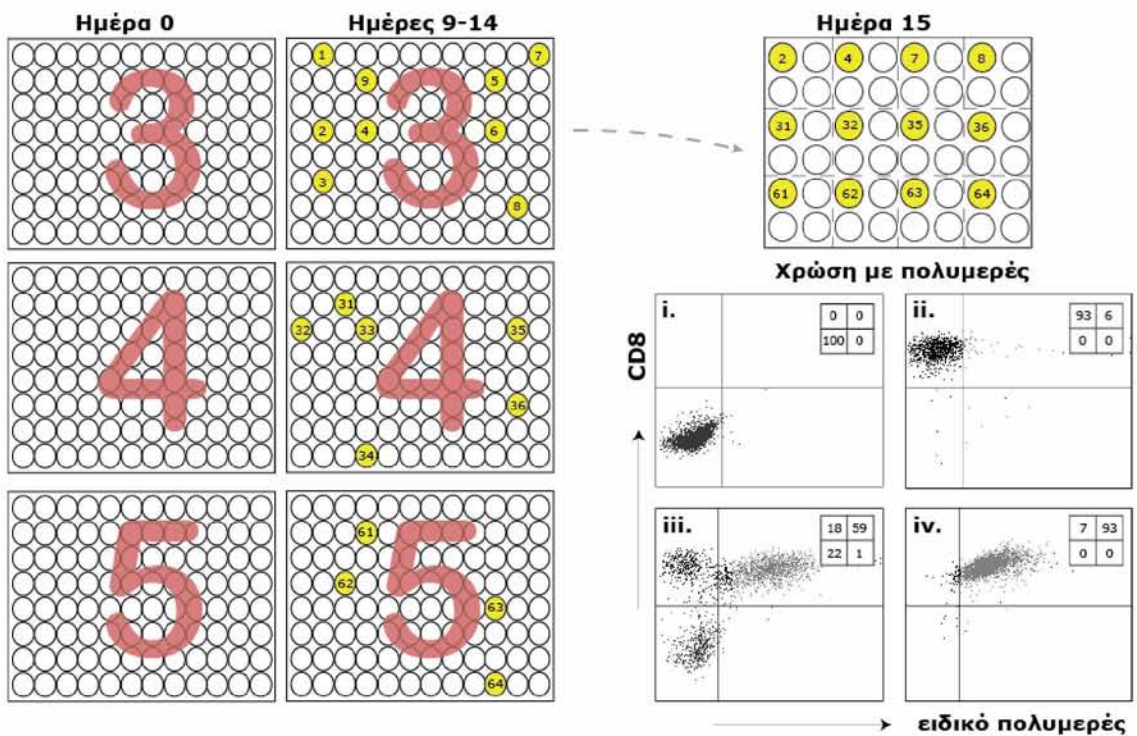
Ως CD8 T κυτταρολυτικός κλώνος ορίζεται ο πληθυσμός κυττάρων προερχόμενος από ένα αρχικό CD8 T ειδικό κύτταρο, ως εκ τούτου φέρει τα ίδια μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Σκοπός της καλλιέργειας αυτής ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των CTL, ώστε να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω εφαρμογές.

Για την καλλιέργεια των κλώνων τα κύτταρα μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φρεάτια ανάλογα με τον αριθμό τους ($\sim 0.6 \times 10^6$ κύτταρα/M24 φρεάτιο). Στη συνέχεια αποψύχθηκαν τα ακτινοβολημένα κύτταρα που χρησιμοποιούνταν ως APC και κύτταρα τροφοί. Στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα αντιγονοπαρουσίασης, εναλλάξ σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης: ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα κατάλληλου HLA σαν APC σε συνδυασμό με EBV-B κύτταρα άσχετου HLA σαν κύτταρα-τροφοί ή ακτινοβολημένα EBV-B κύτταρα κατάλληλου HLA σαν APC 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

A. Διαδοχικές αραιώσεις



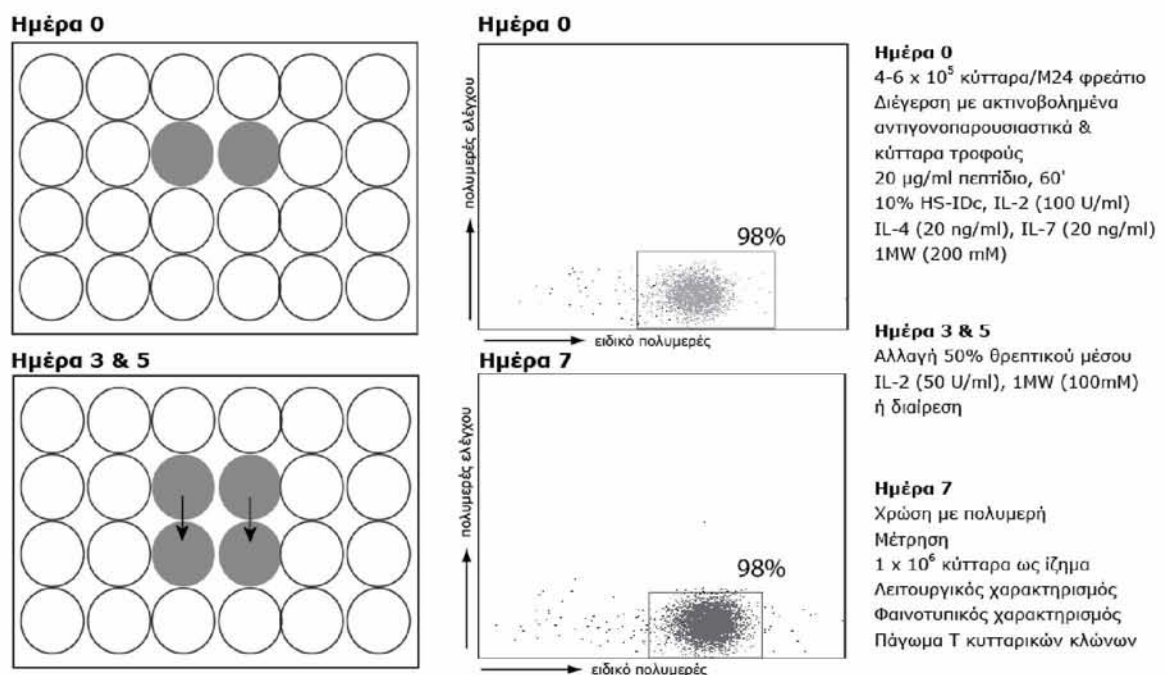
B. Ενεργοποίηση και επιλογή των κλώνων



Εικόνα 13: Βήματα που συμπεριλαμβάνονται στην απομόνωση των CTL **A.** Διαδοχικές αραιώσεις του θετικά επιλεγμένου πληθυσμού, μέχρι τη διάλυση του 1 κυττάρου/ml. **B.** Ύστερα από δύο διεγέρσεις οι καλλιέργειες ελέγχονται για την ανάπτυξη κυττάρων. Κύτταρα με υψηλό πολλαπλασιασμό μεταφέρονται σε μεγαλύτερα φρεάτια και ελέγχονται για την ύπαρξη ειδικού πληθυσμού. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι CD8- (i), CD8+ αρνητικά για το πολυμερές (ii), μικτοί πληθυσμοί κυττάρων (iii) ή και CD8+ ειδικοί για το πολυμερές T κυτταρικοί κλώνοι (iv). Μόνο οι τελευταίοι επιλέγονται για επαναδιέγερση και περαιτέρω ανάλυση.

συγκέντρωση 6×10^6 κύτταρα/mL. Ακολούθησε η προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/mL}$ και επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναδεύονταν κάθε 15 min. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρήθηκαν και επιλέχθηκε ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια ($10\text{-}20 \times 10^4$ APC/M24 φρεάτιο και $0,5\text{-}1 \times 10^6$ κύτταρα τροφοί/M24 φρεάτιο). Ακολούθησε πλύση (400 g; 6 min; 21 °C), επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο 10% HS-IDc και προσθήκη κυτταροκινών (100 U/mL IL-2, 40 ng/mL IL-4, 40 ng/mL IL-7 και 200 μM 1MW). Τέλος, τα κύτταρα διεγέρτες προστέθηκαν στα φρεάτια και τα πιάτα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO_2).

Την 3^η και 5^η ημέρα μετά τη διέγερση πραγματοποιήθηκε 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 7^η ημέρα συλλέχθηκε μία μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιήθηκε χρώση με το ειδικό και με μη ειδικό MHC-πολυμερές για να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου (**Εικ. 14**). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και είτε παγώθηκαν ($2\text{-}6 \times 10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο) είτε χρησιμοποιήθηκαν για το λειτουργικό και φαινοτυπικό χαρακτηρισμό.



Εικόνα 14: Καλλιέργεια των CTL και κυτταρομετρική ανάλυση μετά από χρώση με ειδικό πολυμερές και πολυμερές ελέγχου.

3.10. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση RNA γινόταν με τη χρήση TRI, λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων που είχαμε διαθέσιμα. Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε μορφή ιζήματος. Μόλις αποψύχθηκαν τοποθετήθηκαν απευθείας σε TRI ($5\text{-}10 \times 10^6$ κύτταρα/mL) και ομογενοποιήθηκαν με ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 20 sec και εισαγωγή του δείγματος 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G. Το υλικό επώαστηκε σε RT για 5 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση (12000 g ; 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο 1,5 mL ελεύθερου RNAσών και ακολούθησε προσθήκη 100 μL χλωροφορμίου. Τα δείγματα ανακινήθηκαν με αναστροφή του σωληναρίου, επώαστηκαν σε RT για 8 min και φυγοκεντρήθηκαν (12000 g ; 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέα σωληνάρια και προστέθηκαν 500 μL ισοπροπανόλη. Ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου για 10 sec, επώαση σε RT για 5 min και φυγοκέντρηση (12000 g ; 8 min; $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 mL αιθανόλη 75% με αναστροφή των σωληναρίων. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (7600 g ; 5 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα σωληνάρια παρέμειναν ανοικτά σε RT για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμιστεί η εναπομένουσα αιθανόλη. Προστέθηκαν 30 μL νερό ελεύθερο RNAσών και τα δείγματα τοποθετήθηκαν απευθείας σε πάγο.

Μία μικρή ποσότητα RNA (2 μL) χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση. Σαν τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNAσών σε κυβέτες UVette. Στην ίδια κυβέτα τοποθετήθηκε το άγνωστο δείγμα σε αραιώση 1/50 και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του σε ng/ μL . Επαλήθευση της συγκέντρωσης και έλεγχος της ποιότητας του δείγματος για την παρουσία γενομικού DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% με βρωμιούχο αιθίδιο. Εφόσον η συγκέντρωση του δείγματος υπερέβαινε τα 100 ng/ μL πραγματοποιήθηκε προσαρμογή της συγκέντρωσης με νερό ελεύθερο RNAσών και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.11. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

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 (Omniscript RT kit, 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 αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο έως ότου να χρησιμοποιηθούν. Αρχικά προετοιμάστηκε το μείγμα αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον πίνακα 21.

Πίνακας 21: Αναλογία αντιδραστηρίων για τη σύνθεση cDNA ανά δείγμα.

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
10xRT buffer	2,5
dNTP mix	2,5
RNAsin	0,31
Omniscript RT	1,25
RNase-free H ₂ O	4,44

Στη συνέχεια σε σωληνάρια PCR τοποθετήθηκαν 3,5 μL νερό με 4 μL τυχαία εξαμερή και 6,5 μL RNA. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στους 72 °C για 2 min και στη συνέχεια προστέθηκε 11 μL μείγματος αντιδραστηρίων. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 42 °C για 60 min και στη συνέχεια για 10 min στους 65 °C, ώστε να επέλθει αδρανοποίηση των ενζύμων. Με το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 25 μL νερό H₂O και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.12. ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ CD28 ΚΑΙ BCL2

Την 7^η ημέρα της καλλιέργειας συλλεγόταν κύτταρα σε μορφή ιζήματος ($0,2-1 \times 10^6$ κύτταρα) ώστε να διερευνηθεί η έκφραση μεταγράφων των μορίων CD28 και BCL2 με μοριακές τεχνικές. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια και απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο με δύο διαδοχικές πλύσεις με PBS. Μετά τη δεύτερη πλύση το υπερκείμενο συλλέχθηκε με προσοχή και το ίζημα ψύχθηκε απευθείας σε υγρό άζωτο και αποθηκεύθηκε στους -80°C. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε RNA, συντέθηκε cDNA και αναλύθηκαν με PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς τη b2m. Για τη μελέτη του CD28 χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές της Superarray (Cat PPH00822A) σε συνθήκες 95 °C για 10 min, ακολουθούμενοι από 40 κύκλους σε 95 °C για 15 sec και 60 °C για 60 sec. Για τη μελέτη του BCL2 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F 5'- ACC gTC gTg ACT TCg CAg Ag -3' και R 5'- ggT gTg CAg ATg CCg gTT CA -3' σε συνθήκες 95 °C για 10 min, ακολουθούμενοι από 45 κύκλους σε 95 °C για 10 sec, 57 °C για 10 sec, 72 °C για 40 sec και 82 °C για 8 sec. Η μέτρηση του φθορισμού γινόταν στους 82 °C για την αποφυγή φθορισμού λόγω σχηματισμού διμερών.

3.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ TCR

Η ανάλυση του ειδικού υποδοχέα των CD8 T κυτταρικών κλώνων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής και με PCR.

α) Ανάλυση του TCR με κυτταρομετρία ροής

Με τη χρήση του τεστ IOTest Beta Mark διαπιστώθηκε η ειδικότητα 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 φυσιολογικών TCR του ανθρώπου. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια ($0,5-1 \times 10^6$ κύτταρα) και απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο με πλύση με PBS. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, τα κύτταρα επαναδουαλύθηκαν σε 1 mL PBS και χωρίστηκαν σε 10 φιαλίδια στα οποία είχαν προστεθεί τα αντισώματα του τεστ σε συνδυασμό με αντι-CD8-PC5 αντίσωμα. Ακολούθησε χρώση σε RT για 20 min στο σκοτάδι, πλύση με PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 0,5% FA-PBS. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση τον πληθυσμό των ζωντανών CD8⁺ κυττάρων και θεωρήθηκε αποδεκτό ένα τεστ όταν το σύνολο των CD8⁺ κυττάρων ήταν θετικό για έναν μόνο από τους 24 συνδυασμούς αντισωμάτων που αντιστοιχεί σε μία Vb αλυσίδα του TCR.

β) Ανάλυση του TCR με PCR

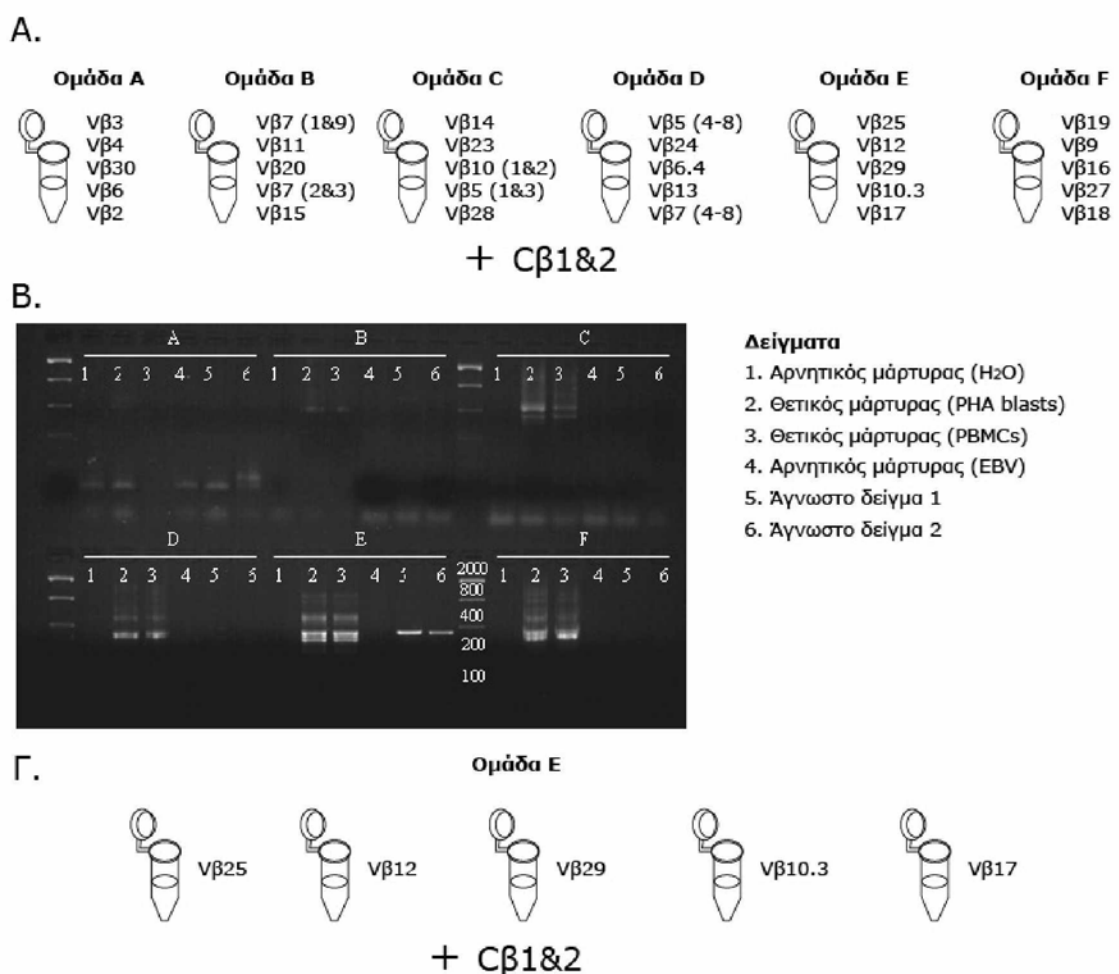
Η ανάλυση της αλυσίδας του TCR με PCR πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε η ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TCR και στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρης της β αλυσίδας.

Η ταυτοποίηση της Vβ περιοχής πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο mRNA σε δείγματα κλώνων από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και υγιείς μάρτυρες ίδιας ηλικιακής ομάδας, όπου αυτό κατέστη δυνατόν. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν $0,5-1 \times 10^6$ κύτταρα του κλώνου και παγώθηκαν 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 (**Εικ. 15.A**) με βάση επιλεγμένους εκκινητές (**Πιν.22**). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 94 °C για 5 min, ακολουθούμενοι από 35 κύκλους σε 94 °C για 45 sec, 70 °C για 60 sec, 72 °C για 90 sec και τελική επιμήκυνση 72 °C για 10 min.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης με πυκνότητα 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (**Εικ. 15.B**). 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 (**Εικ. 15.Γ**). 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, ενισχύθηκε το τμήμα Vβ-Cβ με PCR στις συνθήκες που αναφέρθηκαν και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του προϊόντος από την πηκτή και καθαρισμός με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε 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 (Applied Biosystems). Η αλληλουχία που προέκυψε συγκρίθηκε με τις γνωστές αλληλουχίες των περιοχών V-D-J-C της β αλυσού που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων ImMunoGeneTics (www.imgt.org) και διαπιστώθηκε έτσι η πλήρης σύσταση της β αλυσίδας του TCR.



Εικόνα 15: Ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TCR. **A.** Multiplex PCR με μείγματα εκκινητών που καλύπτουν τις Vβ αλυσίδες του TCR. **B.** Απεικόνιση των προϊόντων της Multiplex PCR σε πηκτή αгарόζης (A-F οι ομάδες των εκκινητών). Εφόσον κάθε κλώνος φέρει μία αλυσίδα Vβ αναμένεται ένα μοναδικό προϊόν (Ομάδα E, 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.

Πίνακας 22: 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

*ονοματολογία σύμφωνα με τη διεθνή βάση δεδομένων IMGT [172,173]

Στις περιπτώσεις όπου από το ίδιο δείγμα αίματος ασθενούς ή υγιούς δότη είχαν προκύψει περισσότερες της μίας κυτταρικές γραμμές εκ των οποίων μία τουλάχιστον είχε ταυτοποιηθεί με την παραπάνω διαδικασία ακολούθησε 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.

3.14. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ CD8 T ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CTL περιελάμβανε την έκφραση δεικτών επιφανείας που χαρακτηρίζουν το στάδιο διαφοροποίησης τους (**Πiv.14**) 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) και μας έδιναν είτε θετικό (αντίσωμα έναντι δείκτη που φέρουν τα κύτταρα) είτε αρνητικό φθορισμό (αντίσωμα έναντι δείκτη που δεν φέρουν τα κύτταρα).

Αρχικά, συλλέχθηκε ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων ($\sim 5 \times 10^6$ κύτταρα) και ακολούθησε πλύση με 1% HS-PBS (1600 rpm; 5 min). Τα κύτταρα χωρίστηκαν σε 10 φιαλίδια χρώσης και η πλύση επαναλήφθηκε στη μικροφυγόκεντρο (4000 rpm; 4 min). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν τα αντισώματα που φαίνονται στον πίνακα 23.

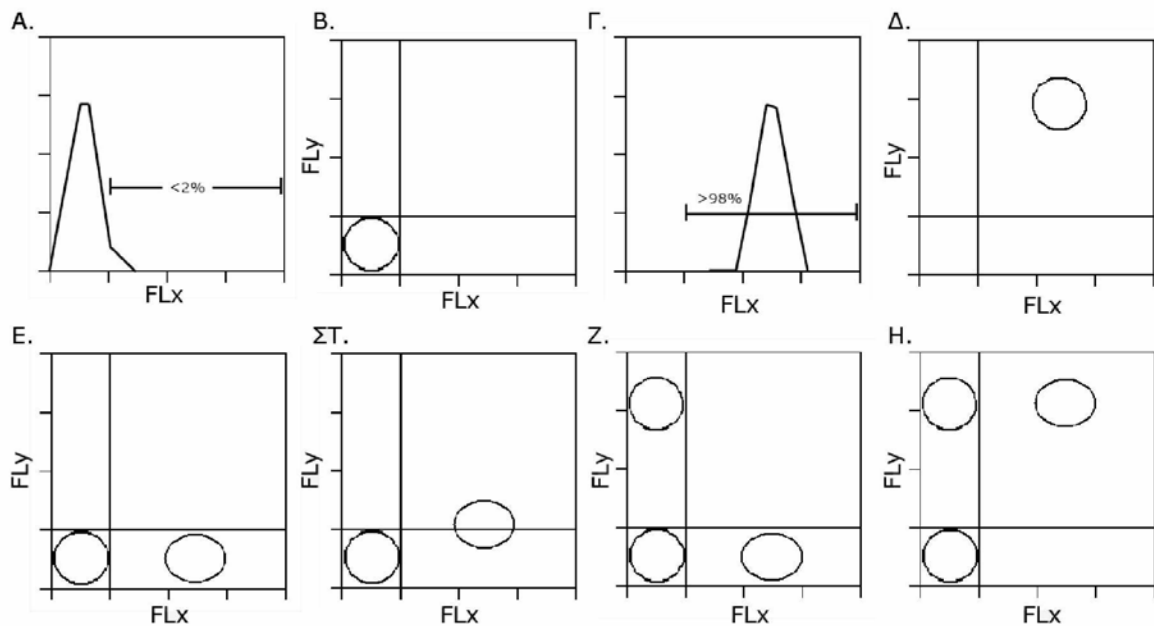
Πίνακας 23: Συνδυασμοί αντισωμάτων για τη ρύθμιση των παραμέτρων κατά το σχεδιασμό πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας ροής.

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

Τα δείγματα επώαστηκαν για 20 min στους 4 °C στο σκοτάδι. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα χρώσης και ακολούθησε πλύση (4000 rpm; 4 min). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 0,5% FA-PBS και αναλύθηκε στο κυτταρόμετρο. Με βάση τους ισοτυπικούς μάρτυρες (φιαλίδια 1-4) καθορίστηκε η τάση για κάθε κανάλι (FL1-FL4 αντίστοιχα), ώστε ο φθορισμός να είναι <2% (**Εικ. 16.A.**). Ο συνδυασμός (φιαλίδιο 5) χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει τη σωστή λειτουργία του πρωτοκόλλου (**Εικ. 16.B.**). Με βάση τα φιαλίδια 6-9 καθορίστηκε η ηλεκτρονική απόσβεση για κάθε κανάλι (FL1-FL4 αντίστοιχα) και ο συνδυασμός των αντισωμάτων (φιαλίδιο 10) χρησιμοποιήθηκε για να γίνουν μικρές τροποποιήσεις στις τιμές αυτές, ώστε οι πληθυσμοί που συνεκφράζουν δύο αντισώματα να έχουν τη σωστή κυτταρομετρική εικόνα (**Εικ. 16.Γ-Δ.**).

Σε ένα δεύτερο στάδιο δοκιμάστηκε εάν το πρωτόκολλο που είχε δημιουργηθεί μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τα υπό εξέταση επιφανειακά αντιγόνα με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων που κυκλοφορούν στο εμπόριο. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 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 πραγματοποιήθηκαν μικρές τροποποιήσεις στην ηλεκτρονική απόσβεση, ώστε όλοι οι πληθυσμοί να φαίνονται κάθετοι ή παράλληλοι με τους άξονες όταν απεικονίζονται σε στικτόγραμμα (**Εικ. 16.E-H.**).

Τέλος, δοκιμάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις των υπό διερεύνηση δεικτών, ώστε να αποκλειστεί η μη ειδική σύνδεση και να καθοριστεί η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιήθηκε το κάθε αντίσωμα. Οι παράμετροι που προέκυπταν από τη διαδικασία αυτή αποθηκεύτηκαν στον αναλυτή και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου.



Εικόνα 16: 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 (ΣΤ), με ρύθμιση (Ε). **Ζ-Η.** Σωστή απεικόνιση των πληθυσμών έπειτα από ρύθμιση των παραμέτρων. Όλοι οι πληθυσμοί πρέπει να φαίνονται κάθετοι ή παράλληλοι με τους άξονες όταν απεικονίζονται σε στικτόγραμμα.

3.14.2. CD8 T ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΟΙ ΚΛΩΝΟΙ

Η φαινοτυπική ανάλυση των κλώνων λάμβανε χώρα την 7η μέρα της καλλιέργειας του κλώνου. Μικρός αριθμός κυττάρων ($\sim 3 \times 10^5$ κύτταρα) συλλέχθηκαν από την κάθε καλλιέργεια και χωρίστηκαν σε τρία φιαλίδια χρώσης. Ακολούθησαν δύο πλύσεις σε 1% HS-PBS (4000 rpm; 4 min) ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Στο πρώτο φιαλίδιο έγινε χρώση με τετραμερές (βλέπε παρ. 3.6.γ) ώστε να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου στην καλλιέργεια. Στο δεύτερο φιαλίδιο προστέθηκαν τα αντισώματα αντι-CD45RA-FITC, CD45RO-ECD, CCR7-PE, και CD8-PC5 και στο τρίτο φιαλίδιο τα αντισώματα αντι-CD28-PE, CD57-FITC και CD8-PC5. Όλα τα αντισώματα προστέθηκαν σε αραιώση 1/20, εκτός από το CD45RO-ECD στο οποίο χρησιμοποιήθηκε αραιώση 1/10. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 4 °C για 30 min και ακολούθησε πλύση με 1% HS-PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 0,5% FA-PBS. Η ανάλυση έγινε με βάση το CD8+ πληθυσμό και μελετήθηκαν 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 24. Οι συνδυασμοί των mAb που χρησιμοποιήθηκαν για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CD8 T κυτταρικών κλώνων

	FITC	PE	ECD	PC5
1	CD8	πολυμερές		
2	CD45RA	CD45RO	CCR7	CD8
3	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 έλαβε χώρα την ημέρα που ξεπαγώνονταν τα κύτταρα και επαναλήφθηκε την 7η ημέρα της καλλιέργειας. Μικρός αριθμός κυττάρων ($\sim 3 \times 10^5$ κύτταρα/φιαλίδιο) συλλέχθηκε από την καλλιέργεια και χωρίστηκε σε δύο φιαλίδια χρώσης. Ακολούθησαν δύο πλύσεις σε 1% HS-PBS (4000 rpm; 4 min) ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Αρχικά έγινε χρώση με τετραμερές για 20 min στους 37 °C. Στο ένα φιαλίδιο προστέθηκαν τα αντισώματα αντι-CCR7-APC (1/10), CD45RO-ECD (1/10), CD8-PC7 (1/50) και CD28-FITC (1/20) και στο δεύτερο φιαλίδιο τα αντισώματα αντι-CCR7-APC (1/10), CD45RO-ECD (1/10), CD8-PC7 (1/50) και CD57-FITC (1/20). Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37 °C για άλλα 30 min και ακολούθησε πλύση με 1% HS-PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα 0,5% FA-PBS. Η ανάλυση έγινε με βάση το CD8⁺ πληθυσμό και μελετήθηκαν η έκφραση των μορίων CD45RO, CCR7, CD28 και CD57 οριοθετώντας στον θετικό για το πολυμερές πληθυσμό.

Πίνακας 25. Οι συνδυασμοί των mAb που χρησιμοποιήθηκαν για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CD8 T κυτταρικών γραμμών

	FITC	PE	ECD	APC	PC7
1	CD28	πολυμερές	CD45-RO	CCR7	CD8
2	CD57	πολυμερές	CD45-RO	CCR7	CD8

3.15. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ CD8 T ΚΛΩΝΩΝ

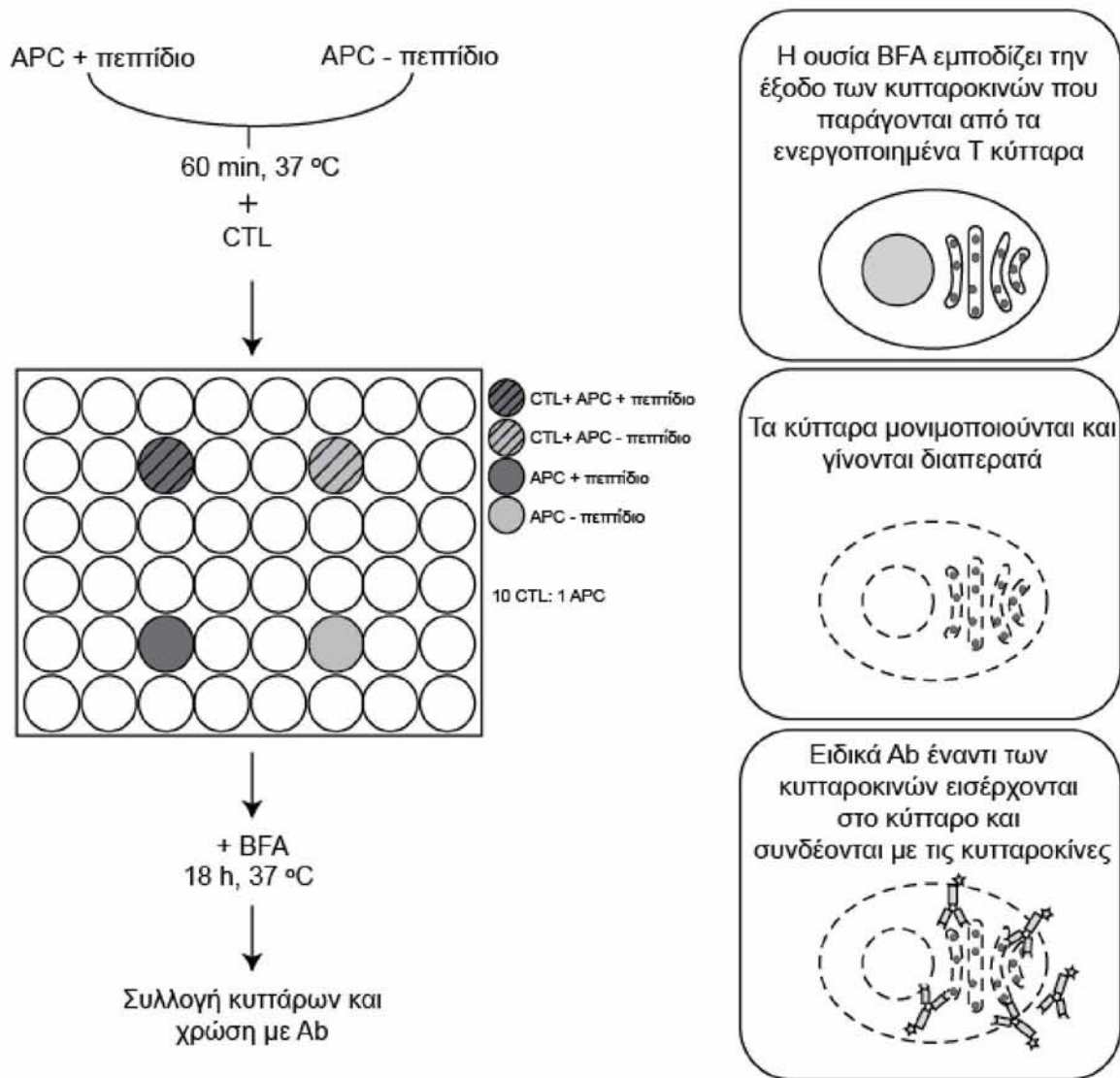
Οι CD8 T κυτταρολυτικοί κλώνοι μελετήθηκαν λειτουργικά όσον αφορά την ικανότητά τους να λύουν κύτταρα στόχους και να παράγουν κυτταροκίνες έπειτα από ειδική διέγερση. Η λυτική ικανότητα μελετήθηκε με τη χρήση Cr⁵¹, ενώ η ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών προσεγγίστηκε με κυτταρομετρία ροής καθώς και με μικροσφαιριδική κυτταρομετρία.

3.15.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ – ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΧΡΩΣΗ

Η ικανότητα των T κυττάρων να παράγουν κυτταροκίνες έπειτα από ειδική διέγερση αποτελεί βασικό στοιχείο της λειτουργικότητάς τους. Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να ποσοτικοποιήσουν την έκκριση κυτταροκινών, όπως Elisa, Elispot, μοριακές τεχνικές, κυτταρομετρία ροής κ.ά. Το πλεονέκτημα της ενδοκυττάριας χρώσης είναι ότι διατηρεί τη σύνδεση με το αρχικό κύτταρο το οποίο μπορεί παράλληλα να χαρακτηριστεί με εξωκυττάριους δείκτες. 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 (**Εικ. 17**). Τα T κύτταρα μπορούν να σημανθούν ταυτόχρονα και με εξωκυττάριους δείκτες και με αυτόν τον τρόπο να χαρακτηριστούν περαιτέρω.

Η διαδικασία ξεκινούσε την 7^η ημέρα μετά τη τελευταία ενεργοποίηση του κλώνου. Τα κύτταρα (~1x10⁶ κύτταρα) διατηρήθηκαν σε κατάσταση ηρεμίας με σταδιακή μείωση της IL-2 στην καλλιέργεια από 50 U/mL IL-2 σε 25 U/mL IL-2 την ημέρα 7 και 10 U/mL IL-2 την ημέρα 9. Την 9^η-11^η ημέρα της καλλιέργειας τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε πλύση, επαναδιάλυση σε 10% HS-IDc και καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο M48 φρεάτια, ένα για την ειδική και ένα για τη μη ειδική ενεργοποίηση και τοποθετήθηκαν στους 37 °C, έως ότου ετοιμαστούν τα κύτταρα διεγέρτες (**Εικ. 17**).

Σαν APC κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα κατάλληλου HLA σε καλλιέργεια. Τα καρκινικά κύτταρα συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια (2x10⁶ κύτταρα) και χωρίστηκαν σε δύο φιαλίδια των 15 mL σε 1% HS-IDc. Ακολούθησε η προσθήκη του ειδικού και του μη ειδικού πεπτιδίου αντίστοιχα σε συγκέντρωση 20 µg/mL και επώαση για 60 min σε RT. Τα κύτταρα αναδεύονταν κάθε 15 min. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρήθηκαν και επιλέχθηκε ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την ενεργοποίηση των CTL (αναλογία 10 CTL:1 καρκινικό). Ακολούθησε πλύση (400 g; 6 min; 21 °C), επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο 10% HS- IDc και προσθήκη 10 U/ml



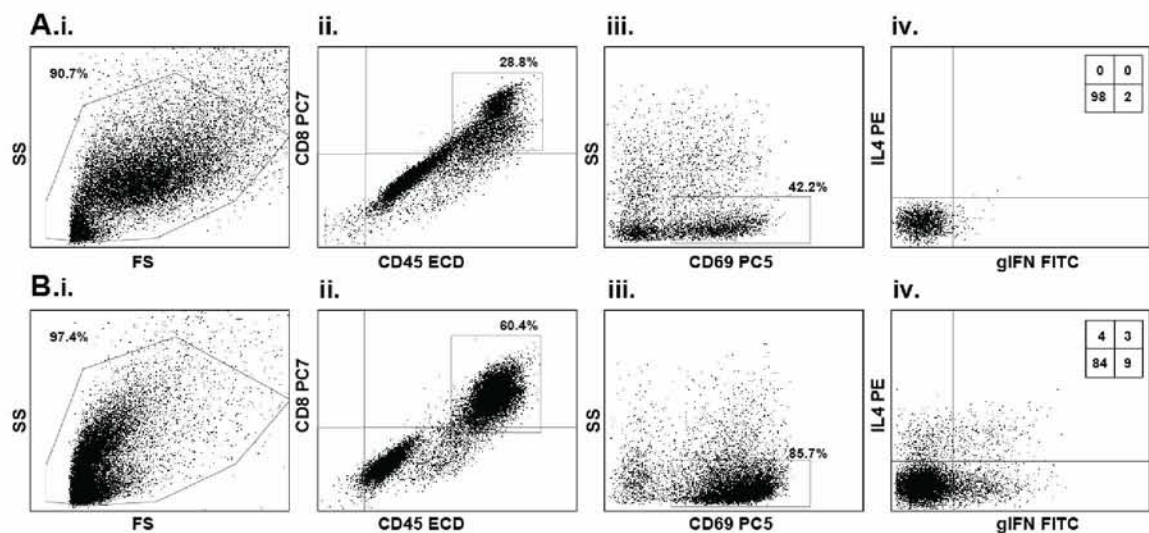
Εικόνα 17: Διαδικασία της ενδοκυττάριας χρώσης κυτταροκινών και αρχή της μεθόδου.

IL-2. Τα καρκινικά κύτταρα προστέθηκαν στα CTL και επώαστηκαν για 60 min στους 37 °C, 8% CO₂. Κύτταρα διεγέρτες τοποθετήθηκαν επίσης σε ξεχωριστά φρεάτια για να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες (**Εικ. 17**). Μετά την επώαση προστέθηκε η ουσία BFA σε αραιώση 1/500 και τα κύτταρα παρέμειναν στο θάλαμο επώασης για άλλες 18 ώρες. Η ουσία αυτή μπλοκάρει την μεταφορά των πρωτεϊνών που παράγονται στη συσκευή Golgi με αποτέλεσμα αυτές να συσσωρεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο [174].

Την επόμενη μέρα τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε φιαλίδια χρώσης και ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 rpm; 4 min), ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα χρώσης και η πλύση επαναλήφθηκε στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ειδικό διάλυμα που προκαλούσε οπές στην μεμβράνη των κυττάρων και τοποθετήθηκε για 20 min

στους 4 °C. Στην συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα πλύσης και ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 rpm; 4 min). Τα κύτταρα διαλύθηκαν σε διάλυμα πλύσης και χωρίστηκαν σε δύο φιαλίδια για τη χρώση με τις διαφορετικές κυτταροκίνες. Η πλύση επαναλήφθηκε στις ίδιες συνθήκες και στο διάστημα αυτό προετοιμάστηκαν για τη χρώση δύο συνδυασμοί αντισωμάτων: ο πρώτος περιελάμβανε τα αντισώματα αντι-CD69-PC5 (1/10), CD8-PC7 (1/10), CD45-ECD (1/10), IFN-g-FITC (1/5), IL-4-PE (1/5) 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). Ακολούθησε επαναδιάλυση των κυττάρων στο μίγμα των αντισωμάτων και επώαση για 30 min στους 4 °C. Τέλος, τα κύτταρα πλύθηκαν με διάλυμα πλύσης (4000 rpm; 4 min) και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα χρώσης 1% HS-IDc.

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια κυτταρομετρικής ανάλυσης και αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον CD8⁺ CD45⁺ CD69⁺ πληθυσμό και ελέγχθηκε η έκφραση των κυτταροκινών από τα κύτταρα του κλώνου που ενεργοποιήθηκαν ειδικά σε σχέση με την μη ειδική διέγερση (**Εικ. 18**). Σε ένα πρώτο στικτόγραμμα επιλέχθηκε με οριοθέτηση ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων (**Εικ. 18.i.**). Από αυτά επιλέχθηκε ο πληθυσμός των CD8⁺ CD45⁺, ώστε να αποφευχθεί μη ειδικός φθορισμός από τα κύτταρα διεγέρτες (**Εικ. 18.ii.**). Σε αυτά τα όρια ελέγχθηκε η ειδική ενεργοποίηση (**Εικ. 18.iii.**) και παραγωγή κυτταροκινών (**Εικ. 18.iv.**).



Εικόνα 18: Κυτταρομετρική ανάλυση της ενδοκυττάριας χρώσης για την παραγωγή κυτταροκινών. **A.** Μη ειδική διέγερση **B.** Ειδική διέγερση. Αρχικά επιλέχθηκε ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων (i). Έγινε οριοθέτηση στον πληθυσμό των CD8⁺ T κυττάρων (ii) και ελέγχθηκε η ενεργοποίησή τους (iii) και η ικανότητά τους να παράγουν κυτταροκίνες (iv).

3.15.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ - ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟ-ΜΕΤΡΙΑ

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 και αναλυτής Luminex100.

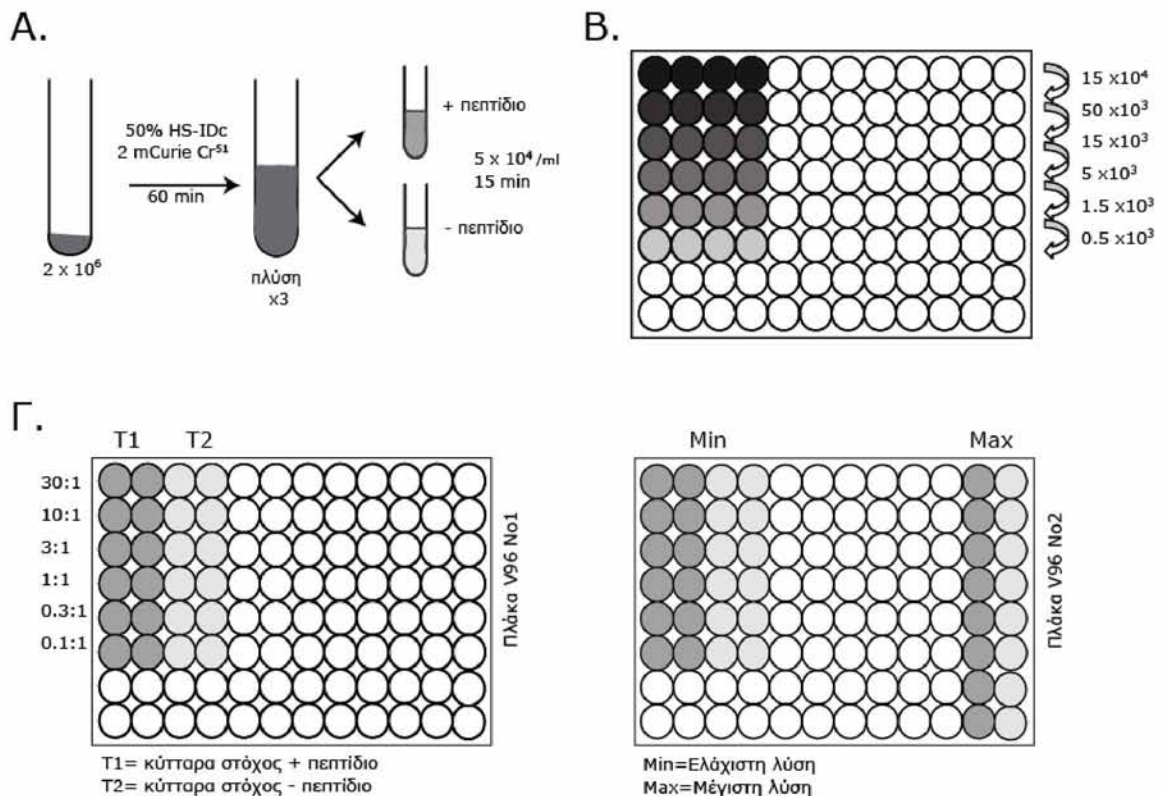
Η διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων ήταν όμοια με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας χρώσης, με τη διαφορά πως τα CTL επωάστηκαν για 18 ώρες με τα APC κύτταρα απουσία BFA. Με τον τρόπο αυτό οι κυτταροκίνες που παράγονταν εκκρίνονταν στο θρεπτικό μέσο. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε φιαλίδια 15 mL και ακολούθησε φυγοκέντρηση (1600 rpm; 5 min). Το θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80 °C σε κλάσματα των 500 μL, ενώ τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια erpendorf και παγώθηκαν ως ίζημα σε LN₂. Για την ανάλυση των δειγμάτων με μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία τα δείγματα αποψύχθηκαν και 50 μL χρησιμοποιήθηκαν σαν διπλότυπα για τον έλεγχο παραγωγής κυτταροκινών, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.15.3. ΛΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Τα ενεργοποιημένα CD8 T κύτταρα λύουν οποιοδήποτε κύτταρο παρουσιάζει στην επιφάνειά του το ειδικό πεπτιδίο που αναγνωρίζουν, συνδεδεμένο στο σύμπλοκο MHC. Συνεπώς η λειτουργικότητα των CTL μπορεί να καθοριστεί μετρώντας τη θανάτωση κυττάρων στόχων από τα κυτταρολυτικά T κύτταρα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η δοκιμασία της απελευθέρωσης ⁵¹Cr (⁵¹Cr-release assay). Όλα τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ενσωματώσουν, χωρίς να απελευθερώνουν αυτόματα, μέσω της αντλίας K-Na, ραδιενεργά σεσημασμένο χρωμικό άλας του νατρίου (Na₂⁵¹CrO₄). Όταν αυτά τα σεσημασμένα κύτταρα θανατωθούν από τα CTL μετά από αλληλεπίδρασή τους, το 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 CTL που απομονώθηκαν. Αρχικά, τα κύτταρα στόχοι (~2 x10⁶/ανάλυση) συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια σε φιαλίδια 15 mL και ακολούθησε πλύση με 10% HS-IDc (1600 rpm; 6 min). Αφαιρέθηκε όσο δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε αντίστοιχο όγκο θρεπτικού μέσου 50% HS-IDc με αυτόν που αντιστοιχούσε σε 2 mCurie Cr⁵¹ με βάση τον χρόνο ημιζωής του. Στη συνέχεια προστέθηκε το χρώμιο και τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37 °C, έτσι ώστε αυτό να εισέλθει στο εσωτερικό τους μέσω της αντλίας Na-Ka. Τα κύτταρα καλύφθηκαν με φύλλα μολύβδου και αναδεύονταν κάθε 15 min. Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε τελικό όγκο 10 mL ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια Cr που δεν απορροφήθηκε από τα κύτταρα. Στη

συνέχεια τα κύτταρα μετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer και χωρίστηκαν σε δύο φιαλίδια με συγκέντρωση 5×10^4 /mL. Στο πρώτο προστέθηκε το ειδικό πεπτίδιο σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ενώ στο δεύτερο δεν προστέθηκε πεπτίδιο (**Εικ. 19.A**). Τα κύτταρα στόχοι επώαστηκαν με το πεπτίδιο για 15 min σε RT. Στο διάστημα αυτό προετοιμάστηκαν τα CTL. Στην 1^η σειρά πλάκας 96 φρεατίων σχήματος V, τοποθετήθηκαν 60×10^3 κυτταρολυτικά/φρεάτιο και ακολούθησαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις 3/1 (**Εικ. 19.B**). Με το πέρασμα της επώασης προστέθηκαν τα κύτταρα στόχοι σε αναλογίες 30:1, 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1 και 0.1:1 (**Εικ. 19.Γ**). Οι πλάκες φυγοκεντρήθηκαν (800 rpm; 6 min), και ακολούθησε επώαση (4 ώρες, 37 °C, 8% CO₂). Σε χωριστά φρεάτια τοποθετήθηκαν επίσης κύτταρα στόχοι τα οποία θανατώθηκαν πλήρως με τη χρήση απορρυπαντικού 1% TritonX-IDc (μέγιστη λύση) και κύτταρα στόχοι στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε καμία επέμβαση (ελάχιστη λύση) (**Εικ. 18.Γ**). Τα δείγματα αυτά αποκάλυψαν τις τιμές της μέγιστης και ελάχιστης απελευθέρωσης χρωμίου.



Εικόνα 19: Λυτική ικανότητα με τη χρήση ⁵¹Cr. **A.** Προετοιμασία των κυττάρων στόχων. **B.** Προετοιμασία των CTL. **Γ.** Στις αραιώσεις των CTL προστέθηκαν 5×10^3 κύτταρα στόχοι, ώστε να έχουμε τις επιθυμητές αναλογίες (πλάκα No1). Ίδιος αριθμός κυττάρων τοποθετήθηκαν σε άλλη πλάκα (No2) για τις τιμές της μέγιστης και ελάχιστης λύσης.

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

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

Θετικό θεωρούνταν ένα τεστ όταν η τιμή της ειδικής λύσης ήταν >10% και υπήρχε διαφορά τουλάχιστον 1SD ανάμεσα στα κύτταρα στόχους που επώαστηκαν με το ειδικό πεπτίδιο σε σχέση με αυτά που δεν επώαστηκαν με πεπτίδιο. Επίσης, για να θεωρηθεί έγκυρο το αποτέλεσμα απαραίτητη προϋπόθεση ήταν τα κύτταρα στόχοι να παρουσίαζαν αυτόματη απελευθέρωση Cr <15%, το οποίο αποτελεί ένδειξη της βιωσιμότητας των κυττάρων στόχων.

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 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 συλλέχτηκαν από την καλλιέργεια και σημανθήκαν με Cr⁵¹ όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Κατά τη διάρκεια της επώασης με το Cr⁵¹ προετοιμάστηκαν οι αραιώσεις του ειδικού πεπτιδίου. Σε φρεάτια πλάκας V96 τοποθετήθηκε σε διπλά αντίγραφα θρεπτικό υλικό 1% HS-IDc που περιείχε 60000 ng/ml του πεπτιδίου που αναγνωρίζει ο ειδικός T κυτταρικός κλώνος. Ακολούθησαν 11 διαδοχικές αραιώσεις 1/3 αλλάζοντας τα ρύγχη κάθε τρεις διαδοχικές αραιώσεις. Στην δωδέκατη θέση τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς την προσθήκη πεπτιδίου. Με την ολοκλήρωση της σήμανσης με το Cr⁵¹, σε όλα τα φρεάτια με τις αραιώσεις του πεπτιδίου προστέθηκαν τα κύτταρα στόχοι σε αναλογία 5000 κύτταρα/φρεάτιο και επώαστηκαν για 30 min στους 37 °C. Ακολούθησε πλύση με 1% HS-IDc (1800 rpm, 5 min), αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 10% HS-IDc. Τέλος προστέθηκαν τα CTL σε αναλογία 10:1 ως προς τα κύτταρα στόχους και τοποθετήθηκαν στους 37 °C, 8% CO₂ για 4 hrs.

Με το πέρας της επώασης συλλέχθηκε με προσοχή το 50% του υπερκειμένου από κάθε φρεάτιο και υπολογίστηκε η λύση σύμφωνα με τον ίδιο τύπο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της λυτικής ικανότητας (βλέπε παρ. 3.15.3).

3.15.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ως επιβεβαίωση της λυτικής ικανότητας των CTL χρησιμοποιήθηκε μία εναλλακτική μέθοδος αξιολόγησης της κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρία ροής [175]. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται εξωκυτταριοί δείκτες για να σηματοδοτούν τα δραστικά κύτταρα και η 7-άμινο ακτινομυκίνη D (7-AAD) για τη σήμανση των αποπτωτικών κυττάρων στόχων.

Πιο συγκεκριμένα τα κύτταρα στόχοι ($\sim 2 \times 10^6$ /ανάλυση) συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια σε φιαλίδια 15 mL και ακολούθησε πλύση με 10% HS-IDc (1600 rpm; 6 min). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 mL θρεπτικού μέσου 1% HS-IDc. Στο πρώτο φιαλίδιο προστέθηκε το ειδικό πεπτιδίο σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g/mL}$ ενώ στο δεύτερο δεν προστέθηκε πεπτιδίο (15 min, RT). Τα κύτταρα στόχοι καταμετρήθηκαν, η συγκέντρωσή τους προσαρμόστηκε σε 2×10^5 κύτταρα/mL και τοποθετήθηκαν σε πλάκες V96 με τα CTL σε αναλογίες 12:1, 6:1 και 3:1 (CTL:κύτταρα στόχοι). Οι πλάκες φυγοκεντρήθηκαν (800 rpm; 6 min), και ακολούθησε επώαση για 4 h στους 37 °C σε θάλαμο με 8% CO₂. Σε χωριστά φρεάτια τοποθετήθηκαν επίσης κύτταρα στόχοι για τις τιμές της μέγιστης και ελάχιστης λύσης, όπως περιγράφηκε στην παρ. 2.18.3.

Με το πέρας της 4ωρης επώασης οι πλάκες φυγοκεντρήθηκαν (1500 rpm, 5 min) και ακολούθησε πλύση με 1% HS-PBS. Ακολούθησε χρώση των φρεατίων με CD8-FITC (1/25), CD19-PE (1/10) και 7AAD (1/20) για 30 min στους 4 °C. Με το τέλος της επώασης οι πλάκες φυγοκεντρήθηκαν (1500 rpm, 5 min), ακολούθησε πλύση με 1% HS-PBS και μονιμοποίηση με 1% HS-PBS. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο με βάση τον CD19⁺7AAD⁺ πληθυσμό, οριοθετώντας στον CD8⁻ πληθυσμό. Η κυτταροτοξικότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με τον ίδιο τύπο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της λυτικής ικανότητας (βλέπε παρ. 3.15.3).

Εναλλακτικά, μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων προστέθηκαν 10³ σφαιρίδια σε κάθε δείγμα και τα δείγματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο με βάση τον CD19⁺ πληθυσμό, οριοθετώντας στον CD8⁻ πληθυσμό. Η κυτταροτοξικότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο: % ειδική λύση = $[1 - (\text{CD19}^+ / \text{CD8}^-)] \times 100$

3.15.6. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ IFN- γ

Σε όλες τις δοκιμασίες του λειτουργικού χαρακτηρισμού ήταν απαραίτητη η επώαση των κυττάρων στόχων με τα πεπτιδία ώστε να γίνει η αντιγονοπαρουσίαση, καθώς αυτά παρουσιάζονται σε πολύ μικρό βαθμό έως καθόλου από τα καρκινικά κύτταρα [176, 177]. Για να προκληθεί η επεξεργασία και παρουσίαση των πεπτιδίων στην επι-

φάνεια των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η IFN- γ , σε μία προσπάθεια να προσομοιωθεί το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον στην περιοχή του όγκου.

Τα καρκινικά κύτταρα καλλιιεργήθηκαν όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.6. Την ημέρα 1-2 της καλλιέργειας, όταν τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί στην πλαστική επιφάνεια προστέθηκε η IFN- γ στο υπερκείμενο και αφέθηκε να δράσει για δύο ημέρες. Δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις της IFN- γ , 3 ng/mL, 9 ng/mL, 50 ng/mL και 100 ng/mL. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα στόχοι στο λειτουργικό χαρακτηρισμό, σε δοκιμασίες λυτικής ικανότητας και παραγωγής κυτταροκινών.

3.16. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

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

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ CD8 T ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ

Ένα από τα ερωτήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν εάν σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα αλλά και υγιείς μάρτυρες ανιχνεύονται CD8 T-κυτταρικές απαντήσεις έναντι πεπτιδίων των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 που παρουσιάζονται από HLA- A1, -A2, -A24 και/ή -B35. Για το σκοπό αυτό ολικά PBMCs, από ταυτοποιημένους ως προς τα HLA ασθενείς, διεγέρθηκαν με τα ειδικά πεπτίδια *in vitro* και εξετάστηκαν για την παρουσία ειδικών έναντι του όγκου T κυττάρων με χρώση με πολυμερή. Πραγματοποιήθηκαν MLPCs σε καθέναν από τους 25 ασθενείς και 15 υγιείς μάρτυρες, ώστε να διαπιστωθεί η συχνότητα των αντιγονοειδικών pCTLs. Στους πίνακες 3.1 και 3.2 παρουσιάζονται ο αριθμός των CD8⁺ κυττάρων που ελέγχθηκε, ο αριθμός των MLPCs που πραγματοποιήθηκαν, ο αριθμός των MLPCs που περιελάμβαναν θετικό για το πολυμερές πληθυσμό και η υπολογιζόμενη συχνότητα των αντιγονο-ειδικών pCTLs. Συχνότητα που αναγράφεται ως «μικρότερη από» (<) είναι η ελάχιστη συχνότητα, βασισμένη στον αριθμό των CD8⁺ κυττάρων, μέχρι της οποίας κατέστη δυνατός ο έλεγχος της συχνότητας και δεν ανιχνεύθηκε CD8 T απάντηση, χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη ειδικών pCTL σε χαμηλότερη συχνότητα. Στις περιπτώσεις όπου υπήρχε αμφιβολία ως προς την παρουσία του θετικού για το πολυμερές πληθυσμού, το αποτέλεσμα δεν συμπεριλαμβανόταν στον υπολογισμό της συχνότητας, εάν δεν υποβαλλόταν σε επιπλέον διεγέρσεις. Στην περίπτωση αυτή συμπεριλαμβανόταν στον υπολογισμό της συχνότητας μόνο εάν ο θετικός πληθυσμός παρέμενε ή αυξανόταν σε μέγεθος και δεν φθόριζε σε χρώση με πολυμερές ελέγχου διαφορετικής ειδικότητας.

Ανάμεσα στα 2 MAGE-A1 και 4 MAGE-A3 πεπτίδια που ελέχθησαν, συχνότερη ήταν η απάντηση έναντι των MAGE-A3.A2 και MAGE-A3.A24 με 5/14 (36%) και 4/9 (44%) των ασθενών να εμφανίζουν στο περιφερικό αίμα CD8 T απάντηση έναντι των πεπτιδίων αυτών (**Πiv. 26**). Η συχνότητα των pCTL ως προς τα κυκλοφορούντα CD8 T κύτταρα κυμαινόταν από 0,5-70 x10⁻⁷ για το MAGE-A3.A2 και 1,4-6 x10⁻⁷ για το MAGE-A3.A24. Χαμηλότερη, αλλά ανιχνεύσιμη ήταν η απάντηση έναντι του MAGE-A3.B35 πεπτιδίου με το 14% των ασθενών να εμφανίζουν CTL απάντηση, σε αντίθεση με τα πεπτίδια MAGE-A1.A1, MAGE-A1.B35 και MAGE-A3.A1, όπου δεν ανιχνεύθηκαν ειδικά pCTL που να τα αναγνωρίζουν (**Πiv. 26**). Παράλληλα, η παρουσία ειδικών pCTL δεν παρουσίασε συσχέτιση (p>0.05) με την έκφραση των αντιγόνων στον καρκινικό ιστό των ίδιων ασθενών (**Πiv. 29**), όπως προέκυψε από αντίστοιχη μελέτη [127].

Πίνακας 26: Συχνότητα των ειδικών pCTLs έναντι των MAGE-A3 και MAGE-A1 πεπτιδίων σε ασθενείς κα

Ασθενής	HLA	CD8 ^α	MLPCs ^β	MAGE-A3.A1		MAGE-A3.A2		MAGE-A3.A24		MAGE-A3.
				+ve ^γ MLPCs	f ^δ	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs
1	A02, 24, B35	1,4	76			0	<7,0	3	5,2	
2	A02	6,5	192			0	<2,6			
3	A24, B35	10,3	171					0	<1,0	0
4	A24, 24	2,8	93					0	<3,6	
5	A02	3,8	272			0	<2,6			
6	A02	6,6	184			0	<1,5			
7	A24, B35	2,3	127							0
8	A01, B35	8,1	208	0	<1,2					0
9	A02	3,5	160			1	5,8			
10	A02, B35	1,6	88			0	<6,3			0
11	A02, B35	2,8	106			0	<3,5			0
12	A02	1,5	77			11	70,0			
13	A02, 24	2,7	104			0	<3,7	0	<3,7	
14	A24	0,5	23					0	<18	
15	A01, B35	3,4	89	0	<3					0
16	A24, 24	1,7	76					1	6,0	
17	A02, 02	1,6	98			1	0,5			
18	A24, 68	7,3	260					1	1,4	
19	A24, B35	3,4	156					2	5,6	
20	A02	3,8	192			0	<2,6			
21	A24, 03	2,9	160					0	<3,4	
22	A02	2,0	91			0	<5,2			
23	A01, 02	4,9	204	0	<2	7	14,0			
24	B35	1,5	192							1
25	A02	2,0	168			3	15,0			

^α CD8 κύτταρα x 10⁶, ^β Μικροκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, ^γ αριθμός θετικών μικροκαλλιεργειών, ^δ συχνότη

Πίνακας 27: Συχνότητα των ειδικών pCTLs έναντι των MAGE-A3 και MAGE-A1 πεπτιδίων σε υγιείς μάρτυρες

Δότης	HLA	CD8 ^a	MLPCs ^β	MAGE-A3.A1		MAGE-A3.A2		MAGE-A3.A24		MAGE-A3.B	
				+ve ^γ MLPCs	f ^δ	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f
1	A02, B35	4,3	255			0	<2,3			0	<2,3
2	A01	8,6	240	1	1,0						
3	A01, 02	24,3	379	0	<0,4	0	<0,4				
4	A02	5,0	208			1	2,0				
5	A02	8,4	192			2	3,6				
6	A01	5,5	231	0	<2,0						
7	A01	6,4	248	0	<1,6			0	<1,6		
8	A02	8,7	243			1	1,2				
9	A02,A24, B35	2,5	176			0	<2,3	0	<2,3	0	<2,3
10	A01, A24	3,7	232	0	<2,7			0	<2,7		
11	A01	5,0	179	0	<2,0						
12	A02, B35	7,2	240			0	<1,4			0	<1,4
13	A02	20,2	253			4	2,0				
14	A24, B35	1,0	91					0	<2,8	0	<2,8
15	A02	9,3	232			1	1,0				

^a CD8 κύτταρα x 10⁶, ^β Μικροκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, ^γ αριθμός θετικών μικροκαλλιεργειών, ^δ συχνότητα

Πίνακας 28: Συχνότητα των ειδικών pCTLs έναντι των MAGE-A3 και MAGE-A1 πεπτιδίων σε TILs ασθενών

Ασθενής	HLA	CD8 ^a	MLPCs ^β	MAGE-A3.A1		MAGE-A3.A2		MAGE-A3.A24		MAGE-A3.B	
				+ve ^γ MLPCs	f ^δ	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f
7	A24, B35	0,7	48					0	<12	0	<12
8	A01, B35	0,7	49	0	<13					0	<13
9	A02	0,5	25			0	<21				
14	A24	0,9	12					0	<5		
15	A01, B35	0,5	6	0	<94					0	<94

^a CD8 κύτταρα x 10⁶, ^β Μικροκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, ^γ αριθμός θετικών μικροκαλλιεργειών, ^δ συχνότητα

Πίνακας 29: Συσχέτιση της ανίχνευσης (+) ή όχι (-) αντιγονοειδικών CTL με την έκφραση των αντιγόνων στον καρκινικό ιστό των ασθενών

Ασθενής	HLA	CTL απάντηση		Έκφραση	
		MAGE-A3	MAGE-A1	MAGE-A3	MAGE-A1
P#7	A24, B35	-	-	-	-
P#8	A01, B35	+	-	+	-
P#9	A02	+		-	-
P#10	A02, B35	-	+	+	-
P#12	A02	+		+	+
P#14	A24	-		-	-
P#15	A24	-		+	+

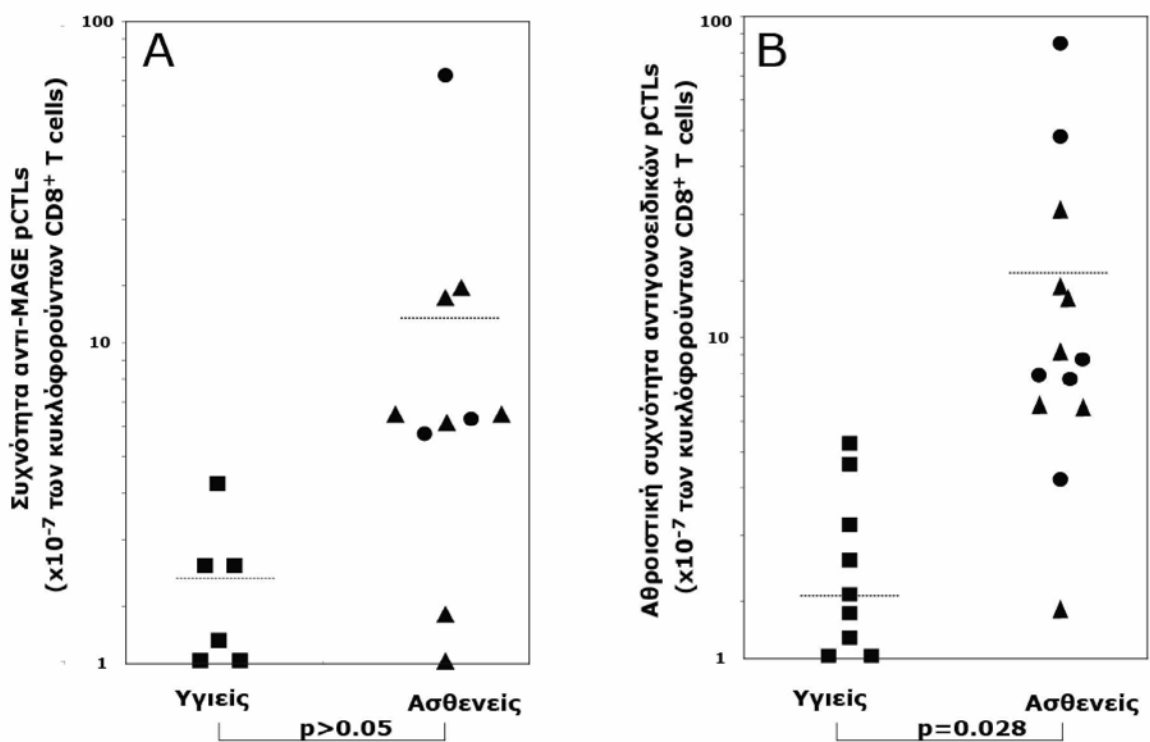
+: εντοπισμός CTL απάντησης/θετική έκφραση, -: μη ανίχνευση CTL απάντησης/αρνητική έκφραση

Η συχνότητα των ειδικών CTL έναντι των MAGE-A3 και MAGE-A1 πεπτιδίων εξετάστηκε και σε TILs ασθενών με ΜΜΚΠ. Στα δείγματα TIL από 5 ασθενείς με ΜΜΚΠ που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκαν ειδικά pCTL ($f < 5 \times 10^{-7}$) που να αναγνωρίζουν κάποιο από τα υπό διερεύνηση πεπτίδια (**Πίβ. 29**). Στα ίδια δείγματα εξετάστηκε η απάντηση έναντι ιικών πεπτιδίων και ανιχνεύθηκε CD8 T απάντηση έναντι του BMLF.A2 πεπτιδίου στους ασθενείς P#9 και P#14 σε συχνότητες 4,2 και 7,4 $\times 10^{-7}$ των CD8 T κυττάρων.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν PBMCs υγείων ατόμων ίδιας ηλικιακής ομάδας με τους ασθενείς για να διαπιστωθεί εάν η παρουσία των pCTL σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα επάγεται ή όχι από το αντιγονικό ερέθισμα που προσφέρει ο όγκος. Στους υγείς μάρτυρες ανιχνεύθηκαν pCTL έναντι του MAGE-A3.A2 πεπτιδίου σε ποσοστό 56% (5/9) (**Πίβ. 27**) με χαμηλότερη όμως συχνότητα απάντησης σε σχέση με τους ασθενείς, που κυμαινόταν από 1,0 έως 3,6 $\times 10^{-7}$ ειδικά CD8 T κύτταρα. Η απάντηση έναντι των άλλων πεπτιδίων ήταν χαμηλή (1/6 για το MAGE-A3.A1) έως μη ανιχνεύσιμη (MAGE-A3.A24, MAGE-A3.B35, MAGE-A1.A1 και MAGE-A1.B35) (**Πίβ. 27**). Δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό των ασθενών και των υγείων δοτών που αναγνωρίζουν καθένα από τα πεπτίδια που εξετάστηκαν.

Όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση, η συχνότητα των pCTL έναντι των αντιγόνων MAGE, αν και φαίνεται αυξημένη στους ασθενείς (μέση τιμή 13±20,5), δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$) σε σχέση με τους υγείς μάρτυρες (μέση τιμή 1,8±1) (**Εικ. 20.A**). Προκύπτει σημαντική διαφορά στη συχνότητα των pCTL ανάμεσα στους υγείς και στις δύο ομάδες των ασθενών όταν συγκρίνεται η ολική συχνότητα

των έναντι του όγκου pCTL για κάθε ομάδα, συμπεριλαμβανομένων και αντιγόνων έναντι της πρωτεΐνης hTERT τα οποία ελέχθησαν στους ίδιους ασθενείς [178]. Στην περίπτωση αυτή, η μέση τιμή της συχνότητας των pCTL έναντι όλων των αντιγόνων των όγκων ήταν $2,2 \pm 1.3$ (κυμαινόταν από 1,0 έως $3,6 \times 10^{-7}$) στους υγιείς μάρτυρες. Αυτή η συχνότητα ήταν σημαντικά μειωμένη ($p=0.03$) σε σχέση με τη μέση τιμή της συχνότητας που παρατηρήθηκε στους ασθενείς $17,2 \pm 21,7$ (από 1,4 έως $80,0 \times 10^{-7}$) (**Εικ. 20.B**). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ($p>0.05$) ανάμεσα στη συχνότητα των pCTL των ασθενών με ΜΜΚΠ και ΜΚΠ και δεν υπήρξε κάποιος συσχετισμός με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (**Πιν. 30**).



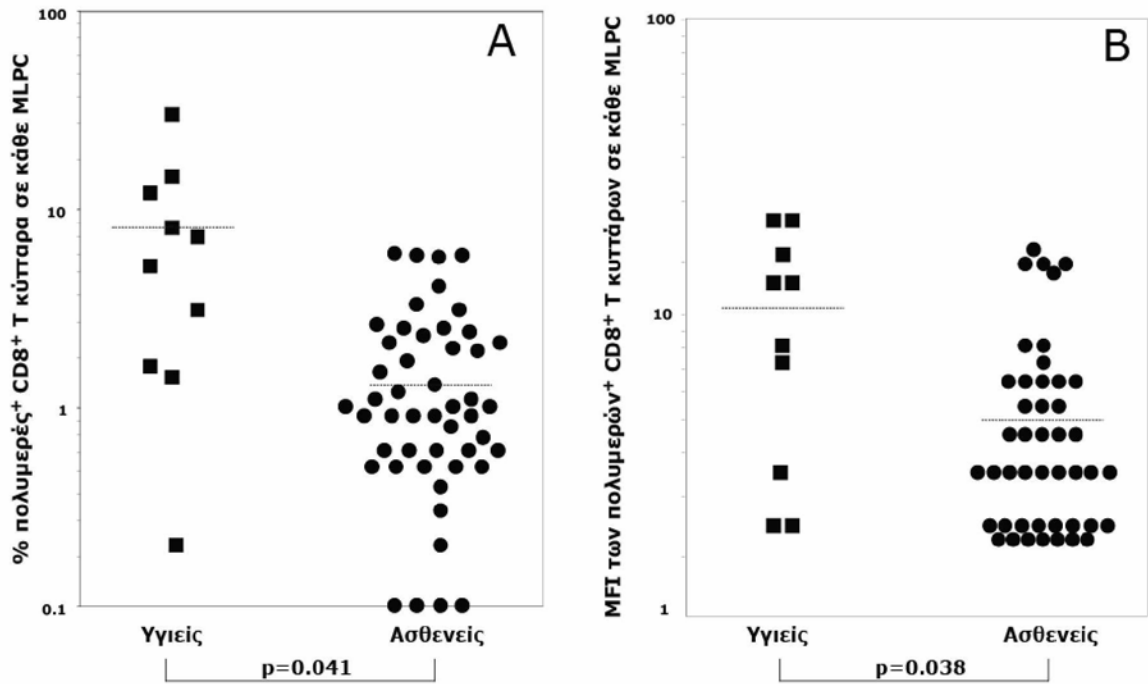
Εικόνα 20: Γράφημα της συχνότητας των κυκλοφορούντων pCTL από ασθενείς με ΜΜΚΠ (●), ΜΚΠ (▲) και υγιείς μάρτυρες (■). **A.** Συχνότητα της αντι-MAGE CD8 T κυτταρικής απάντησης ($\times 10^{-7}$ των κυκλοφορούντων $CD8^{+}$ T κυττάρων). **B.** Αθροιστική συχνότητα των αντιγονοειδικών pCTLs ($\times 10^{-7}$ των κυκλοφορούντων $CD8^{+}$ T κυττάρων) έναντι όλων των πεπτιδίων. Η στικτή γραμμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο για κάθε ομάδα.

Πίνακας 30: Συσχέτιση της ανίχνευσης ή όχι αντιγονοειδικών CTL σε ασθενείς με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

		Ανίχνευση CTL	Μη ανίχνευση CTL	P
Ηλικία		66,6±9,8	67±10	0,828
Στάδιο	1	2/10	4/15	0,146
	2	3/10	3/15	0,329
	3	2/10	7/15	1,850
	4	3/10	1/15	2,430
Απώλεια βάρους	<5%	4/10	3/15	1,190
	>5%	6/10	12/15	1,190
Επιβίωση		611±386	796±261	0,218
	Ζώντες	4/10	7/13	0,434
	Απεβίωσαν	6/10	6/13	0,434

Αναλύοντας περαιτέρω τη διαφορά στη συχνότητα των pCTLs, εξετάστηκε εάν κατά τη διάρκεια των 14 ημερών καλλιέργειας, τα pCTL των υγείων και ασθενών, πολλαπλασιάστηκαν με διαφορετικό ρυθμό, όπως προκύπτει από το ποσοστό του πολυμερούς⁺CD8⁺ πληθυσμού σε κάθε MLPC. Προέκυψε πως, για όλα τα πεπτίδια, το ποσοστό των πολυμερών⁺CD8⁺ κυττάρων των υγείων (8,3±8,9, εύρος 0,2-30,0), ήταν σημαντικά υψηλότερο (p=0,041) από αυτό των ασθενών (1,6±1,6, εύρος 0,1-5,8) (**Εικ. 21.A**). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν πως τα pCTL από υγιή άτομα πολλαπλασιάστηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτά των ασθενών.

Ομοίως, στα pCTL των υγείων ατόμων παρατηρήθηκε σημαντικά ισχυρότερη σύνδεση (p=0,038) με τα πολυμερή σε σχέση με τους ασθενείς, όπως απεικονίζεται από την διαφορά στην ένταση φθορισμού που υπολογίζεται με το MFI (υγείς= 10,6±7,3, ασθενείς=4,9±4,0) (**Εικ. 21.B**). Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να απεικονίζει την κινητική των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στον TCR και τα σύμπλοκα των πολυμερών [179].



Εικόνα 21: Κυτταρομετρικά χαρακτηριστικά των CTL ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (●) και υγείων δωτών (■). **A.** Ποσοστά του πολυμερούς⁺CD8⁺ T πληθυσμού σε κάθε MLPC. **B.** MFI των HLA-πολυμερών σε κάθε MLPC. Η στικτή γραμμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο για κάθε ομάδα

Ταυτόχρονα με τον έλεγχο της απάντησης έναντι των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 στο περιφερικό αίμα των υγείων δωτών και ασθενών, εξετάστηκε η απάντηση έναντι ιικών πεπτιδίων. Ο αριθμός των θετικών MLPCs και η συχνότητα της απάντησης για τα πεπτίδια BMLF1.A2, PB1.A1 και EBNA.A24 αναγράφονται στους πίνακες 31 και 32. Τρεις ασθενείς (P#9, P#13 και P#16) (ποσοστό 12%) εμφάνισαν απάντηση έναντι ενός εκ των ιικών πεπτιδίων που εξετάστηκαν σε συχνότητα $21-45 \times 10^{-7}$ CD8 T κύτταρα. Αντίστοιχα 6/15 υγείς (ποσοστό 30%) εμφάνισαν απάντηση έναντι ενός εκ των ιικών πεπτιδίων που εξετάστηκαν σε συχνότητα $5,5-52 \times 10^{-7}$ CD8 T κύτταρα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην συχνότητα της απάντησης ($p=0,228$) μεταξύ υγείων και ασθενών, ούτε συσχέτιση της απάντησης σε ιικά πεπτίδια με την απάντηση σε πεπτίδια έναντι του όγκου ($\chi^2=1,67$).

Πίνακας 31: Συχνότητα των ειδικών pCTLs έναντι ιικών πεπτιδίων σε ασθενείς κατά τη διάγνωση.

Ασθενής	CD8 ^α	MLPCs ^β	BMLF1.A2		PB1.A1		EBNA.A24	
			+ve ^γ MLPCs	f ^δ	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f
P#1	0,5	8	0	<20			0	<20
P#4	1,8	6					0	<5,5
P#5	1,3	9	0	<8				
P#6	2,5	7	0	<4				
P#7	1,8	10					0	<5,5
P#8	3,0	8			0	<3		
P#9	4,8	22	22	45				
P#10	1,4	8	0	<7				
P#11	3,6	14	0	<2,5				
P#12	1,2	6	0	<8				
P#13	3,4	13	13	38			0	<3
P#14	1,7	7					0	<6
P#15	1,9	5			0	<5		
P#16	2,4	12					5	21
P#18	4,8	17					0	<2
P#21	3,1	17					0	<3
P#23	2,4	10	0	<4	0	<4		
P#25	2,4	20	0	<4				

^α CD8 κύτταρα x 10⁵, ^β μικροκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, ^γ αριθμός θετικών μικροκαλλιεργειών, ^δ συχνότητα που ανιχνεύθηκε x 10⁻⁷ κύτταρα

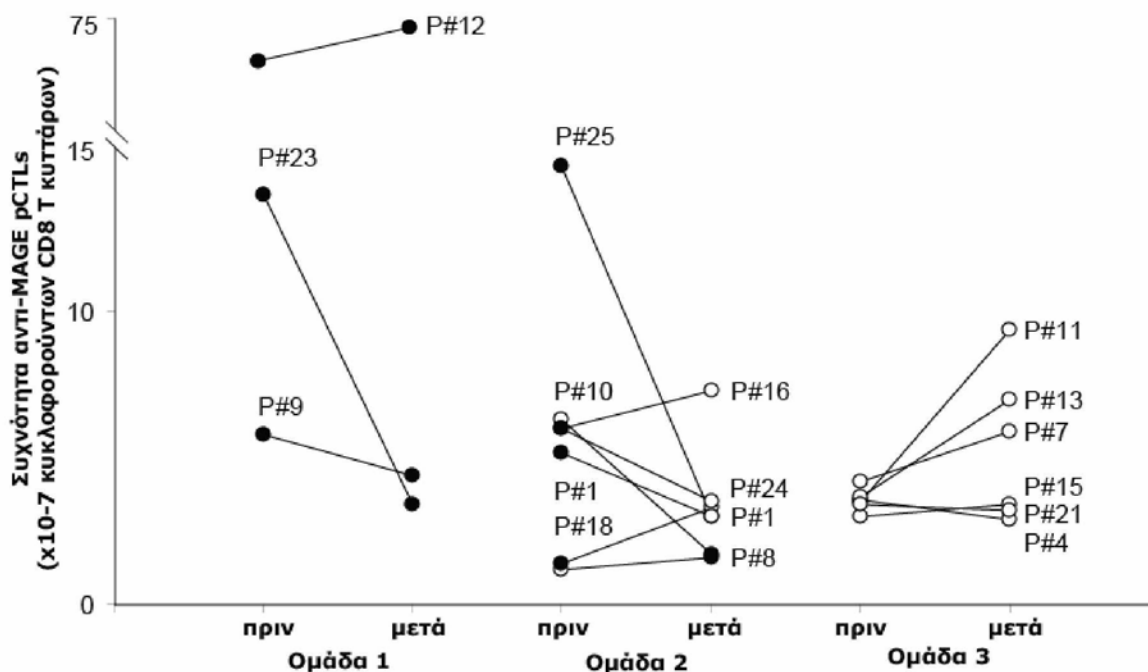
Πίνακας 32: Συχνότητα των ειδικών pCTLs έναντι ιικών πεπτιδίων σε υγιείς μάρτυρες.

Δότης	CD8 ^α	MLPCs ^β	BMLF1.A2		PB1.A1		EBNA.A24	
			+ve ^γ MLPCs	f ^δ	+ve MLPCs	f	+ve MLPCs	f
N#1	2,0	12					11	52
N#2	2,5	7			0	<4		
N#3	24,3	38	0	<0,4	0	<0,4		
N#4	4,6	19	0	<4				
N#5	10,6	24	24	22,7				
N#6	4,3	18			0	<2		
N#7	3,9	15					0	<2,5
N#8	2,9	8	3	10,4			-	-
N#9	0,7	5					0	<15
N#10	2,9	18			2	7	4	14
N#11	3,1	11			5	16,5		
N#12	7,2	18	4	5,5				
N#13	1,5	5	0	<6,5				
N#14	7,2	7	0	<1,8				
N#15	0,8	8					0	<10

^α CD8 κύτταρα x 10⁵, ^β μικροκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, ^γ αριθμός θετικών μικροκαλλιεργειών, ^δ συχνότητα που ανιχνεύθηκε x 10⁻⁷ κύτταρα

4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ pCTL

Καθώς έχει δειχθεί πως οι θεραπείες με πλατίνα επάγουν την έναντι του όγκου ανοσιακή απάντηση, διερευνήθηκε εάν στους ασθενείς παρατηρείται αυξημένη συχνότητα pCTL έναντι του όγκου μετά τη θεραπεία. Εξετάστηκαν 16 δείγματα ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία έναντι όλων των αντιγόνων, πάντα ανάλογα με τα HLA του κάθε ατόμου. Μεταβολές στην συχνότητα των pCTL των υπό εξέταση αντιγόνων εντοπίστηκαν στους 8/16 ασθενείς, χωρίς ωστόσο να ακολουθούν κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο (**Εικ. 22**). Στους ασθενείς #1, #16, #18 και #24 η συχνότητα της απάντησης που ανιχνεύθηκε πριν τη θεραπεία δεν εντοπίστηκε μετά τη θεραπεία, ενώ στον ασθενή #8 ανιχνεύθηκε απάντηση έναντι του MAGE-A3.B35 πεπτιδίου μετά τη θεραπεία, χωρίς να έχει εντοπιστεί πρωτύτερα (**Εικ. 22**, Ομάδα 2). Όπως παρατηρήθηκε στους ασθενείς #9 και #12 η απάντηση έναντι του MAGE-A3.A2 πεπτιδίου διατηρήθηκε μετά τη θεραπεία. Μόνο στους ασθενείς #23 και #25 η μεταβολή αυτή μπορεί να θεωρηθεί σημαντική καθώς η συχνότητα των pCTL έναντι του MAGE-A3.A2 πεπτιδίου υποτετραπλασιάστηκε.



Εικόνα 22: Συχνότητα αντι-MAGE pCTL σε ασθενείς πριν και μετά τη χημειοθεραπεία. Με μαύρο αντιπροσωπεύεται η συχνότητα που εντοπίστηκαν ειδικά pCTL, ενώ με λευκό κύκλο απεικονίζεται η συχνότητα μέχρι την οποία δεν ανιχνεύθηκε T κυτταρική απάντηση.

4.3. CD8 T ΓΡΑΜΜΕΣ

Από το σύνολο των μικροκαλλιιεργειών που ελέχθησαν στους υγιείς μάρτυρες 6/15 υγιείς εμφάνισαν pCTL έναντι του πεπτιδίου MAGE-A3.A2. Από αυτούς απομονώθηκαν 10 CD8 T γραμμές οι οποίες καλλιιεργήθηκαν περεταίρω για την προσπάθεια απομόνωσης CTL. Όσον αφορά τους ασθενείς, 31 CD8 T γραμμές απομονώθηκαν στην διαδικασία του MLPC. Στις 13 από αυτές έγινε επανακαλλιιεργεια και προσπάθεια απομόνωσης κλώνου. Οι γραμμές επιλέχθηκαν με βάση το ποσοστό του θετικού για το πολυμερές πληθυσμού στην καλλιιεργεια και την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται έπειτα από ειδική διέγερση.

Οι γραμμές από τους υγιείς και τους ασθενείς επανακαλλιιεργήθηκαν για τουλάχιστον μία εβδομάδα και χαρακτηρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση δεικτών επιφανείας που χαρακτηρίζουν το στάδιο διαφοροποίησής τους. Στον πίνακα 33 αναλύονται για κάθε CD8 T γραμμή την ημέρα 0 και την 7^η ημέρα της καλλιιεργειας, το ποσοστό του πολυμερούς θετικού πληθυσμού και ο συντελεστής πολλαπλασιασμού. Επίσης αναφέρονται κατά την κυτταρομετρική ανάλυση το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων, το ποσοστό των CD8⁺CD45RO⁺ κυττάρων και το ποσοστό των πολυμερές θετικών κυττάρων. Αναγράφονται τέλος, η παρουσία ή απουσία έκφρασης των δεικτών CCR7, CD28 και CD57 οριοθετώντας στον CD8⁺CD45RO⁺ πολ⁺ πληθυσμό. Αναφέρονται τέλος και οι περιπτώσεις στις οποίες δεν ήταν δυνατή η κυτταρομετρική ανάλυση.

Κατά τις 7 ημέρες καλλιιεργειας παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού του ειδικού πληθυσμού σε όλες τις CD8 T γραμμές που προήλθαν από υγιή άτομα και στις περισσότερες γραμμές των ασθενών, με εξαίρεση τις P#9 032A103, P#23 023A153 και P#12 038A018, όπου παρατηρήθηκε μείωση. Αξίζει να σημειωθεί πως στις γραμμές των υγιών τα ποσοστά των αντιγονοειδικών κυττάρων ήταν ιδιαίτερα αυξημένα μετά από μία εβδομάδα ενεργοποίησης και μάλιστα σε δύο περιπτώσεις (δότης N#5) ξεπέρασαν το 75%. Κάποιες από τις γραμμές πολλαπλασιάστηκαν σε μεγάλο βαθμό, άλλες μέτρια, ενώ οι υπόλοιπες διατηρήθηκαν στα ίδια νούμερα (**Πiv. 33**).

Πίνακας 33: Χαρακτηριστικά των CD8 T γραμμών υγιών δοτών και ασθενών.

Γραμμή	Καλλιέργεια			CD8 ⁺ RO ⁺ πολ ⁺					
	πολ ⁺	x	ζωντανά %	CD8 ⁺ RO ⁺ %	πολ ⁺ %	CCR7	CD28	CD57	
N#2 025A075	d0	5	2	91	57	14	APN	APN	APN
	d7	12		60	29	20	APN	APN	APN
N#4 028A012	d0	2	1	91	66	-	-	-	-
	d7	44		55	64	-	-	-	-
N#5 008A034	d0	75	10	75	92	85	APN	APN	APN
	d7	78		79	89	86	APN	APN	APN
N#5 008A134	d0	45	7	77	37	53	APN	APN	APN
	d7	77		85	90	25	APN	APN	APN
N#8 044A202	d0	7	11	84	68	27	APN	APN	APN
	d7	57		56	48	33	APN	APN	APN
P#8 031B095	d0	6	1	83	38	-	-	-	-
	d7	23		68	41	-	-	-	-
P#9 032A103	d0	8	2	66	42	-	-	-	-
	d7	5		43	33	-	-	-	-
P#12 038A012	d0	35	14	86	52	38	APN	APN	APN
	d7	42		69	57	41	APN	ΘΕΤ	APN
P#12 038A018	d0	3	7	72	51	-	-	-	-
	d7	0		79	42	-	-	-	-
P#23 023A153	d0	31	8	75	36	12	APN	-	APN
	d7	10		62	51	2	APN	APN	APN
P#23 023A149	d0	10	8	74	37	7	APN	-	APN
	d7	15		77	44	11	APN	APN	APN
P#23 023A166	d0	29	4	84	30	-	-	-	-
	d7	60		83	84	-	-	-	-
P#25 021C289	d0	3	4	82	16	-	-	-	-
	d7	6		79	27	-	-	-	-

x συντελεστής πολλαπλασιασμού, ΘΕΤ: παρουσία έκφρασης, APN απουσία έκφρασης, -:μη διαθέσιμα στοιχεία

Κυτταρομετρικά οι γραμμές των υγείων δοτών και των ασθενών δεν διέφεραν ως προς τα χαρακτηριστικά τους. Το ποσοστό των ζώντων κυττάρων ήταν υψηλό, το ποσοστό των CD8⁺CD45RO⁺ κυττάρων κυμαινόταν ανάλογα το δείγμα, ενώ όλες οι γραμμές είχαν φαινότυπο CD8⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺CD57⁻ πριν και μετά την ενεργοποίηση, με εξαίρεση την γραμμή P#12 038A012 η οποία εξέφρασε το δείκτη CD28 μετά από ενεργοποίηση μιας εβδομάδας (**Εικ. 23**).

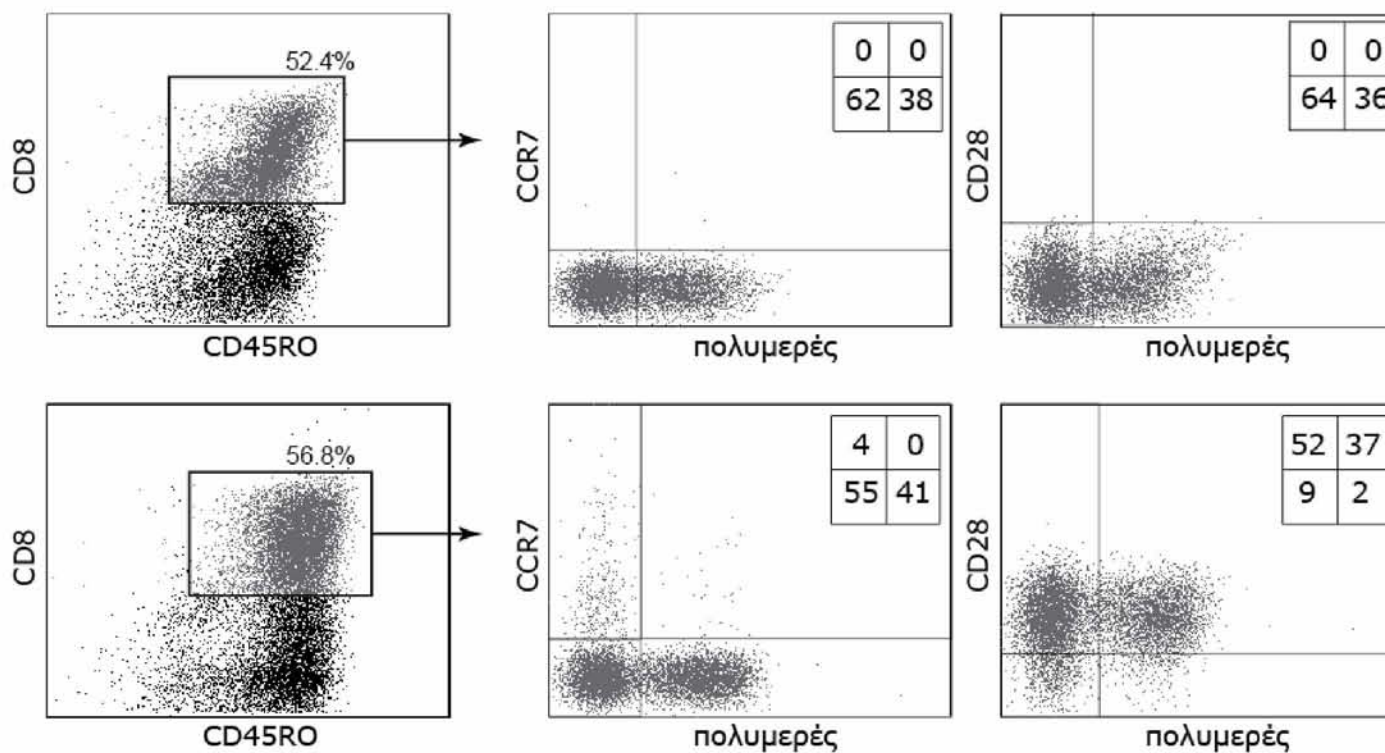
Τελικά, από τις 10 CD8 T γραμμές των υγείων δοτών που εντοπίστηκαν στη διάρκεια των MLPCs, μόνο οι 5 γραμμές αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά ώστε να γίνει προσπάθεια απομόνωσης κλώνου και στις 5 από αυτές (**Πίν. 34**) έγινε δυνατή η απομόνωση CD8 T κλώνου. Αντίστοιχα, στους ασθενείς μόνο σε δύο περιπτώσεις η απομόνωση ήταν επιτυχής (**Πίν. 34**) και είχε σαν αποτέλεσμα την απομόνωση δύο T ειδικών κλώνων που αναγνωρίζουν το MAGE-A3.A2 πεπτίδιο.

Πίνακας 34: CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Κλώνος	Προέλευση	Ειδικότητα	HLA
N#2 025A075	Υγιής δότης	MAGE-A3	A1
N#4 028A012	Υγιής δότης	MAGE-A3	A2
N#5 008A034	Υγιής δότης	MAGE-A3	A2
N#5 001A134	Υγιής δότης	MAGE-A3	A2
N#8 044A202	Υγιής δότης	MAGE-A3	A2
P#23 023A149	Ασθενής	MAGE-A3	A2
P#23 023A166	Ασθενής	MAGE-A3	A2

4.4. CD8 T ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΟΙ ΚΛΩΝΟΙ

Προσπάθεια απομόνωσης κλώνου έγινε στις περισσότερες κυτταρικές γραμμές από υγιείς και ασθενείς. Η απομόνωση των CD8 T ειδικών κλώνων ήταν μία χρονοβόρος και επίπονη διαδικασία η οποία δεν είχε πάντα το επιθυμητό αποτέλεσμα. Παρ' όλες τις δυσκολίες επιτεύχθηκε η απομόνωση CTL τόσο από υγιή άτομα και από ασθενείς (**Πίν. 34**). Οι κλώνοι που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν περαιτέρω σε υψηλούς αριθμούς, ώστε να είναι δυνατός ο πλήρης χαρακτηρισμός τους.



Εικόνα 23: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός με κυτταρομετρία ροής της γραμμής 038A012 που απομονώθηκε την ημέρα 0 (πάνω σειρά) και την ημέρα 7 (κάτω σειρά) της καλλιέργειας. Η έκφραση των μορίων CCR7, CD28 ανιχνεύεται στον CD8⁺CD45RO⁺ πληθυσμό.

Από τις πολλαπλές προσπάθειες καλλιέργειας που έγιναν για κάθε CTL έγινε αντιληπτό πως διάφοροι παράγοντες επηρέασαν την ανάπτυξη των CTL *in vitro*. Στον πίνακα 35 αναφέρονται επιλεκτικά κάποια παραδείγματα καλλιέργειας CTL ασθενών και υγείων δοτών. Για κάθε CTL αναφέρονται ο αριθμός των επαναδιεγέρσεων (Px), η ειδικότητα, το σύστημα καλλιέργειας (G: GERL, R: ROSI EBV, D: DAJU EBV, P: PBMC) , ο συντελεστής πολλαπλασιασμού (x), ο χρόνος διαίρεσης (DivT) και το ποσοστό χρώσης του πληθυσμού με το ειδικό πολυμερές. CTL που προήλθαν από την ίδια μικροκαλλιέργεια, π.χ. N#8 044A202 και P#23 023A149, παρουσίασαν διαφορετική δυναμική ανάπτυξης στην καλλιέργεια, όπως απεικονίζεται από το συντελεστή πολλαπλασιασμού τους και το χρόνο διαίρεσης των κυττάρων. Διαπιστώθηκε πως, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η επανακαλλιέργεια των CTL υποβαθμίζει την ποιότητα των κυττάρων καθώς η συνεχόμενη επαφή με το αντιγόνο είχε σαν αποτέλεσμα χαμηλό πολλαπλασιασμό και μικρότερη ένταση φθορισμού μετά από χρώση με πολυμερές. Επίσης παρατηρήθηκε πως η προέλευση του ορού είχε ιδιαίτερη σημασία για την πορεία της καλλιέργειας, καθώς αλλαγή της παρτίδας του ορού είχε σε κάποιες περιπτώσεις καταστροφικά αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό των CTL. Υπήρχαν, βέβαια, CTL που ανεξαρτήτως συστήματος καλλιέργειας, συγκεντρώσεων κυτταροκινών και ορού αναπτύσσονταν σε ικανοποιητικό βαθμό. 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.

Πίνακας 35: Χαρακτηριστικά των CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγείς μάρτυρες.

CTL	Px	Ειδικότητα	Σύστημα καλλιέργειας	x πολλαπλ	DivT	πολ ⁺
N#2 025A075/12	P7	MAGEA3-A1	G/R	1,4	120	>90
N#5 001A034/52	P6	MAGEA3-A2	D/P	2,2	147	70
N#5 001A134/1	P4	MAGEA3-A2	G/R	2,2	147	87
N#8 044A202/10	P7	MAGEA3-A2	G/R	4,8	35	>90
N#8 044A202/40	P7	MAGEA3-A2	G/R	1,5	112	>90
N#8 044A202/46	P7	MAGEA3-A2	G/R	3,2	53	>90
P#23 023A149/3	P7	MAGEA3-A2	G/R	5,5	31	60
P#23 023A149/64	P7	MAGEA3-A2	G/R	1,1	153	86
P#23 023A166/70	P7	MAGEA3-A2	G/R	3,5	48	<30

4.5. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ CTL

4.5.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ

Τα CTL που απομονώθηκαν από υγιείς και ασθενείς χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση δεικτών επιφάνειας που χαρακτηρίζουν το στάδιο διαφοροποίησης τους. Όλοι οι κλώνοι ήταν θετικοί για την ισομορφή CD45-RO και αρνητικοί για την CD45-RA ισομορφή (**Πιν. 36**). Ανεξαρτήτως προέλευσης, όλοι οι κλώνοι εξέφραζαν το δείκτη CD28, αλλά όχι το CD57. Ως προς την έκφραση του CCR7, δύο CTL υγιών ατόμων και ενός ασθενή είχαν και θετικούς και αρνητικούς πληθυσμούς (**Εικ. 24**), ενώ τα υπόλοιπα δείγματα ήταν αρνητικά.

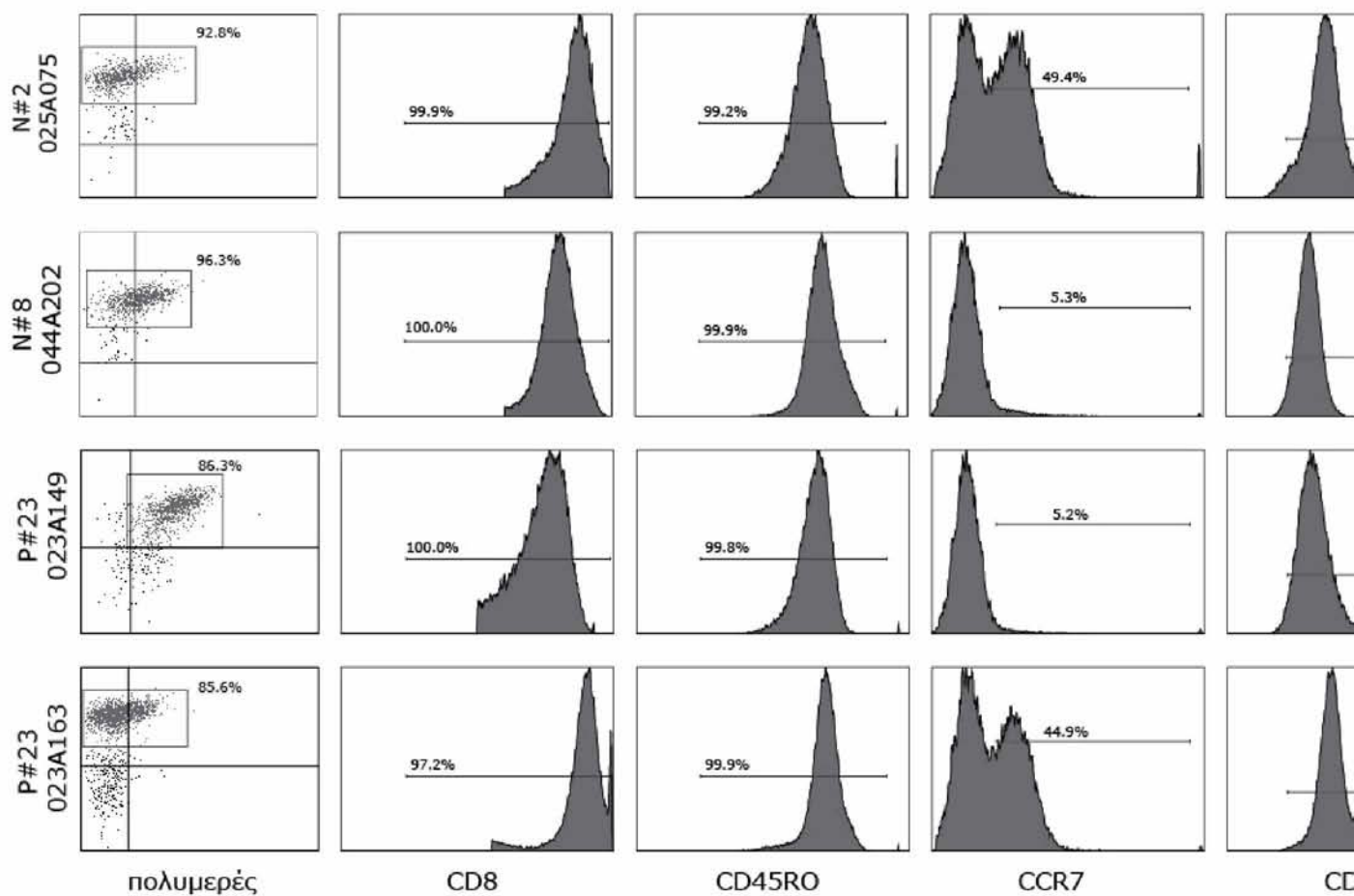
Πίνακας 36: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Τ κυτταρικός κλώνος	Ειδικότητα	CD45RA	CD45RO	CCR7	CD57	CD28
N#2 025A075/41	MAGE-A3.A1	-	+	+	-	+
N#5 008A034/53	MAGE-A3.A2	-	+	+	-	+
N#5 008A134/81	MAGE-A3.A2	-	+	-	-	+
N#8 044A202/10	MAGE-A3.A2	-	+	-	-	+
P#23 023A149/3	MAGE-A3.A2	-	+	-	-	+
P#23 023A166/46	MAGE-A3.A2	-	+	+	-	+

4.5.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ CD28 ΚΑΙ BCL2

Στην προσπάθεια να χαρακτηριστούν τα CTL που απομονώθηκαν από υγιείς και ασθενείς μελετήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου η έκφραση σημαντικών μορίων για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των λεμφοκυττάρων, όπως είναι το CD28 και το BCL2 αντίστοιχα [180, 181]. Προέκυψε πως η έκφραση των μορίων αυτών στα CTL των ασθενών δεν διέφερε σημαντικά από την έκφραση στα CTL των υγιών δοτών (**Πιν. 37** και **38**).

Η έκφραση του CD28 διερευνήθηκε σε δύο κλώνους ασθενών και δύο κλώνους υγιών δοτών. Σαν ρυθμιστής για τη σχετική έκφραση χρησιμοποιήθηκαν PBMSs τα οποία είχαν διεγερθεί με PHA. Η έκφραση στα CTL των ασθενών ήταν 39-64 φορές χαμηλότερη από το ρυθμιστή (**Πιν. 37**). Στους υγιείς η γραμμή του δότη N#2 παρουσίασε όμοια έκφραση με το ρυθμιστή, ενώ η τα CTL του δότη N#8 είχαν 37 φορές χαμηλότερη έκφραση.



Εικόνα 24: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός με κυτταρομετρία ροής δύο CTL υγιών και δύο CTL ασθενών πολυμερές και την έκφραση δεικτών επιφανείας που χαρακτηρίζουν το στάδιο διαφοροποίησης των T κυττάρων.

Πίνακας 37: Μελέτη της έκφρασης του CD28 σε CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες με Real Time PCR.

CTL	CD28 Ct	β2M Ct	Ποσοστό έκφρασης*
PBMCs +PHA	23,06	9,12	1,000
N#2 001A134	24,85	10,88	0,979
N#8 044A202	30,48	11,34	0,027
P#23 023A149	29,84	9,89	0,016
P#23 023A166	29,53	10,31	0,026

* με βάση την έκφραση στα κύτταρα που διεγέρθηκαν με PHA

Η έκφραση του BCL2 μελετήθηκε στα ίδια δείγματα. Σαν ρυθμιστής στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε μια σειρά B κυττάρων μετασχηματισμένων με τον EBV ιό. Η έκφραση του BCL2 στα CTL των ασθενών και των υγιών δότην κυμαίνονταν από δείγμα σε δείγμα, εμφανίζοντας τη μισή έκφραση στο δότη N#2, μέχρι και τη διπλάσια έκφραση στο δότη N#8 (Πίν. 38).

Πίνακας 38: Μελέτη της έκφρασης του BCL2 σε CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες με Real Time PCR.

CTL	BCL2 Ct	β2M Ct	Ποσοστό έκφρασης*
ROSI EBV	26,10	9,68	1,000
N#2 001A134	36,41	19,07	0,527
N#8 044A202	26,55	11,34	2,297
P#23 023A149	26,62	9,89	0,801
P#23 023A166	26,29	10,31	1,352

* με βάση την έκφραση στα EBV κύτταρα

4.5.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ TCR

Η ανάλυση του ειδικού υποδοχέα των CTL πραγματοποιήθηκε σε ένα πρώτο στάδιο με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση του IOTest Beta Mark της Beckman Coulter (Εικ. 25). Η ανάλυση με τη τεχνική αυτή και αποκάλυψε τη Vβ αλυσίδα του TCR για τέσσερις κλώνους υγιών δότην και ένα κλώνο ασθενούς (Πίν. 39).

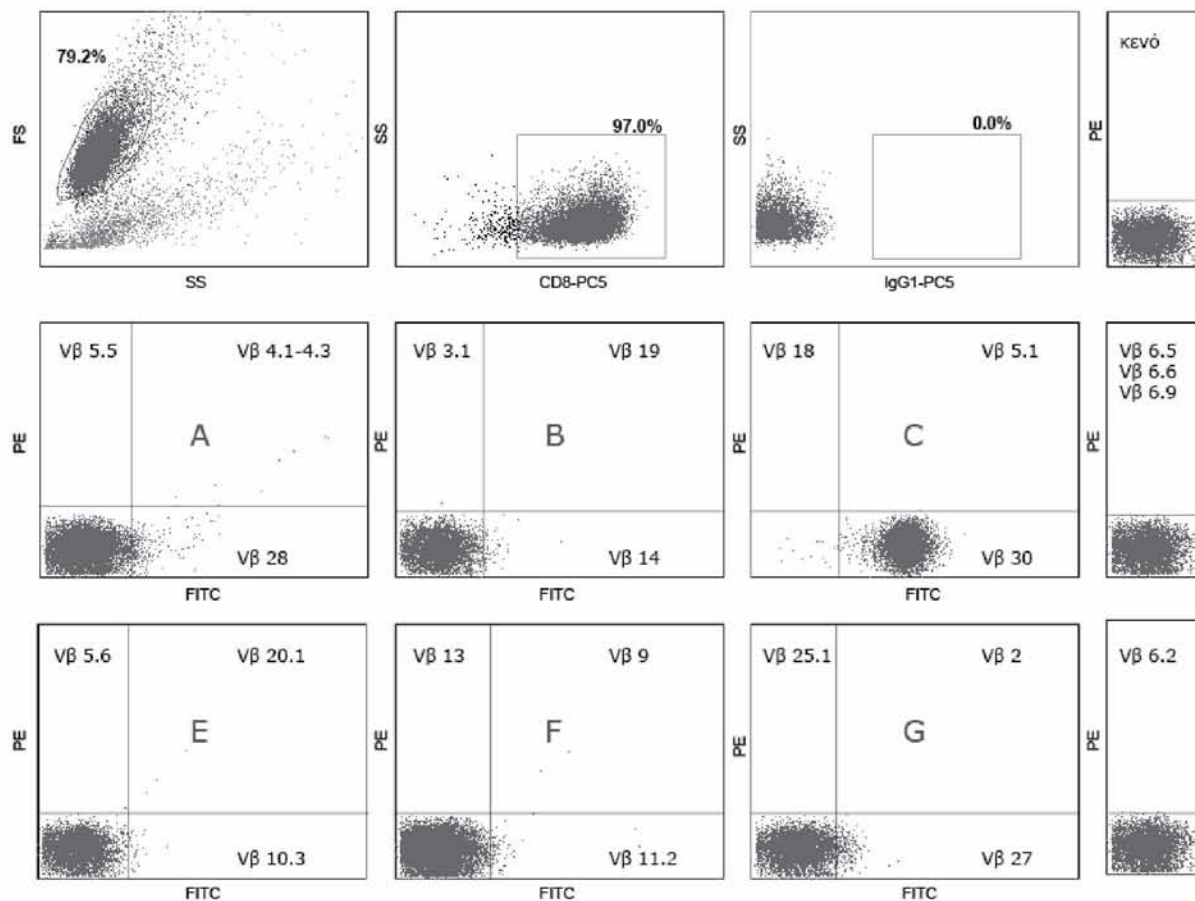
Πίνακας 39: Προσδιορισμός της Vβ αλυσίδας του TCR με τη χρήση του IOtest Beta Mark στα CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

CTL	Ειδικότητα	Vβ*	CTL	Ειδικότητα	Vβ*
N#2 025A075	MAGE-A3.A1	TRBV 11-2	P#12 038A012	MAGE-A3.A2	-
N#5 001A034	MAGE-A3.A2	-	P#23 023A149	MAGE-A3.A2	TRBV 29
N#5 001A134	MAGE-A3.A2	TRBV 4-3	P#23 023A166	MAGE-A3.A2	-
N#8 044A202	MAGE-A3.A2	TRBV 30			

*ονοματολογία σύμφωνα με τη διεθνή βάση δεδομένων IMGT [172,173]

Σε καμία περίπτωση δεν προέκυψε ίδια Vβ αλυσίδα του TCR ανάμεσα στα δείγματα. Σε δύο δείγματα ασθενών δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή συμπεράσματος, καθώς η τεχνική αυτή καλύπτει το 70% του ρεπερτορίου των φυσιολογικών αλυσίδων Vβ του TCR. Παρόλα τα μειονεκτήματα της μεθόδου, η τεχνική αυτή αποκάλυψε σημαντικές πληροφορίες για τα CTL που προέρχονται από τα ίδια άτομα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 39 τα CTL του δότη N#5 αν και έχουν την ίδια ειδικότητα, φέρουν διαφορετική Vβ αλυσίδα του TCR, συνεπώς έχουν διαφορετικό TCR, πρόκειται δηλαδή για διαφορετικούς κλώνους. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και για τα CTL του ασθενή P#23 023A149 και 023A166. Εφόσον δεν φέρουν την ίδια Vβ αλυσίδα, δεν έχουν προέλθει από το ίδιο αρχικό κύτταρο, πρόκειται δηλαδή για διαφορετικούς T κυτταρολυτικούς κλώνους έναντι του ίδιου, όμως, πεπτιδίου.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής επαληθεύθηκαν με μοριακές τεχνικές, με τη χρήση επιλεγμένων εκκινητών που καλύπτουν το 100% του ρεπερτορίου των TCR (**Πίνακας 40**). Στους κλώνους τους οποίους υπήρχε αποθηκευμένο υλικό με την μορφή ιζήματος, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή RNA, σύνθεση cDNA και ταυτοποίηση της Vβ περιοχής του TCR, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 3.13.β. Σε κάποιες περιπτώσεις (N#5 001A134 και P#12 038A012) δεν ήταν δυνατή η απευθείας εξαγωγή αποτελέσματος με μοριακές τεχνικές. Προέκυψε πως στα δείγματα όπου πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν απόλυτα κλωνικός, λόγω της ενίσχυσης με PCR, προέκυπταν πολλαπλές Vβ αλυσίδες και δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση του ειδικού μόνο πληθυσμού. Στις περιπτώσεις αυτές πραγματοποιήθηκε μαγνητικός διαχωρισμός του ειδικού πληθυσμού και επαναλήφθηκε η ταυτοποίηση των CTL. Μετά το διαχωρισμό τα αποτελέσματα ήταν πιο ξεκάθαρα και ανέδειξαν για τον κλώνο P#12 038A012 ότι έχει Vβ7(1-8) και για τον κλώνο N#5 001A034 Vβ29-1.



Εικόνα 25: Έλεγχος της Vβ αλυσίδας του TCR με τη χρήση του IOTest Beta Mark της Beckman Coulter. Τα κροτογράμματα φαίνεται η οριοθέτηση των ζωντανών και των CD8⁺ κυττάρων. Αποκλείστηκε ο μη ειδικός κλώνος που αντιστοιχούσε στην ειδική σύνδεση των αντισωμάτων (3^ο και 4^ο σικτόγραμμα). Ο κλώνος N#8 028A202 αποκαλύφθηκε γιατί ήταν θετικός μόνο στον C συνδιασμό και φθόριζε στο FITC.

Πίνακας 40: Προσδιορισμός της Vβ αλυσίδας του TCR με PCR.

CTL	Ειδικότητα	Vβ*	CTL	Ειδικότητα	Vβ*
N#5 001A034	MAGE-A3.A2	TRBV 29-1	P#12 038A012	MAGE-A3.A2	TRBV 7-3
N#5 001A134	MAGE-A3.A2	TRBV 4-3	P#23 023A149	MAGE-A3.A2	TRBV 29-1
N#8 044A202	MAGE-A3.A2	TRBV 5-1	P#23 023A166	MAGE-A3.A2	TRBV 5-8

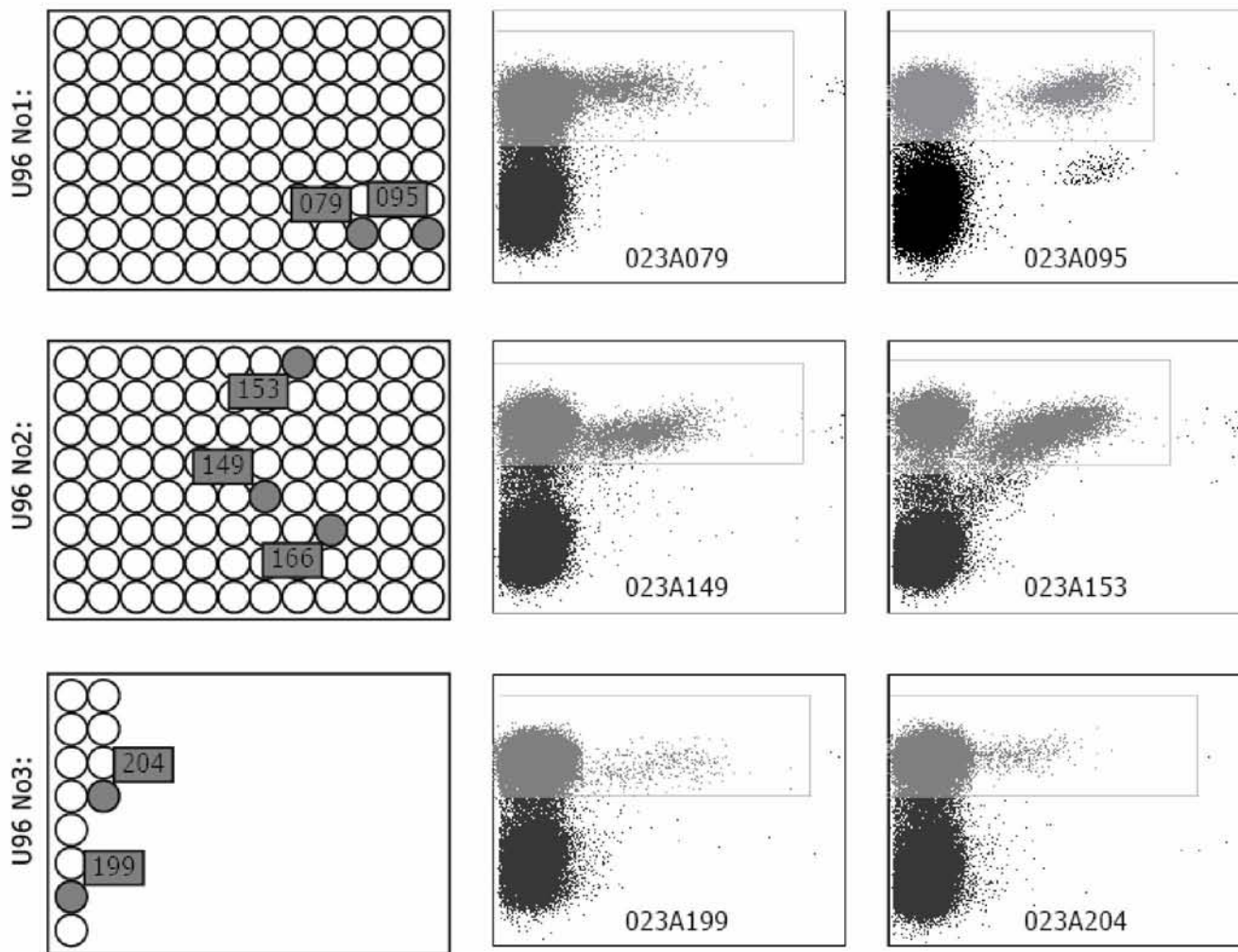
Στη συνέχεια, οι προσπάθειες ταυτοποίησης του TCR επικεντρώθηκαν στα δείγματα των ασθενών στα οποία προέκυψαν περισσότερες της μίας CD8 T γραμμές ίδιας ειδικότητας. Στην περίπτωση του ασθενή P#23 από τη διαδικασία του MLPC απομονώθηκαν κατά τη διάγνωση 7 CD8 T γραμμές που αναγνώριζαν το MAGE-A2.A2 πεπτίδιο και μετά τη θεραπεία μία γραμμή της ίδιας ειδικότητας (**Εικ. 26**). Ο στόχος ήταν να διερευνηθεί εάν τα αντιγονοειδικά CTL έχουν όμοιους ή διαφορετικούς TCR υποδοχείς, για να διαπιστωθεί εάν έχουν προέλθει από το ίδιο παρθένο T κύτταρο ή πρόκειται για διαφορετικά κύτταρα που αναγνωρίζουν το ίδιο πεπτίδιο.

Ξεκινώντας από τους κλώνους που απομονώθηκαν από τον ασθενή P#23 ταυτοποιήθηκε η Vβ περιοχή του TCR, ενισχύθηκε το τμήμα V-C και ακολούθησε πλήρης αλληλούχηση ολόκληρης της β αλυσίδας (**Εικ. 27**). Η σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες σε βάσεις δεδομένων (www.imgt.org) ανέδειξε τις περιοχές V-D-J-C της β αλυσίδας για τους δύο κλώνους και επαλήθευσε το αποτέλεσμα της κυτταρομετρίας ροής πως πρόκειται για διαφορετικούς κλώνους.

Με βάση τις αλληλουχίες των δύο κλώνων σχεδιάστηκαν οι εκκινητές R1: CC TTT AGG GGG TAC ACT GAA GC που προσδένεται στη CDR3 περιοχή του CTL P#23 023A149 και R2: GC TTG GGA GGA CAG GAC GG που προσδένεται στη CDR3 περιοχή του CTL P#23 023A166 και ακολούθησε nested PCR με το cDNA των γραμμών του ασθενή P#23. Προέκυψε ότι στις επτά CD8 T γραμμές κατά τη διάγνωση αντιστοιχούσαν τρεις διαφορετικοί TCR, που εμφανίζονταν τρεις φορές στις δύο περιπτώσεις και μία στην τελευταία περίπτωση (**Εικ. 28**). Μετά τη θεραπεία διαπιστώθηκε πως ο αντι-MAGE-A3.A2 κλώνος που ανιχνεύθηκε στην περιφέρεια είχε την ίδια β αλυσίδα με τη μία από τις ομάδες κατά τη διάγνωση.

Πίνακας 41: Προσδιορισμός των V-D-J-C περιοχών της β αλυσίδας στους δύο κλώνους του ασθενή P#23

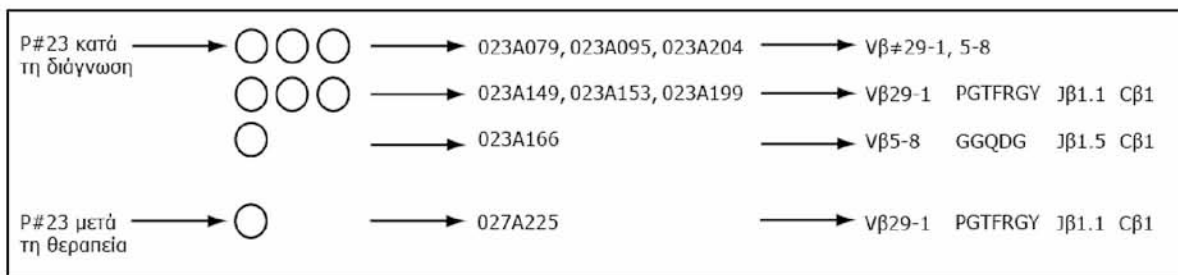
CTL	TCR (PCR)	Αλληλούχηση			
		Vβ	CDR3	Jβ	Cβ
P#23 023A149	Vb29	Vβ29-1	PGTFRGY	Jβ1.1	Cβ2
P#23 023A166	Vb5(4-8)	Vβ5-8	GGQDG	J1.5	Cβ2



Εικόνα 26: Κυτταρομετρική εικόνα των γραμμών που απομονώθηκαν από τον ασθενή P#23. Στην πρώτη σειρά (U96 No1) απεικονίζονται οι γραμμές 079 και 095, στην δεύτερη (U96 No2) οι γραμμές 149, 153 και 166, και στην τρίτη (U96 No3) οι γραμμές 199 και 204. Με στικτή γραμμή (027A225) απεικονίζεται η κυτταρική γραμμή που απομονώθηκε μετά τη καλλιέργεια. Στην πρώτη σειρά (023A079 και 023A095) και στην δεύτερη (023A149 και 023A153) απεικονίζονται οι κυτταρομετρικές αναλύσεις των πληθυσμών που απομονώθηκαν από τις γραμμές 079 και 095, 149 και 153, αντίστοιχα. Στην τρίτη (023A199 και 023A204) απεικονίζονται οι κυτταρομετρικές αναλύσεις των πληθυσμών που απομονώθηκαν από τις γραμμές 199 και 204, αντίστοιχα.

N#5 001A034	CTC TGC AGC GTT GAA L C S V E Vβ29-1	GGC GAA CTA TTG GCC CGC AAC GGA G E L L A R N G Dβ2 CDR3	GAG ACC CAG ... CTG GTG E T Q ... L V Jβ2-5
N#8 044A202	GCC AGC AGC TTG A S S L Vβ5-1	GAA GGG TAC GAC E G Y D Dβ2 CDR3	ACC GGG GAG ... ACC GTA T G E ... T V Jβ2-2
P#12 038A012	CTC TGT GCC AGC AGC L C A S S Vβ7-3	CTG TCC GGG ACT AGC GGT L S G T S G Dβ2 CDR3	GAG ACC CAG ... CTG GTG E T Q ... L V Jβ2-5
P#23 023A149	TAT CTC TGC AGC GTT Y L C S V Vβ29-1	CCC GGG ACC TTT AGG GGG TAC P G T F R G Y Dβ1 CDR3	ACT GAA GCT ... ACA GTT T E A ... T V Jβ1.1
P#23 023A166	TGT GCC AGC AGC TTG C A S S L Vβ5-8	GGA GGA CAG GAC GGT G G Q D G Dβ1 CDR3	CAG CCC CAG ... TCC ATC Q P Q ... S I Jβ1.5

Εικόνα 27: Οι αλληλουχίες των V-D-J-C περιοχών της β αλυσού του TCR των CTL υγείων δοτών και ασθενών με COVID-19. Ακολουθεί η αλληλουχία των βάσεων DNA, ακολουθεί η αμινοξική αλληλουχία και η ονομασία της κάθε περιοχής.



Εικόνα 28: V-D-J-C περιοχές της β αλύσου του TCR των κυτταρικών γραμμών που απομονώθηκαν από τον ασθενή P#23, πριν και μετά τη θεραπεία

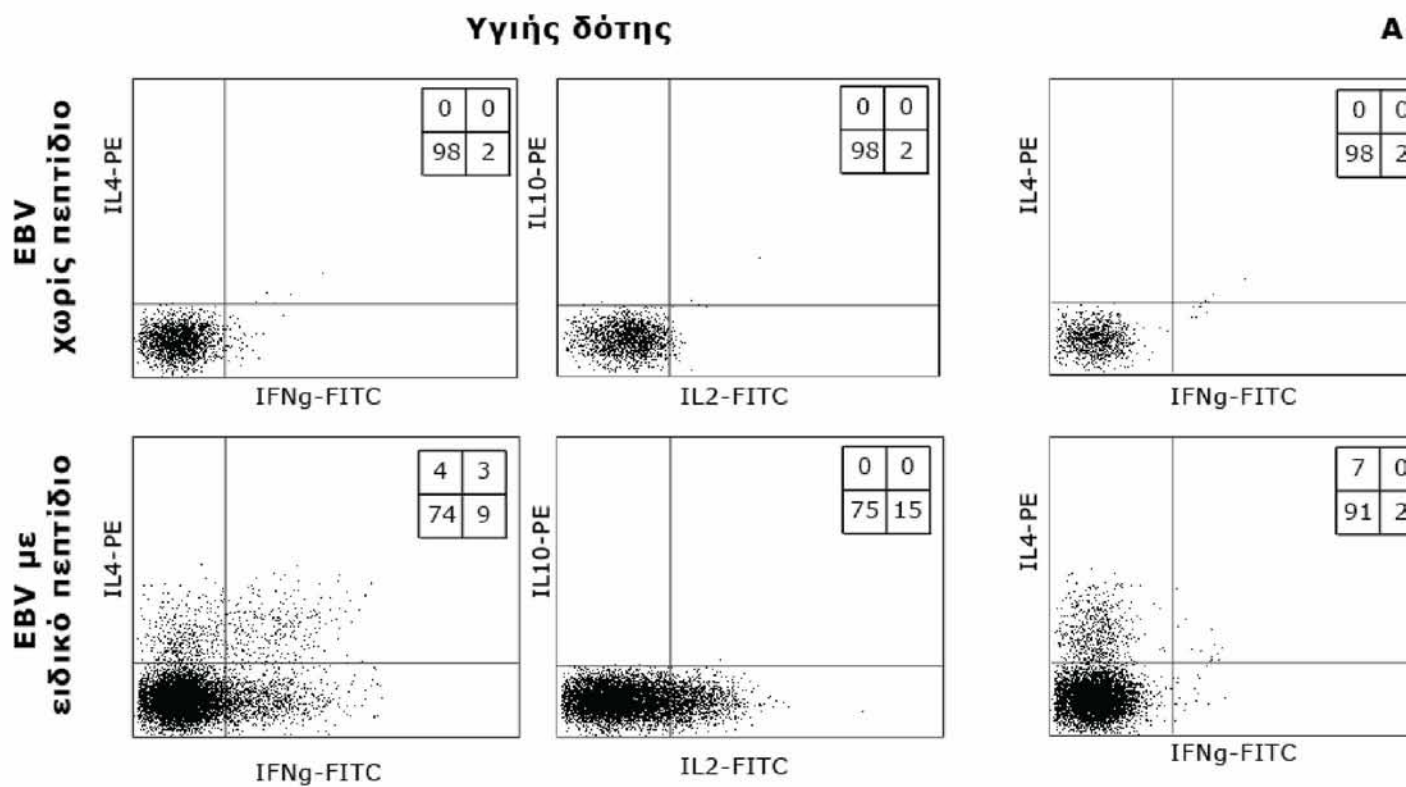
Σε ένα δεύτερο ασθενή (P#12) με πολλαπλή απάντηση έναντι του MAGE-A3.A2 πεπτιδίου, προέκυψε μονοκλωνικό προφίλ. Στον ασθενή αυτό, απομονώθηκαν κατά τη διάγνωση 11 CD8 T γραμμές. Από αυτές επιλέχθηκε ο πληθυσμός με την καλύτερη κυτταρομετρική εικόνα και ακολούθησε μαγνητικός διαχωρισμός του ειδικού πληθυσμού, καταλήγοντας σε ένα πληθυσμό θετικό για το πολυμερές >80%. Σε αυτό το δείγμα έγινε ταυτοποίηση του TCR και προέκυψε πως ο κλώνος P#12 038A012 έχει Vβ7(1-8). Ακολούθησε ενίσχυση της β αλύσου με PCR και αλληλούχιση του προϊόντος. Προέκυψε πως ο κλώνος P#12 038A012 φέρει τις αναδιατάξεις Vβ7-3, Dβ2, Jβ2-5 και Cβ2 (**Εικ. 27**). Τέλος, η αλληλουχία της β αλύσου συγκρίθηκε με των υπολοίπων γραμμών του ίδιου ασθενή και προέκυψε πως οι 9/11 γραμμές του ασθενή P#12 αντιστοιχούν στον ίδιο κλωνότυπο, ενώ υπόλοιπες δύο γραμμές δεν ήταν δυνατό να εξεταστούν, λόγω της μικρής ποσότητας υλικού.

4.6. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ CTL

4.6.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

Στα πλαίσια του λειτουργικού χαρακτηρισμού διερευνήθηκε εάν τα CTL είναι ικανά να παράγουν κυτταροκίνες έπειτα από διέγερση με το πεπτίδιο που αναγνωρίζουν. Σε μία πρώτη φάση, χρησιμοποιήθηκε ενδοκυττάρια χρώση για κυτταροκίνες και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (**Εικ. 29**). Λόγω του μεγάλου αριθμού των κυττάρων που απαιτούνται για την τεχνική αυτή, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε περιορισμένο αριθμό CTL, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την προτύπωση της μεθόδου (CTL1-3), σε ένα δείγμα υγιούς (N#2 025A075/41) και σε ένα δείγμα ασθενούς (P#23 023A166/70) (**Πιν. 42**).

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πίνακα 42 όλα τα CTL ανεξαρτήτου προελεύσεως ήταν ικανά να παράγουν IL-2 και IL-4 μετά από ειδική διέγερση, χρησιμοποιώντας είτε EBV- B κύτταρα είτε καρκινικά κύτταρα κατάλληλου HLA ως αντιγονο-παραρυσιαστικά. Όσον αφορά την IFN-γ, όλα τα δείγματα με εξαίρεση τα CTL του ασθενή παρήγαγαν την συγκεκριμένη κυτταροκίνη σε διαφορετικά ποσοστά που κυμαίνο-



Εικόνα 29: Ενδοκυττάρια χρώση για κυτταροκίνες σε CTL ασθενούς και υγιούς δότη. Απεικονίζονται των κυτταροκινών μετά από ειδική διέγερση σε αντιπαράθεση με τη μη ειδική διέγερση. Στα τετράγωνα σμών σε κάθε τεταρτημόριο.

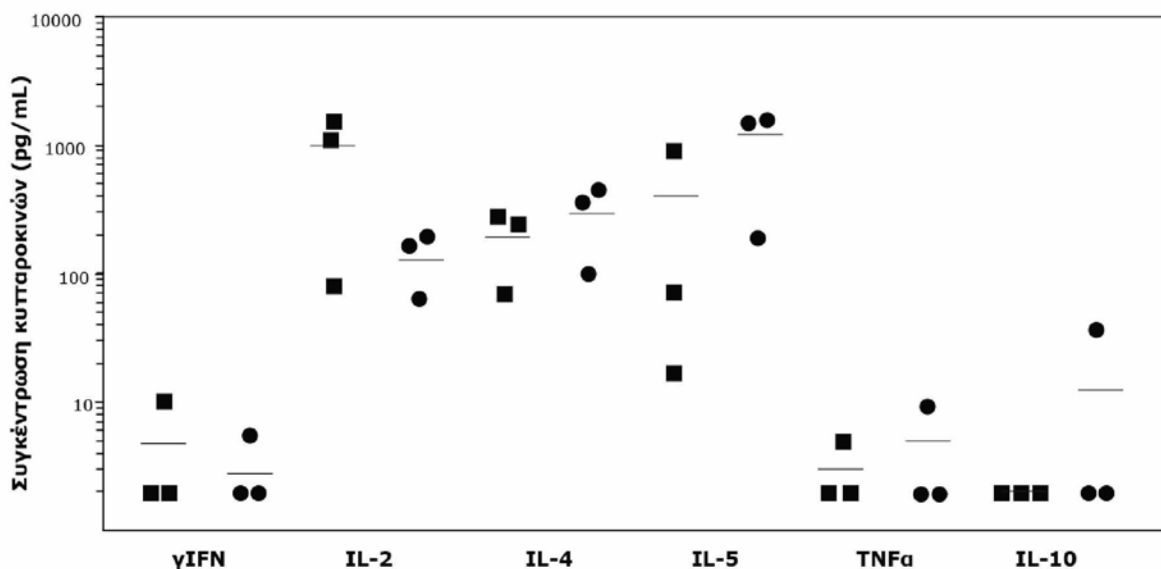
νταν από 4-30% των κυττάρων. Αντίθετα, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε παραγωγή IL-10. Το σύστημα αντιγονοπαρουσίασης δεν φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή κυτταροκινών από τα CTL, καθώς ανιχνεύθηκε το ίδιο πρότυπο παραγωγής κυτταροκινών ανεξαρτήτως του ερεθίσματος.

Όπως έγινε αντιληπτό, με την τεχνική αυτή, η ανίχνευση ή μη της εκάστοτε κυτταροκίνης ήταν επαναλήψιμο αποτέλεσμα, ενώ το ποσοστό των κυττάρων που την εξέφρασαν διέφερε αισθητά ακόμη και στο ίδιο δείγμα. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του CTL2 η παραγωγή της IFN- γ ήταν πενταπλάσια στην επανάληψη του πειράματος και στην περίπτωση του CTL1 η παραγωγή της IL-10 ήταν δεκαπλάσια.

Πίνακας 42: Έκφραση κυτταροκινών από τα CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν το ποσοστό του πληθυσμού που εξέφραζε την κυτταροκίνη (+: έκφραση με προσθήκη ειδικού πεπτιδίου, -: χωρίς πεπτίδιο).

%	EBV-B κύτταρα								Καρκινικά								
	IFN γ		IL2		IL4		IL10		IFN γ		IL2		IL4		IL10		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
CTL1	4	0	3	0	14	2	0	0									
CTL1	18	2	33	2	37	2	0	0	16	2	30	2	37	2	0	0	
CTL2	30	2	18	2	14	2	0	0									
CTL2	6	0	8	0	4	0	0	0	11	2	15	2	7	0	0	0	
CTL3	5	0	6	0	5	0	0	0	5	0	4	0	5	0	0	0	
N#2	20	2	5	2	23	0	0	0									
P#23	2	2	5	2	7	0	0	0	1	0	4	0	4	0	0	0	

Εφόσον η ενδοκυττάρια χρώση δεν μπόρεσε να αποκαλύψει ποσοτικές διαφορές ανάμεσα στα CTL από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε μικροσφαιριδιακή κυτταρομετρία για τη μέτρηση της έκκρισης κυτταροκινών από τα CTL. Διερευνήθηκε η έκκριση IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ και TNF- α μετά από ειδική διέγερση (**Εικ. 30**). Έπειτα από επώαση με EBV-B κύτταρα που παρουσίαζαν το πεπτίδιο που αναγνωρίζουν, όλοι οι κλώνοι μπορούσαν να εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες IL-2, IL-4 και IL-5, χωρίς όμως να παρατηρηθούν διαφορές ανάμεσα στα CTL από ασθενείς και υγιείς. IFN- γ και TNF- α ανιχνεύθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 2-10 pg/mL, ενώ έκκριση IL-10 παρατηρήθηκε μόνο σε ένα δείγμα ασθενή (P#12 038A012). Τα CTL τα οποία επώαστηκαν με EBV-B κύτταρα χωρίς την παρουσία πεπτιδίου δεν εμφάνισαν έκκριση κυτταροκινών.



Εικόνα 30: Παραγωγή κυτταροκινών από αντιγονοειδικά CTL που απομονώθηκαν από υγιείς μάρτυρες (■) και ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (●) έπειτα από ειδική διέγερση. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή της συγκέντρωσης για κάθε ομάδα.

4.6.2. ΛΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

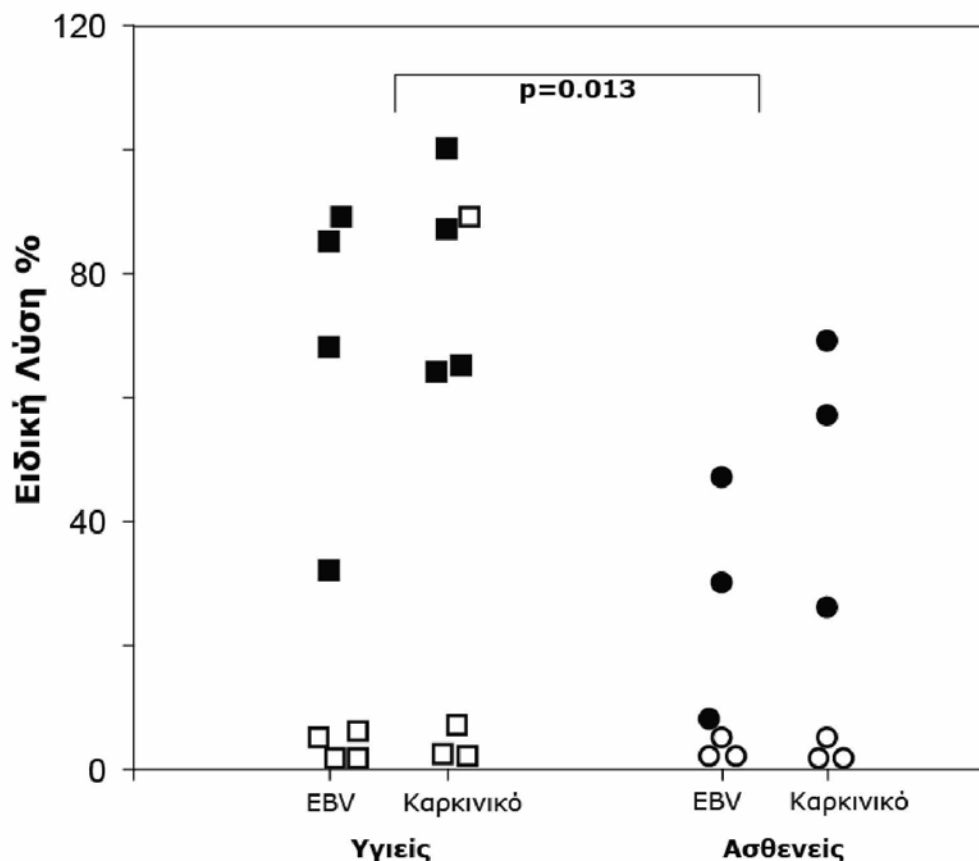
Η λυτική ικανότητα των CTL που απομονώθηκαν αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητά τους να σκοτώνουν κύτταρα στόχους που παρουσίαζαν το πεπτιδίο που αναγνωρίζουν. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα λύσης χρησιμοποιώντας EBV-B κύτταρα και καρκινικά κύτταρα σαν κύτταρα στόχους, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 43. Για την προτύπωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο CTL που απομονώθηκαν από υγιείς μάρτυρες νεαρής ηλικίας (CTL1 και CTL2) και αναγνωρίζουν τα MAGE-A3.A2 και MAGE-A3.A1 πεπτιδία αντίστοιχα.

Όλοι οι κλώνοι ήταν ικανοί να αναγνωρίσουν και να σκοτώσουν καρκινικά κύτταρα κατάλληλου HLA τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη MAGE-A3, αν και για να γίνει δυνατή η αναγνώριση ήταν απαραίτητη η προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου (**Εικ. 32**, πάνω σειρά). Εξαιρέση αποτέλεσαν τα αντι-MAGE-A3.A1 CTL τα οποία αναγνωρίζουν το πεπτιδίο MAGE-A3.A1₁₆₁₋₁₆₉. Στην περίπτωση των κλώνων αυτών η αναγνώριση και λύση των καρκινικών κυττάρων ήταν της ίδιας τάξης με και χωρίς την προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου. Ομοίως, όλα τα CTL ήταν ικανά να λύσουν EBV-B κύτταρα (**Εικ. 32**, κάτω σειρά) σε μικρότερο όμως βαθμό από τα καρκινικά ($p=0,0127$). Η αναγνώριση ήταν δυνατή μόνο μετά από προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου, καθώς τα EBV-B κύτταρα δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη MAGE-A3.

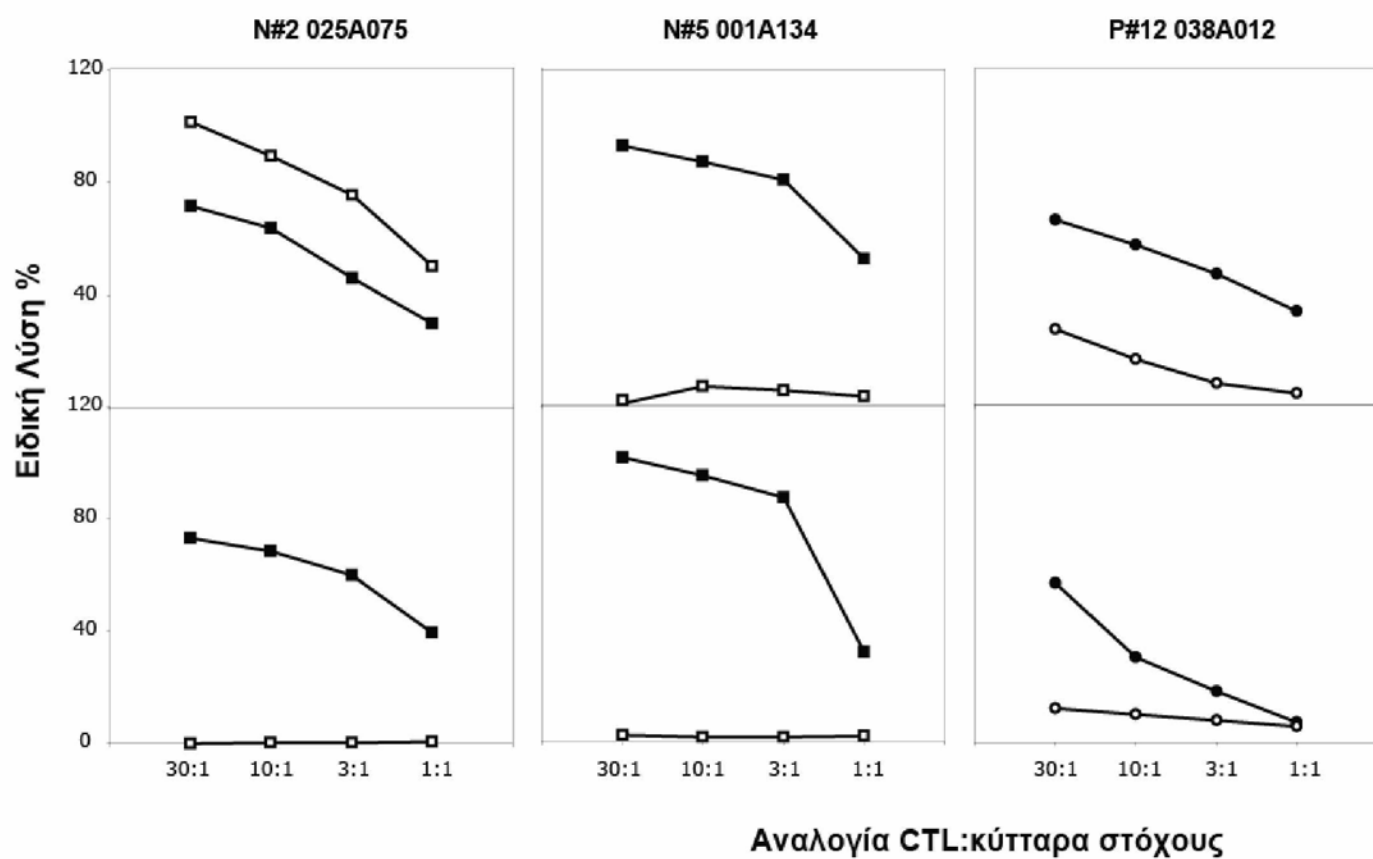
Το ποσοστό της ειδικής λύσης συγκρίθηκε στα CTL ασθενών και υγιών δοτών στην αναλογία 10:1 και όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση, τα CTL από υγιείς μάρτυρες είχαν καλύτερη λυτική ικανότητα συγκρινόμενα με CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς ($p=0,013$) (**Εικ. 31**).

Πίνακας 43: Λυτική ικανότητα των CTL που απομονώθηκαν από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν το ποσοστό της ειδικής λύσης (E: EBV-B κύτταρα, T: καρκινικά κύτταρα, +: με προσθήκη ειδικού πεπτιδίου, -: χωρίς πεπτίδιο).

CTL	Ειδικότητα	Λύση %			
		E+p	E-p	T+p	T-p
CTL1 017A163/31	MAGE-A3.A2	80	-2	80	3
CTL2 049C058/3	MAGE-A3.A1	67	1	85	80
N#2 025A075/41	MAGE-A3.A1	68	0	64	89
N#5 001A034	MAGE-A3.A2	85	15	100	2
N#5 001A134	MAGE-A3.A2	89	6	87	7
N#8 044A202/10	MAGE-A3.A2	32	0	65	-2
P#12 038A012	MAGE-A3.A2	30	21	57	16
P#23 023A149/3	MAGE-A3.A2	8	-1	26	2
P#23 023A166/70	MAGE-A3.A2	47	0	69	2

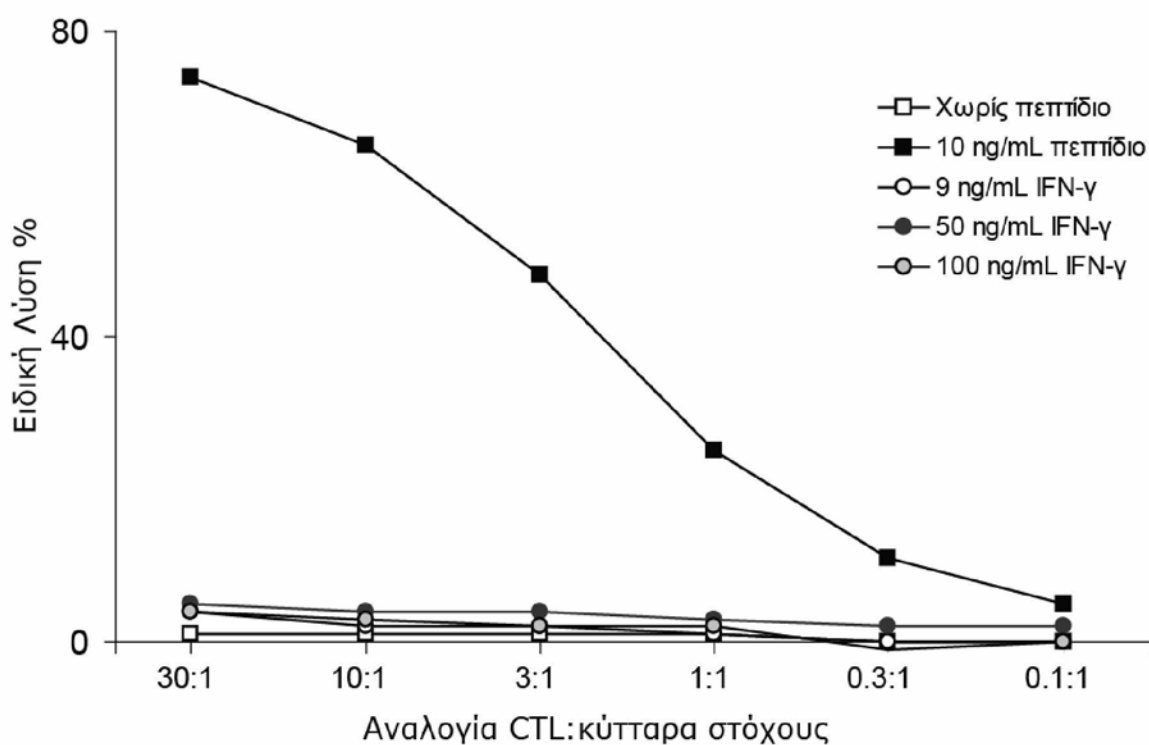


Εικόνα 31: Α. Λυτική ικανότητα των CTL που απομονώθηκαν από υγιείς μάρτυρες (■) και ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (●). Απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης με τη χρήση EBV B-κυττάρων και καρκινικών κυττάρων σαν κύτταρα στόχους. Με λευκό φόντο απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης χωρίς την προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου, ενώ με μαύρο φόντο μετά από προσθήκη πεπτιδίου σε συγκέντρωση 10ng/ml.



Εικόνα 32: Διαγράμματα ειδικής λύσης σε δύο κλώνους υγείων dotών και ασθενών, χρησιμοποιώντας και EBV-B κύτταρα ως κύτταρα στόχους (κάτω σειρά). Με λευκό φόντο απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης πεπτιδίου, ενώ με μαύρο φόντο μετά από προσθήκη πεπτιδίου σε συγκέντρωση 10ng/ml.

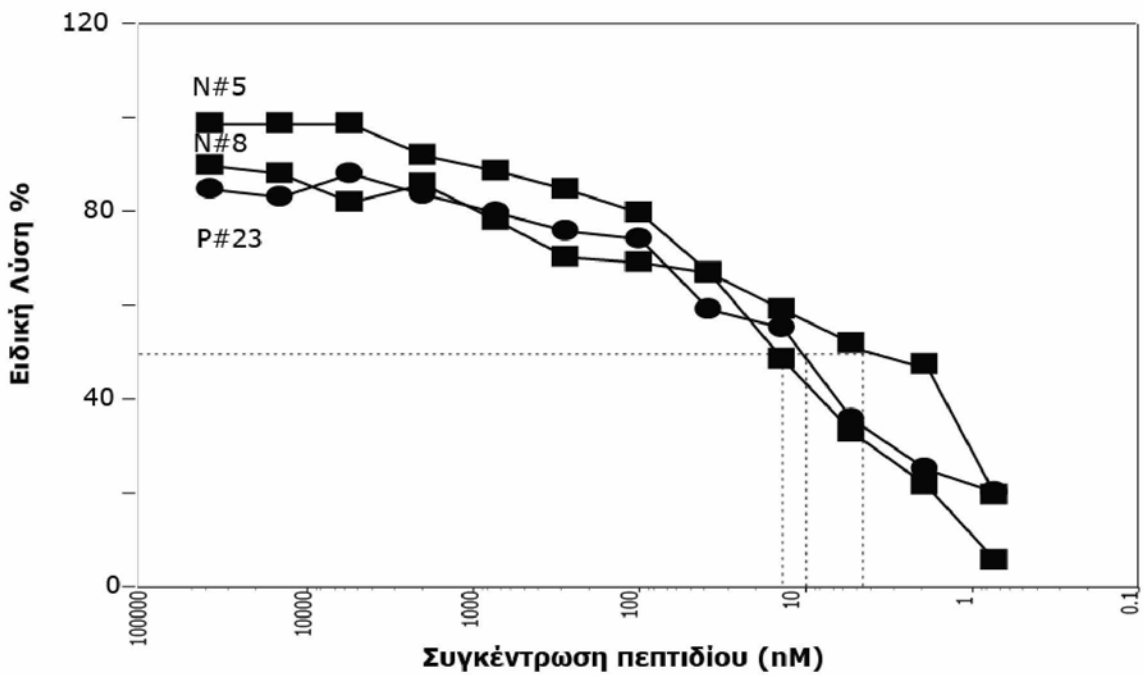
Σε μία προσπάθεια να διαπιστωθεί εάν τα υπό εξέταση πεπίδια μπορούν, εφόσον παράγονται, να παρουσιαστούν από τα καρκινικά κύτταρα, τα τελευταία εκτέθηκαν στη δράση της IFN- γ και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα στόχοι στο λειτουργικό χαρακτηρισμό. Σε συγκέντρωση 3 ng/mL και 9 ng/mL η IFN- γ δεν είχε καμία επίδραση στα καρκινικά κύτταρα, όταν χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμασίες παραγωγής κυτταροκινών. Ομοίως, σε δοκιμασίες λυτικής ικανότητας σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, δεν επηρέασε αισθητά την ικανότητα των CTL να αναγνωρίζουν και να σκοτώνουν τα κύτταρα στόχους, χωρίς την προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου (**Εικ. 33**).



Εικόνα 33: Δοκιμασία λυτικής ικανότητας σε ένα κλώνο ασθενούς χρησιμοποιώντας κύτταρα στόχους μετά από επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις IFN- γ . Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς την προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου και σαν θετικός μάρτυρας τα ίδια κύτταρα μετά από επώαση με το ειδικό πεπίδιο.

4.6.3. ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ TCR

Η συγγένεια του TCR για το ειδικό πεπτίδιο καθορίστηκε σε δύο CTL υγείων και σε ένα δείγμα ασθενούς (Εικ. 34). Η συγκέντρωση του πεπτιδίου που απαιτούνταν για να επιτευχθεί το 50% της μέγιστης λύσης ήταν παρόμοια για όλα τα δείγματα και κυμαίνονταν μεταξύ 3 και 12 nM. Όπως προέκυψε, όλα CTL που εξετάστηκαν έχουν TCR με παρόμοια συγγένεια για το ειδικό πεπτίδιο.



Εικόνα 34: Συγγένεια του TCR για το ειδικό πεπτίδιο σε δύο κλώνους υγείων (■) και ενός ασθενούς (●). Απεικονίζονται τα ποσοστά λύσης με τη χρήση EBV B-κυττάρων σαν κύτταρα στόχους.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΟΕΙΔΙΚΩΝ CTL

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της έλλειψης εμπεριστατωμένων αποτελεσμάτων σχετικά με την ύπαρξη προϋπάρχουσας pCTL απάντησης έναντι του όγκου στον καρκίνο του πνεύμονα, καθώς τόσο η ένταση αλλά και η ποιότητα της απάντησης αυτής διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της έναντι του όγκου απόκρισης. Για το λόγο αυτό, υπολογίστηκε η συχνότητα των κυκλοφορούντων CTL έναντι πεπτιδίων των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 που παρουσιάζονται από διάφορα τάξης I MHC μόρια. Καθώς η συχνότητα της παρουσίας των κυττάρων αυτών είναι ιδιαίτερα χαμηλή χρησιμοποιήθηκε μια ιδιαίτερα εξειδικευμένη μεθοδολογία *in vitro* καλλιέργειας (MLPC) των κυττάρων αυτών σε συνδυασμό με υψηλής ευαισθησίας μέθοδο ανίχνευσης, με τη χρήση των HLA πολυμερών. Για να είναι δυνατή η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων στους ασθενείς με καρκίνο, παράλληλα πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συχνότητας των ίδιων πεπτιδίων σε μεγάλο αριθμό υγιών μαρτύρων ίδιας ηλικιακής ομάδας.

Συχνότητα αντι-MAGE pCTL σε άτομα χωρίς καρκίνο

Οι πληροφορίες που υπάρχουν για τις T κυτταρικές απαντήσεις έναντι αντιγόνων των όγκων σε άτομα χωρίς καρκίνο είναι ελάχιστες και έχουν προκύψει, κυρίως, ως παράπλευρες παρατηρήσεις από μελέτες σε ασθενείς. Η γνώση της πρωταρχικής συχνότητας στους υγιείς είναι σημαντικό στοιχείο για τη σύγκριση της απάντησης στους ασθενείς και την αποτίμηση των αποτελεσμάτων σε πρωτόκολλα εμβολιασμού.

Στους υγιείς μάρτυρες ανιχνεύθηκαν pCTL έναντι των πεπτιδίων MAGE-A3.A2₂₇₁₋₂₇₉ και MAGE-A3.A1₁₆₈₋₁₇₆ στο 56% και 17% των δειγμάτων, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας πως CD8 T απαντήσεις έναντι αντιγόνων των όγκων όντως απαντούνται σε άτομα χωρίς καρκίνο. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε απάντηση για κανένα πεπτίδιο της MAGE-A1 πρωτεΐνης, καθώς και για τα πεπτίδια της MAGE-A3 πρωτεΐνης που παρουσιάζονται από μόρια HLA-A24 και -B35. Έναντι των πεπτιδίων MAGE-A3.A2₂₇₁₋₂₇₉ και MAGE-A3.A1₁₆₈₋₁₇₆ η συχνότητα των κυκλοφορούντων CTL κυμαίνονταν από 1,0 έως $3,6 \times 10^{-7}$ CD8 T κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν απόλυτα με παλαιότερες μελέτες [100, 107]. Ωστόσο, στις μελέτες αυτές η συχνότητα των CTL έχει εκτιμηθεί σε μόλις 4 υγιή άτομα με διαφορετική μεθοδολογία. Ανεξαρτήτως συχνότητας, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν το γεγονός πως CTL κλώνοι που αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα κυκλοφορούν στο αίμα υγιών ατόμων.

Το ερώτημα που τίθεται λοιπόν είναι γιατί CTL που αναγνωρίζουν φυσιολογικές πρωτεΐνες του γονιδιώματος έχουν διαφύγει της επιλογής στο θύμο. Γνωρίζουμε από σποραδικές μελέτες [182, 183] και από την ύπαρξη της αυτοανοσίας πως αυτοδραστικά κύτταρα διαφεύγουν της αρνητικής επιλογής. Βέβαια, τα αντιγόνα MAGE παρουσιάζουν

ιδιαιτερότητα και είναι αμφιλεγόμενο εάν αντιπροσωπεύουν ίδια αντιγόνα. Τυπικά, μπορεί να υποστηριχθεί πως είναι ίδια, με τη λογική πως αποτελούν έκφραση φυσιολογικών γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ωστόσο, καθώς εκφράζονται αποκλειστικά από ανοσολογικά προστατευόμενες περιοχές και καρκινικά κύτταρα, δεν ανήκουν στη σφαίρα του ιδίου, οπότε και τα CTL που τα αναγνωρίζουν δεν χαρακτηρίζονται αυτοδραστικά. Πιθανότατα, λοιπόν, πρόκειται για παρθένα T κύτταρα τα οποία περιπολούν για την παρουσία εξαλλαγμένων κυττάρων που έκρυθμα εκφράζουν τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το εύρημα της εργασίας των Chaux et al. [107] πως τα κύτταρα αυτά απομονώνονται στον CD45RA⁺ πληθυσμό και δικά μας μη δημοσιευμένα αποτελέσματα σε δείγματα φυσιολογικών ατόμων.

Συχνότητα αντι-MAGE pCTL σε άτομα με καρκίνο πριν τη θεραπεία

Γνωρίζοντας πλέον τη βασική συχνότητα των κυττάρων αυτών στους υγιείς μπορούμε να αναλύσουμε την προϋπάρχουσα απάντηση στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η γνώση αυτή είναι μέγιστης σημασίας για το σχεδιασμό πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας στους ασθενείς [184]. Καθώς ο στόχος της ανοσοθεραπείας είναι η ενίσχυση της προϋπάρχουσας απάντησης, η παρουσία ή απουσία και το μέγεθος της απάντησης αυτής είναι κρίσιμα στοιχεία για την έκβαση της θεραπείας. Συνοπτικά, από τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούμε να πούμε πως απαντήσεις έναντι πεπτιδίων της MAGE-A3 πρωτεΐνης απαντώνται συχνά σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, σε αντίθεση με την απάντηση έναντι των MAGE-A1 πεπτιδίων. Μάλιστα, η παρουσία ειδικών pCTL δεν παρουσίασε συσχέτιση με την έκφραση των αντιγόνων στον καρκινικό ιστό των ίδιων ασθενών, ούτε με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Συχνότερη ήταν η απάντηση στο MAGE-A3.A2 πεπτίδιο, στο ίδιο όμως ποσοστό των δειγμάτων με τους μάρτυρες. Επίσης συχνή ήταν η απάντηση έναντι του MAGE-A3.A24 πεπτιδίου, σε συχνότητα, όμως, που κυμαίνεται στα επίπεδα της απάντησης σε φυσιολογικά άτομα. Χαμηλότερη, αλλά ανιχνεύσιμη, ήταν η απάντηση έναντι του MAGE-A3.B35 πεπτιδίου. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκαν ειδικά pCTL που να αναγνωρίζουν τα MAGE-A1.A1, MAGE-A1.B35 και MAGE-A3.A1 πεπτίδια. Όσον αφορά τα τελευταία, είναι η πρώτη φορά που υπολογίζεται η συχνότητα των CTL που τα αναγνωρίζουν και αποκαλύπτεται η απουσία ισχυρής απάντησης τόσο σε ασθενείς, αλλά και σε υγιή άτομα, γεγονός που θέτει προς αμφισβήτηση τη χρησιμότητά τους στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Το μέγεθος της CTL απάντησης έναντι των αντιγόνων MAGE δεν έχει προσδιοριστεί στον καρκίνο του πνεύμονα. Μάλιστα, άμεση σύγκριση της συχνότητας των αντιγονοειδικών αυτών κυττάρων με τα αποτελέσματα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία είναι δύσκολο να γίνει διότι η μεθοδολογική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη

αυτή σπάνια χρησιμοποιείται, καθώς πρόκειται για μία χρονοβόρο, πολυέξοδη και πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί εξελιγμένο εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Ωστόσο, στις λίγες περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε η ίδια προσέγγιση προέκυψαν συγκρίσιμα με τα δικά μας αποτελέσματα [99, 100, 101]. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με την αναφορά των Zhang et al. [96] στην οποία αναφέρεται πως αντι-MAGE-A3.A2 T κύτταρα ανιχνεύονται σε μη εμβολιασμένους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μόνο έπειτα από ένα βήμα *in vitro* ενεργοποίησης. Όσον αφορά την αντι-MAGE-A3.A24 απάντηση, οι συχνότητες που ανιχνεύτηκαν στη δική μας μελέτη είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρθηκαν από τους So et al. [176] σε ασθενείς με μελάνωμα και μη καρκινοπαθείς. Προφανώς, η συχνότητα των pCTL έναντι των αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη είναι χαμηλότερη από αυτή που αναφέρεται έναντι άλλων αντιγόνων των όγκων, όπως το Melan-A ή η τυροσινάση [185, 186], τα οποία ανήκουν στα αντιγόνα διαφοροποίησης και μπορούν να ανιχνεύονται απευθείας *ex vivo* με τη χρήση HLA-πολυμερών. Όπως, όμως, προκύπτει είναι αυξημένη σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, καθώς ο μέσος όρος της συχνότητας των αντι-MAGE-A3 pCTL στους ασθενείς ήταν 7 φορές υψηλότερος από το μέσο όρο στους υγιείς μάρτυρες, αποκαλύπτοντας πιθανή *in vivo* επαφή με τα υπό διερεύνηση πεπτίδια.

Παθμένα T κύτταρα ή κύτταρα μνήμης;

Όπως αναφέρθηκε, στους ασθενείς ανιχνεύθηκε παρουσία αντιγονοειδικών pCTL σε αυξημένη συχνότητα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ίδιας ηλικιακής ομάδας. Μάλιστα, σε μία περίπτωση ασθενούς υπολογίστηκε ~40 φορές υψηλότερη συχνότητα αντι-MAGE-A3 pCTL από τη μέση συχνότητα στους υγιείς. Το μόνο που διαφοροποιεί τις δύο ομάδες είναι η παρουσία του όγκου, οπότε εύκολα μπορεί να υποθεθεί πως η αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς μπορεί να είναι το αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών μετά από *in vivo* επαφή με τα καρκινικά αντιγόνα. Δηλαδή, στους ασθενείς με υψηλή συχνότητα, τα pCTL που ανιχνεύονται να αντιπροσωπεύουν κύτταρα μνήμης.

Δυστυχώς, η χαμηλή συχνότητα με την οποία απαντώνται τα κύτταρα αυτά στο περιφερικό αίμα δεν μας επιτρέπει τον άμεσο χαρακτηρισμό τους με δείκτες που θα μπορούσαν να αποκαλύψουν το στάδιο διαφοροποίησής τους (π.χ. ισομορφές του CD45 και CCR7). Η μεθοδολογία απομόνωσής τους συνεπάγεται την ενεργοποίησή τους με τα πεπτίδια που αναγνωρίζουν. Έτσι, αν και όλες οι CD8 T γραμμές και οι CTL κλώνοι που απομονώθηκαν φαίνεται να έχουν το φαινότυπο των δραστικών ή κεντρικών κυττάρων μνήμης (παρ. 4.3 και 4.5.1.) δεν μπορούμε να γνωρίζουμε εάν ο φαινότυπος αυτός αντιπροσωπεύει την προϋπάρχουσα κατάσταση των κυττάρων ή έχει επαχθεί από το σύστημα της καλλιέργειας. Παρόμοιες προσπάθειες κατέληξαν στο ίδιο ακριβώς συμπέρασμα [96, 102].

Ενδιαφέρουσες πληροφορίες για το ερώτημα “παρθένα ή Τ κύτταρα μνήμης” έχουν προκύψει από μελέτες σε άλλα αντιγόνα των όγκων, όπου είναι δυνατός ο απευθείας *ex vivo* χαρακτηρισμός τους, όπως στην περίπτωση του Melan-A/MART-1. Σε δύο ανεξάρτητες μελέτες διερευνήθηκαν τα χαρακτηριστικά των αντιγονοειδικών Melan-A/MART-1 pCTL σε φυσιολογικούς μάρτυρες και ασθενείς με μελάνωμα [187, 188]. Και στις δύο μελέτες τα pCTL των φυσιολογικών ατόμων είχαν χαρακτηριστικά παρθένων Τ κυττάρων, ενώ στους ασθενείς τα αποτελέσματα ήταν μικτά. Ένα ποσοστό των ασθενών 7/10 [187] και 7/13 [188] είχαν κύτταρα με CCR7+, CD45RO-, CD45RA+ φαινότυπο και μη λειτουργική απάντηση στο πεπτιδίο Melan-A, ενώ οι εναπομείναντες ασθενείς παρουσίαζαν CCR7-, CD45RO+, CD45RA- φαινότυπο και τα ειδικά CTL ήταν λειτουργικά. Σε παρόμοια μελέτη, εξετάζοντας CTL απάντηση έναντι της τυροσινάσης και του Melan-A, αναφέρεται πως φαινοτυπικές και λειτουργικές διαφορές εμφανίζονται όχι μόνο ανάμεσα στους ασθενείς, αλλά και ανάμεσα σε κύτταρα διαφορετικής ειδικότητας στον ίδιο ασθενή [189]. Είναι, λοιπόν, πιθανό τα CTL των ασθενών να εμφανίζουν φαινότυπο είτε παρθένων ή Τ κυττάρων μνήμης (κεντρικά, δραστικά ή τελικώς διαφοροποιημένα CTL) και αυτό, λογικά, εξαρτάται από το εάν στην πορεία της καρκινογένεσης ή/και της εξέλιξης της ασθένειας, ήρθαν σε επαφή με τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν και υπό ποιες συνθήκες.

Ανάλογα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι και στους ασθενείς της μελέτης αυτής τα CTL θα μπορούσαν να παρουσιάζουν διαφορετική προέλευση ανάλογα με την έκφραση των αντιγόνων που αναγνωρίζουν στον καρκινικό ιστό και το μικροπεριβάλλον στην περιοχή του όγκου. Θα αναφερθούμε παρακάτω σε μεμονωμένες περιπτώσεις ασθενών στις οποίες ήταν δυνατός ο περαιτέρω φαινοτυπικός χαρακτηρισμός. 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.

Ασθενείς με αυξημένη pCTL συχνότητα

Από την ανάλυση της συχνότητας στους ασθενείς σε σχέση με υγιείς μάρτυρες προέκυψε πως κάποιοι ασθενείς είχαν 7-35 φορές υψηλότερη συχνότητα απάντησης έναντι του MAGE-A3.A2 πεπτιδίου. Τέτοιου μεγέθους απαντήσεις απαντώνται σε ασθενείς μετά από εμβολιασμό [99, 100, 115] και δεν έχουν περιγραφεί προηγουμένως σε αυτόματες απαντήσεις σε ασθενείς με καρκίνο ή υγιείς, όσον αφορά τα συγκεκριμένα πεπτιδία. Για το λόγο αυτό έγινε μια πολύ μεγάλη προσπάθεια διεξοδικής μελέτης της CTL απάντησης στους συγκεκριμένους ασθενείς.

Στην περίπτωση του ασθενή P#23 από τη διαδικασία του MLPC απομονώθηκαν κατά τη διάγνωση 7 CD8 Τ γραμμές που αναγνώριζαν το MAGE-A3.A2 πεπτιδίο (f=

14×10^{-7}) και μετά τη θεραπεία μία γραμμή της ίδιας ειδικότητας ($f=3,4 \times 10^{-7}$). Σε μία ακόμη περίπτωση ασθενή P#12 ανιχνεύθηκε ακόμη μεγαλύτερη συχνότητα η οποία ήταν 70×10^{-7} των CD8 T κυττάρων κατά τη διάγνωση και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα (75×10^{-7}) μετά τη θεραπεία. Οι CD8 T γραμμές που προέκυψαν μετά από τέσσερις *in vitro* ενεργοποιήσεις παρουσίασαν φαινότυπο δραστικών μνημονικών κυττάρων, ενώ οι κλώνοι που προέκυψαν είχαν φαινότυπο δραστικών και κεντρικών μνημονικών κυττάρων (CD45RA⁻, CD45RO⁺, CCR7^{+/-}, CD28⁺, CD57⁻), χωρίς να μπορούμε να πούμε εάν αυτό αντιπροσωπεύει την προϋπάρχουσα κατάσταση τους ή οφείλεται στο σύστημα ενεργοποίησης.

Όμως, από τη μελέτη της κλωνικότητας του TCR προέκυψε ολιγκλωνικό προφίλ για τον P#23 με τουλάχιστον 3 διαφορετικούς κλωνότυπους που αναγνωρίζουν το MAGE-A3.A2 πεπτίδιο (**Εικ. 28**) και πιθανότατα μονοκλωνικό προφίλ για τον ασθενή P#12, αφού 9/11 T κυτταρικές γραμμές, στις οποίες υπήρχε υλικό προς εξέταση, είχαν την ίδια ακολουθία β αλύσου του TCR. Αξιολογώντας την απάντηση ασθενών σε εμβολιασμό, έχει διατυπωθεί από τους Karanikas et al. [151] πως θεωρείται ότι υπάρχει *in vivo* ενεργοποίηση από το πεπτίδιο, εάν η συχνότητα των CTL είναι μεγαλύτερη του 4×10^{-7} ή εάν εμφανίζεται ο ίδιος κλωνότυπος τουλάχιστον σε 3/10 CTL στον ίδιο ασθενή. Με αυτά τα δεδομένα μπορούμε να πιθανολογήσουμε για τους δύο ασθενείς που εξετάστηκαν πως στη διαδικασία της καρκινογένεσης ή και της εξέλιξης της ασθένειάς τους τα αντι-MAGE-A3.A2 CTL ήρθαν σε επαφή με τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν πολλαπλασιάστηκαν και διαφοροποιήθηκαν σε κύτταρα μνήμης, τα οποία για διάφορους λόγους δεν κατάφεραν να ολοκληρώσουν μια επιτυχή ανοσιακή απάντηση και παρέμειναν να κυκλοφορούν σε μια αυξημένη συχνότητα. Δυστυχώς η διαπίστωση αυτή δεν ήταν δυνατό να επαληθευθεί και στα υπόλοιπα δείγματα, λόγω αδυναμίας πολλαπλασιασμού των αντίστοιχων πληθυσμών. Τα περιστατικά αυτά αποτελούν, όμως, σημαντικές ενδείξεις ότι απάντηση στο πεπτίδιο MAGE-A3.A2₂₇₁₋₂₇₉ λαμβάνει χώρα *in vivo* και μάλιστα συμβαίνει αυτόματα.

Επίδραση της χημειοθεραπείας στη συχνότητα των pCTL

Διάφορα αντικαρκινικά θεραπευτικά σχήματα φαίνεται πως επηρεάζουν την αντιγονικότητα του καρκίνου. Η χειρουργική παρέμβαση, για παράδειγμα, αφαιρεί ένα τεράστιο ποσοστό κυττάρων, που ενδεχομένως εκφράζουν διαφορετικά καρκινικά αντιγόνα, ενώ η απόπτωση που προκαλείται από τη ακτινο- και χημειοθεραπεία έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παρουσίαση πεπτιδίων των όγκων από τα APCs. Στο πλαίσιο αυτό, διάφορες μελέτες εξέτασαν συσχετίσεις των σχημάτων αυτών με την ανοσιακή απάντηση και ανέφεραν θετική σχέση σε κάποιες περιπτώσεις, ανοίγοντας το δρόμο για συνδυασμένες χημειοανοσοθεραπευτικές εφαρμογές [190, 191, 192].

Η σισπλατίνη (cisplatin) είναι ένα παράγωγο πλατίνας που δρα σαν αντινεοπλασματικός παράγοντας, επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης [193]. Εκτός από την επίδραση που έχει στην επιβράδυνση της ανάπτυξης του όγκου, η χρήση του φαρμάκου αυτού θεωρείται πως δημιουργεί περισσότερο ανοσογονικούς όγκους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειραματικά μοντέλα, στα οποία επακολούθησε εμβολιασμός με αντιγονικά πεπτίδια, οδηγώντας σε βελτίωση της έναντι του όγκου CD8 T απάντησης [194, 195]. Ωστόσο, δεν έχει πραγματοποιηθεί ποσοτική αξιολόγηση της επίδρασης της ουσίας αυτής στον άνθρωπο. Προς την κατεύθυνση αυτή, εξετάσαμε εάν η θεραπεία με ακτινοβολία ή/και η χημειοθεραπεία με σισπλατίνη επιδρά στη συχνότητα στην οποία ανιχνεύονται αντιγονοειδικά έναντι του όγκου pCTL. Μελετήθηκαν 16 ασθενείς κατά τη διάγνωση και ένα τουλάχιστον χρόνο μετά τη θεραπεία. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, ούτε στη συχνότητα των pCTL, ούτε επέκταση της απάντησης σε μεγαλύτερο αριθμό πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά, αν και ήταν μη αναμενόμενα, έχοντας υπόψη τις ενδείξεις από πειραματικά μοντέλα σε ζώα, εξηγούνται από το γεγονός πως οι πληροφορίες που προκύπτουν από τέτοια μοντέλα δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες στην κλινική πράξη. Επιπλέον, όταν εξάγουμε συμπεράσματα από τέτοιου είδους μελέτες, απαιτείται προσοχή, καθώς τα μοντέλα σε ζώα δεν προσομοιώνουν το ενδεχομένως ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον στην περιοχή του όγκου και δεν πρέπει να οδηγούν σε μεγάλης κλίμακας δοκιμές χωρίς να έχει προηγηθεί κλινική αξιολόγηση σε ασθενείς με καρκίνο και όχι σε ποντίκια.

Συχνότητα αντι-MAGE pCTL σε TILs

Στην προσπάθεια να διερευνήσουμε εάν σε δείγματα TILs ανιχνεύονται ειδικά CTLs και σε ποια συχνότητα εξετάστηκαν 5 δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ. Σε καμία περίπτωση μετά από διέγερση δύο εβδομάδων δεν ανιχνεύθηκαν ειδικά CTL που να αναγνωρίζουν κάποιο από τα υπό διερεύνηση πεπτίδια, παρά την παρουσία ειδικών αντι-EBV CTL σε δύο από τους ασθενείς. Βέβαια, στους τέσσερις από αυτούς δεν είχε ανιχνευθεί αντίστοιχος πληθυσμός στα PBMCs και μόνο για τον ασθενή P#9 ανιχνεύθηκαν στο αίμα αντι-MAGE-A3.A2 CTL σε συχνότητα $5,8 \times 10^{-7}$ των CD8 T κυττάρων, μικρότερη από το όριο ανίχνευσης που εξετάσαμε στα TILs του ίδιου ασθενή ($f < 21 \times 10^{-7}$). 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 CTL να διηθήσουν συμπαγείς όγκους -όπως ο καρκίνος του πνεύμονα-, χαμηλή συχνότητα των CTL κάτω από τα όρια ανίχνευσης της *ex vivo* ανάλυσης και αδυναμία των CTL που ενδεχομένως έχουν βρεθεί στα TILs να πολλαπλασιαστούν *in vitro* εξαιτίας των ανοσοκατασταλτικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου που τα έχουν καταστήσει ανεργικά.

Στα καρκινικά δείγματα των ασθενών που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε έκφραση τουλάχιστον ενός εκ των αντιγόνων που εξετάστηκαν σε δύο ασθενείς, χωρίς αυτό να μπορεί να αποκλείσει την έκφραση των πρωτεϊνών MAGE στους υπόλοιπους σε διαφορετικό στάδιο της εξέλιξης της νόσου. Επιπλέον, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παρεμφερή δείγματα στο εργαστήριό μας ανιχνεύθηκε έκφραση των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 στο 50% και 40% αντίστοιχα των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα [127]. Επίσης, η αδυναμία διήθησης, αν και αναφέρεται για τον καρκίνο του πνεύμονα [196], δεν φαίνεται να υποστηρίζεται από τα ευρήματά μας, καθώς το 10-15% των κυττάρων σε δείγματα καρκινικού ιστού αποτελούσαν λεμφοκύτταρα από τα οποία ένα σημαντικό ποσοστό (~20%) αποτελούσαν CD8 T κύτταρα (**Πιν. 19**). Τα περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν πως η αδυναμία ανίχνευσης απάντησης είναι η ανικανότητα των κυττάρων αυτών να πολλαπλασιαστούν *in vitro*. Σε μία μελέτη αναπτύχθηκαν 26 δείγματα TIL ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και ειδικές απαντήσεις έναντι CTA αντιγόνων ανιχνεύθηκαν σε μικρό ποσοστό των δειγμάτων αυτών [126]. Μάλιστα, αναφέρεται πως σε όλα τα δείγματα πλην ενός η κυτταροτοξικότητα της ειδικής απάντησης ήταν χαμηλή και η χρώση με τα τετραμερή ήταν παντελώς απύσχα, υποδεικνύοντας μειωμένη λειτουργικότητα και χαμηλή συνάφεια των αντιγονοειδικών CTL. Σε μία ακόμη μελέτη σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ανιχνεύθηκαν *ex vivo* ειδικά CTL έναντι των αντιγόνων MAGE-A1 και MAGE-A3 στα 2/12 δείγματα ασθενών, τα οποία όμως παρουσίασαν ανικανότητα *in vitro* ενεργοποίησης [97]. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία η αδυναμία πολλαπλασιασμού των CTL στα TIL επηρεάζεται από ανωμαλίες σε μόρια σηματοδότησης που επηρεάζουν την επιβίωσή τους, όπως οι CD3-ζ και ε αλυσίδες και τα μόρια p56^{lck}, Zap-70, και p59^{fyn} [197]. Επιπλέον, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησής τους, τα TILs επηρεάζονται από την έκφραση μορίων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως τα FasL και PD-1, και NK υποδοχέων, που τα οδηγούν σε ανεργική κατάσταση ή απαλοιφή [198].

Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως τα TILs πιθανότατα αντιπροσωπεύουν “νικημένους μαχητές” ή ακόμη “απογόνους των νικημένων” με καμία χρησιμότητα εκτός από το να λειτουργούν μερικώς σηματοδοτώντας την ύπαρξη της ασθένειας [197]. Εάν αυτό πραγματικά ισχύει θα πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα επιφυλακτικοί, εάν σκοπεύουμε να χρησιμοποιήσουμε τα κύτταρα αυτά σαν πηγή δραστικών κυττάρων στην ανοσοθεραπεία.

Συχνότητα έναντι ιικών πεπτιδίων

Ταυτόχρονα με τη μελέτη της απάντησης στα καρκινικά αντιγόνα μελετήθηκε και η απάντηση σε ιικά αντιγόνα για να επιβεβαιώσει την ικανότητα της τεχνικής του MLPC να ανιχνεύσει τη συχνότητα των αντιγονοειδικών CTL στην περιφέρεια. Όπως προέκυψε, οι ασθενείς εμφάνισαν ισοδύναμη ειδική αντι-EBV CTL απάντηση σε σύγκριση με την

ομάδα ελέγχου (βλέπε παρ. 4.1.), η οποία σε επακόλουθη έρευνα αποκαλύφθηκε πως ήταν σημαντικά περιορισμένη σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες μικρότερης ηλικίας [199]. Μάλιστα, στην μελέτη αυτή, τα αντιγονοειδικά αντι-EBV CTL παρουσίασαν παρόμοια ικανότητα πολλαπλασιασμού και συγγένεια του πεπτιδίου με τον TCR ανάμεσα στις τρεις ομάδες. Όσον αφορά τη σύγκριση με την ομάδα των νεαρών ατόμων, τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία [200] και συνδέονται με φαινόμενα της πολύπλοκης διαδικασίας της ανοσογήρανσης [201, 202].

Αυτό που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι πως οι καρκινοπαθείς παρουσιάζουν παρόμοια μεταβολή στη συχνότητα της αντι-EBV CTL απάντηση με την ηλικιακά ισοδύναμη ομάδα τους. Με άλλα λόγια, ούτε το αντιγονικό φορτίο του όγκου, ούτε κάποιος σχετιζόμενος με τον όγκο παράγοντας δεν επηρέασε την ικανότητά τους να οργανώσουν την ειδική έναντι του ιού απάντηση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι συγκεκριμένοι ασθενείς δεν χαρακτηρίζονται από γενικευμένη καταστολή της ανοσιακής απάντησης, αλλά η αναποτελεσματικότητα της έναντι του όγκου ανοσιακής απάντησης είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της εξάντλησης των αντιγονοειδικών έναντι του όγκου CTL που σχετίζεται με την ηλικία [203] είτε με τη συνεχή επαφή τους με το αντιγόνο [204, 205].

Είναι η συχνότητα σημαντική;

Όπως αναφέρθηκε, στόχος της ανοσοθεραπείας είναι η ενίσχυση της προϋπάρχουσας απάντησης. Εάν αυτή βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συχνότητα ή έχει καταστεί ανεργική, θα υπάρχουν κρίσιμες επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα των εμβολιασμών. Σε αυτό το πλαίσιο είναι απαραίτητη η γνώση της προϋπάρχουσας συχνότητας έναντι των συγκεκριμένων αντιγόνων [184], προτού ξεκινήσει οποιαδήποτε προσπάθεια ανοσοθεραπείας σε ασθενείς. Στο ίδιο πλαίσιο επίσης, παρακολουθείται και η εξέλιξη των έναντι του εμβολίου T απαντήσεων και επιχειρούνται συσχετίσεις της έντασης της απάντησης με την κλινική απόκριση. Μάλιστα, σε κάποιες από αυτές φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση [100, 206], αποτελέσματα που έρχονται σε συμφωνία με την υπόθεση πως η απάντηση έναντι του εμβολίου είναι αναγκαία, αλλά όχι από μόνη της επαρκής, ώστε να έχει ως αποτέλεσμα την απόρριψη του όγκου [207].

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί μία εναλλακτική υπόθεση για την εξήγηση της περιστασιακής υποχώρησης του όγκου σε κάποιους ασθενείς ("antigen spreading") στηριζόμενη στις παρατηρήσεις πως κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν υποχώρηση του όγκου με χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη απάντηση έναντι του εμβολίου CTL [100], ενώ ανιχνεύονται μεγάλοι αριθμοί CTL έναντι αντιγόνων του όγκου που δεν συμπεριλαμβάνονταν στο εμβόλιο [208, 209, 210]. Το μοντέλο που προτείνεται είναι πως τα έναντι

του εμβολίου ειδικά CTL, ακόμη και σε μικρούς αριθμούς, είναι ικανά να ξεκινήσουν τη διαδικασία καταστροφής του όγκου, οδηγώντας σε δευτερογενή απάντηση σε μεγαλύτερο βαθμό από CTL πολλαπλών ειδικοτήτων [111]. Υπό αυτή την έννοια, η λειτουργικότητα των έναντι του εμβολίου T κυττάρων εμφανίζεται να είναι περισσότερο κρίσιμος παράγοντας από τον αριθμό τους.

5.2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΟΕΙΔΙΚΩΝ CTL

Ένας από τους πιθανούς λόγους για του οποίους ο εμβολιασμός με πεπτίδια δεν έχει ως αποτέλεσμα την ανοσολογική απόρριψη του όγκου, φαίνεται να είναι σε κάποιες περιπτώσεις η περιορισμένη λειτουργικότητα των επαγόμενων CTL. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν, πως σε ασθενείς με καρκίνο, μεγάλος αριθμός ειδικών έναντι του όγκου CTL παραμένουν αδρανή στην παρουσία του όγκου και έχει διατυπωθεί η άποψη πως η προσπάθεια ανοσοθεραπείας είναι ατελέσφορη διότι οι εμβολιασμοί ενισχύουν ελαττωματικά ή γηρασμένα CD8 T κύτταρα [211]. Παρόλα αυτά, λιγοστές είναι οι μελέτες στις οποίες αξιολογήθηκε η λειτουργική ικανότητα των αντιγονοειδικών CTL πριν τον εμβολιασμό, ενώ ποτέ δεν πραγματοποιήθηκε τέτοια ανάλυση σε σύγκριση με αντίστοιχους πληθυσμούς από υγιή άτομα. Ένας λόγος για την απουσία τέτοιων δεδομένων είναι η δυσκολία απομόνωσης και διατήρησης σε καλλιέργεια των αντιγονοειδικών CTL σε συνδυασμό με την πολυπλοκότητα και την πολλαπλότητα της τεχνικής υποστήριξης που απαιτείται για τον πλήρη λειτουργικό χαρακτηρισμό των κυττάρων αυτών.

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η απομόνωση όλων των αντιγονοειδικών πληθυσμών από τους υγιείς μάρτυρες και σε όσες T κυτταρικές γραμμές ασθενών υπήρχε επάρκεια υλικού, σε μία προσπάθεια να αποφευχθεί η εξαγωγή συμπερασμάτων από μεμονωμένες περιπτώσεις, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία [97, 124]. Για το λόγο αυτό ο λειτουργικός χαρακτηρισμός έλαβε χώρα σε πέντε κλώνους υγιών μαρτύρων και δύο κλώνους ασθενών, οι οποίοι πολλαπλασιάστηκαν σε ικανοποιητικό βαθμό *in vitro*, ώστε να αποκτηθεί επαρκής αριθμός κυττάρων για τη χρήση τους σε λειτουργικές δοκιμασίες. Μάλιστα, τα δείγματα αυτά παρουσίασαν παρόμοια έκφραση μεταγράφων BCL2 με EBV μετασχηματισμένα B κύτταρα και έκφραση CD28, αποδεικνύοντας αντοχή στην απόπτωση και ικανότητα συνδιέγερσης, που εν μέρει δικαιολογεί την ικανότητά τους να διατηρούνται σε καλλιέργεια. Επίσης, εμφάνισαν παρόμοια ικανότητα παραγωγής των απαραίτητων για τη δράση τους κυτταροκινών (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ και TNF- α) και απουσία έκφρασης IL-10. Αν και έγιναν πολλαπλές προσπάθειες καλλιέργειας και απομόνωσης στην πλειοψηφία των ειδικών πληθυσμών, στα υπόλοιπα δείγματα υγιών και ασθενών ήταν αδύνατη η ανάπτυξη των CTL. Δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τους λόγους αυτής της αδυναμίας, υποθέτουμε όμως ότι πιθανώς να σχετίζονται με τα φαινόμενα της ανοσογήρανσης στους μάρτυρες ή/και της αντιγραφικής εξάντλη-

σης των Τ κυττάρων στους ασθενείς, εξαιτίας της συνεχούς ενεργοποίησης παρουσία αντιγονικού ερεθίσματος από τον όγκο.

Η ανοσογήρανση είναι μία σύνθετη διαδικασία αποτέλεσμα του σταδιακού εκφυλισμού σχεδόν όλων των συστατικών της φυσικής και επίκτητης ανοσίας [212], ανάμεσα στις οποίες δεσπόζει η εξασθένηση των Τ κυττάρων. Αλλαγές που σχετίζονται με τη γήρανση στα Τ κύτταρα μπορεί να συμβαίνουν στο επίπεδο του ενός κυττάρου, όπως διακοπή της σηματοδότησης μέσω του TCR και συνδιεγερτικών υποδοχέων, και σε επίπεδο κυτταρικών πληθυσμών. Οι αλλαγές αυτές αρχίζουν νωρίς στην ενήλικη ζωή με την εξασθένηση της λειτουργίας του θύμου και συνεχίζονται κατά τη διάρκεια της ζωής, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της ισορροπίας των Τ πληθυσμών εξαιτίας της μείωσης των παρθένων Τ κυττάρων, τη μείωση της ποικιλότητας των Τ κυττάρων και τη συσσώρευση μνημονικών Τ απαντήσεων έναντι σε εμμένουσες λοιμώξεις από παθογόνα, όπως ο CMV [213].

Η αντιγραφική γήρανση, από την άλλη πλευρά, αποτελεί ένα κυτταρικό πρόγραμμα που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων του ανθρώπου, προκαλώντας μη αναστρέψιμη αναστολή της ανάπτυξης και κρίσιμες αλλαγές στη λειτουργία των κυττάρων. Σχετίζεται άμεσα με τις διαδικασίες του ανοσιακού συστήματος, καθώς η κλωνική επέκταση είναι θεμελιώδης για τη δράση της επίκτητης ανοσίας. CD8 Τ κύτταρα που υπόκεινται σε επανειλημμένους κύκλους ενεργοποίησης, αναπόφευκτα φτάνουν στο στάδιο της αντιγραφικής εξάντλησης, που χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και μικρό μέγεθος τελομερών. Τα γηρασμένα Τ κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην απόπτωση, μόνιμη απώλεια της έκφρασης του CD28, διαταραγμένη παραγωγή κυτταροκινών, μειωμένη ικανότητα απάντησης στο στρες και ποικιλία αλλαγών στη λειτουργική τους ικανότητα [204]. Η διαδικασία αυτή έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει σε χρόνιες ιικές λοιμώξεις και χαρακτηρίζεται από σταδιακή παρεμπόδιση ή, όπως αναφέρεται, εξάντληση της δραστηρικής λειτουργίας και ικανότητας πολλαπλασιασμού των ειδικών CD8 Τ κυττάρων, μετά από συνεχή επαφή τους με το αντιγόνο που αναγνωρίζουν [211]. Καθώς φαίνεται η ίδια διαδικασία παρεμβάλλεται στην ανοσιακή επιτήρηση του όγκου, όπου, αντίστοιχα με τη χρόνια λοίμωξη, υπάρχει μακροχρόνια έκθεση των CTL στα καρκινικά αντιγόνα [214].

Από την σύγκριση της λειτουργικής ικανότητας στο σύνολο των pCTL υγιών μαρτύρων (N=10) και ασθενών (N=31) προέκυψε πως οι pCTL κλώνοι που προέρχονταν από τους ασθενείς εμφάνισαν σημαντικά μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και ένταση φθορισμού μετά από χρώση με πολυμερή (**Εικ. 21**). Η μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, που προκύπτει από το χαμηλότερο ποσοστό των πολυμερές⁺ κυττάρων στις θετικές μικροκαλλιέργειες των ασθενών, μπορεί να εξηγηθεί από τη διαδικασία της αντιγραφικής γήρανσης [204, 205]. Ένας ακόμη λόγος θα μπορούσε να είναι η

παρουσία Tregs σε μεγάλους αριθμούς σε ασθενείς με καρκίνο, τα οποία έχουν καθοριστική δράση στην παρεμπόδιση της λειτουργίας και του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων [215]. Ωστόσο, αυτό είναι μάλλον απίθανο, αφού σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων από τους ίδιους ασθενείς που εξετάστηκαν σε παράπλευρη μελέτη [178], ο αριθμός των CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ κυττάρων δεν διέφερε στις μικροκαλλιέργειες ασθενών και υγιών μαρτύρων.

Όσον αφορά την μεγαλύτερη ένταση της χρώσης με πολυμερή στις θετικές μικροκαλλιέργειες των μαρτύρων σε σύγκριση με τους ασθενείς, είναι πιθανό να αντιπροσωπεύει τη διαφορά στην κινητική των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στον TCR και τα σύμπλοκα των πολυμερών. Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από τον αριθμό των υποδοχέων που απαντώνται στην επιφάνεια του T κυττάρου και τη συνάφεια του συμπλόκου MHC-πεπτιδίου-TCR. Η ένταση της χρώσης με τα πολυμερή αντιπροσωπεύει τη σταθερότητα του συμπλόκου με τον TCR, συνδέεται με τη θερμοκρασία [216] και αυξάνεται με τον αριθμό των συνδέσεων [179, 217]. Μελετώντας τη συγγένεια του TCR προέκυψε, πως οι κλώνοι των υγιών μαρτύρων και των ασθενών που εξετάστηκαν διέθεταν TCR με παρόμοια συγγένεια για το ειδικό πεπτιδίο. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου που απαιτούνταν για να επιτευχθεί το 50% της μέγιστης λύσης ήταν παρόμοια για όλα τα δείγματα και κυμαίνονταν μεταξύ 3 και 12 nM, παρόμοια με δεδομένα που απαντώνται στη βιβλιογραφία [64, 65, 218]. 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 T κυττάρων στην περιφέρεια [219, 220], εξαλείφοντας ή καθιστώντας ανενεργά τα υψηλής συγγένειας CTL, επιτρέποντας τη διατήρηση των χαμηλότερης συγγένειας CTL. Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που αποκαλύπτουν πως η συνάφεια του συμπλόκου MHC-πεπτιδίου-TCR σχετίζεται άμεσα με τη δραστικότητα έναντι του όγκου, καθώς μόνο τα υψηλότερης συγγένειας CTL ήταν σε θέση να λύσουν ικανοποιητικά καρκινικά κύτταρα [218]. Είναι λοιπόν αναμενόμενο στους καρκινοπαθείς να παραμένουν στην κυκλοφορία μόνο χαμηλής συγγένειας αντιγονοειδικοί κλώνοι που εμφανίζουν περιορισμένη λειτουργική ικανότητα.

Την υπόθεση αυτή υποστηρίζουν και τα δεδομένα της λυτικής ικανότητας σε κλώνους ασθενών και υγιών δοτών. Όλα τα CTL ήταν ικανά να αναγνωρίσουν το ειδικό πεπτιδίο όταν παρουσιάζονταν από κύτταρα στόχους, όμως τα CTL που προέρχονταν από ασθενείς εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα να λύσουν καρκινικά κύτταρα που παρουσίαζαν το πεπτιδίο που αναγνωρίζουν, σε σχέση με τα CTL των υγιών. Η αναγνώριση ήταν δυνατή μόνο μετά από προσθήκη εξωγενούς πεπτιδίου, για το MAGE-A3.A2 πεπτιδίο, μολονότι τα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν εκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, γεγονός που εξηγείται για πεπτιδία που επεξεργάζονται λίγο ή καθόλου από τα καρκινικά κύτταρα [58, 177]. Οι προσπάθειες να προκληθεί η επεξεργασία και πα-

ρουσίαση των πεπτιδίων στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων με χρήση η IFN- γ δεν απέδωσαν. Εάν όμως το πεπτίδιο MAG-E-A3.A2 δεν επεξεργάζεται και δεν παρουσιάζεται ικανοποιητικά από τα καρκινικά κύτταρα πώς εξηγείται η αυξημένη παρουσία ειδικών CTL στους ασθενείς; Μία πιθανή εξήγηση είναι να γίνεται διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση για τα πεπτίδια αυτά από δενδριτικά κύτταρα, τα οποία προσλαμβάνουν τα αντιγόνα από αποπτωτικά καρκινικά κύτταρα και τα επεξεργάζονται μέσω του ανοσοπρωτεασώματος [221]. Εναλλακτικά, μπορεί να υποθεθεί πως το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του μπορεί να προσφέρει το κατάλληλο περιβάλλον κυτταροκινών, ώστε να προκαλέσει την επεξεργασία των αντιγόνων στα καρκινικά κύτταρα από το ανοσοπρωτεάσωμα [177], εξηγώντας εν μέρει γιατί υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για την ικανότητα των πεπτιδίων αυτών να παρουσιάζονται ή όχι από τα καρκινικά κύτταρα.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα του λειτουργικού χαρακτηρισμού συγκεντρωτικά μπορούμε να πούμε πως τα αντιγονοειδικά CTL που προέρχονται από ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα δράσης σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ισοδύναμά τους. Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται αντιφατικά αποτελέσματα. Η ομάδα των Lee et al. [222] παρατήρησε λειτουργική ανεπάρκεια των CTL έναντι της τυροσινάσης σε ασθενείς με μελάνωμα. Αντίθετα, σε άλλες εργασίες αναφέρεται ισχυρή *ex vivo* δραστηριότητα στην περιφέρεια [150, 223], όπου CCR7⁻CD8⁺ T κύτταρα έναντι του Melan-A.A2 που κυκλοφορούσαν στο αίμα εξέφραζαν IFN- γ μετά από διέγερση και εμφάνιζαν κυτταροτοξικότητα [223]. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με ευρήματα από TILs στην περιοχή του όγκου, όπου αντι-Melan-A.A2 CCR7⁻CD8⁺ T κύτταρα δεν ήταν ικανά να παράγουν IFN- γ μετά από σύντομη διέγερση, ενώ CTL έναντι του κυτταρομεγαλοϊού ήταν ικανά να διεγερθούν [223]. Τα δεδομένα αυτά ορίζουν μία κατάσταση επαγόμενης T κυτταρικής αδράνειας η οποία είναι αντιστρεπτή, περιορισμένη τοπικά και αντιγονοειδική, χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να λάβουμε υπόψη σχεδιάζοντας στρατηγικές ανοσοθεραπείας.

Καθώς φαίνεται, η ανοσιακή απάντηση σε ηλικιωμένους ασθενείς είναι αναποτελεσματική εξαιτίας, τόσο των ανοσοκατασταλτικών συνθηκών στην περιοχή του όγκου, αλλά και της υποβάθμισης που υφίστανται από τις διαδικασίες της ανοσογήρανσης και αντιγραφικής γήρανσης. Μαζί οι παράγοντες αυτοί θέτουν ένα μεγάλο εμπόδιο στις προσπάθειες ανοσοθεραπείας. Δίοδο στο αδιέξοδο αυτό μπορεί να δώσει ο επαναπρογραμματισμός της μνημονικής CTL απάντησης, μπλοκάροντας τους αρνητικούς παράγοντες ή η χρησιμοποίηση νέων, μη επηρεασμένων δραστικών και μνημονικών T κυττάρων για παθητική μεταφορά. Στο πλαίσιο αυτό προτάθηκε μία εναλλακτική πηγή CTL έναντι του όγκου για χρήση σε ACT. Σύμφωνα με τους εισηγητές, το αίμα ομφάλιου λώρου αποτελεί την ιδανική πηγή για την απομόνωση αντιγονοειδικών CTL, καθώς ειδικοί έναντι του όγκου κλώνοι πολλαπλών ειδικοτήτων βρίσκονται στο υλικό αυτό σε

μεγαλύτερη συχνότητα, έχουν εντυπωσιακή ικανότητα πολλαπλασιασμού και το πιο σημαντικό, δεν έχει επιδράσει σε αυτά κανένας κατασταλτικός παράγοντας, ούτε έχουν διαμορφωθεί παρουσία του όγκου [224]. Αντίθετα, αποτελούν μια ανέγγιχτη τράπεζα κυττάρων που περιμένει να αξιοποιηθεί. Βέβαια, η χρησιμότητά τους στην ανοσοθεραπεία δεν έχει δοκιμαστεί ακόμη, αποτελεί, όμως, μια αναμενόμενη με ενδιαφέρον και ελπιδοφόρα προοπτική.

5.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε στο πλαίσιο έλλειψης εμπειριστατωνμένων στοιχείων που αφορούν την έκταση και λειτουργικότητα της προϋπάρχουσας απάντησης έναντι αντιγόνων των πρωτεϊνών MAGΕ-Α3 και MAGΕ-Α1 σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα και την ύπαρξη απαντήσεων σε φυσιολογικά άτομα. Τα δεδομένα που προκύπτουν προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες, χρήσιμες στο σχεδιασμό ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν πως CTL απαντήσεις έναντι των αντιγόνων MAGΕ υπάρχουν τόσο σε άτομα χωρίς καρκίνο και ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Αποκαλύφθηκε πως οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα παρουσιάζουν μεγαλύτερη διακύμανση στη συχνότητα των αντιγονοειδικών pCTL και ότι η συχνότητα αυτή ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα πεπτίδια, επηρεάζοντας την καταλληλότητα χρήσης τους σε θεραπευτικά πρωτόκολλα. Συχνότερα παρατηρείται απάντηση έναντι του πεπτιδίου MAGΕ-Α3.Α2, λιγότερο συχνή είναι η απάντηση έναντι του MAGΕ-Α3.Α24, χαμηλή για το MAGΕ-Α3.Β35 και πρακτικά απύσα έναντι των MAGΕ-Α3.Α1, MAGΕ-Α1.Α1 και MAGΕ-Α1.Β35, θέτοντας ερωτηματικά ως προς την αξία των τελευταίων για χρήση τους στην ανοσοθεραπεία.

Εκτός από διαφορές στη συχνότητα, προέκυψε πως στους ασθενείς τα ειδικά pCTL παρουσιάζουν σημαντικές λειτουργικές διαφορές σε σύγκριση με αντίστοιχα pCTL υγιών δοτών, καθώς pCTL που προέρχονταν από ασθενείς εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, μικρότερη ικανότητα σύνδεσης με τα πολυμερή και μειωμένη λυτική ικανότητα. Επιπρόσθετα, τα ευρήματά μας σχετικά με την επίδραση της ακτινοχημειοθεραπείας θέτουν σε αμφισβήτηση την αναμενόμενη αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης χημειοανοσοθεραπείας. Σημαντικά στοιχεία προκύπτουν από την αδυναμία ανίχνευσης απαντήσεων στο σημείο του όγκου, τα οποία σε συνδυασμό με τη μειωμένη λειτουργικότητα των αντιγονοειδικών CTL στους ασθενείς με καρκίνο, δικαιολογούν την ανικανότητα των κυττάρων αυτών να ξεκινήσουν και να ολοκληρώσουν μία συντονισμένη ανοσιακή απάντηση που θα έχει σαν αποτέλεσμα την ανοσολογική απόρριψη του όγκου.

Μέχρι σήμερα, η ανοσοθεραπεία του καρκίνου, με όποια παραλλαγή και εάν δοκιμάστηκε, δεν έχει αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματική, ώστε να αποτελέσει εφαρμόσιμη θεραπευτική επιλογή έναντι του όγκου. Όμως, λαμβάνοντας υπόψη την αξιοσημείωτα χαμηλή τοξικότητα, ακόμη και σε ασθενείς που εμφάνισαν κλινική ανταπόκριση, θα ήταν ανεπίτρεπτο να εγκαταλειφθεί η προσπάθεια σε αυτό το στάδιο, χωρίς να προσπαθήσουμε να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς της αντίστασης του όγκου και να βρούμε τρόπους να την υπερκεράσουμε. Στην παρούσα εργασία τονίσαμε διαφορές μεταξύ των διαφορετικών πεπτιδίων, καθώς και διαφορές της CTL απάντησης ανάμεσα στους ασθενείς, παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανοσοθεραπείας. Επίσης, παρουσιάσαμε δεδομένα που ενισχύουν την άποψη πως τα χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου αποδίδονται, εν μέρει, στις διαδικασίες της ανοσογήρανσης και αντιγραφικής γήρανσης των T κυττάρων, οι οποίες καθιστούν την CD8 T απάντηση των ηλικιωμένων ασθενών ποσοτικά ανεπαρκή και λειτουργικά αδύναμη να διεκπεραιώσει μια αποτελεσματική έναντι του όγκου απάντηση. Η διέξοδος φαίνεται να βρίσκεται στην παράλληλη χρήση πολλαπλών και προσεκτικά επιλεγμένων αντιγόνων σε συνδυασμό με τη χρήση μη εκπαιδευμένων, λειτουργικά αποτελεσματικών T κυττάρων για ανοσοθεραπεία. Προς αυτήν την κατεύθυνση η απομόνωση CTL από νεαρά άτομα και ομφάλιο αίμα δημιουργεί νέες προοπτικές που πρέπει να εξερευνηθούν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

CD8 T κυτταρική απάντηση έναντι των αντιγόνων MAGE στον καρκίνο του πνεύμονα

Μαρία Ζαμανάκου

Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας

Τμήμα Ιατρικής – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(Διευθυντής: Καθ. Α.Ε. Γερμενής)

ΣΚΟΠΟΣ Στόχος της ανοσοθεραπείας του καρκίνου είναι η ενεργοποίηση της προϋπάρχουσας κυτταρολυτικής CD8+ T απάντησης έναντι αντιγόνων των όγκων με σκοπό την αναγνώριση και καταστροφή καρκινικών κυττάρων. Ενώ αυτό έχει επιτευχθεί σε ασθενείς με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, εντούτοις η μελέτη του φαινομένου σε πληθυσμιακό επίπεδο, καθώς και η μελέτη των χαρακτηριστικών αυτής της απάντησης με την αντίστοιχη φυσιολογικών ατόμων ίδιας ηλικίας, δεν έχει γίνει μέχρι τώρα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, κατά τη διάγνωση, το μέγεθος και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της προϋπάρχουσας κυτταρολυτικής CD8+ T απάντησης έναντι πεπτιδίων των δύο κυριότερων αντιγόνων των όγκων, MAGE-A1 και MAGE-A3, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανοσοθεραπεία και να συγκριθούν με τα αντίστοιχα CD8+ T κύτταρα που ενδεχομένως ανιχνεύονται σε υγιή άτομα.

ΥΛΙΚΟ Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 15 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και 10 με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα κατά τη διάγνωση της νόσου καθώς και από 15 υγιείς μάρτυρες, οι οποίοι έφεραν τουλάχιστον ένα από τα αλληλία HLA-A1, -A2, -A24 και/ή HLA-B35. Σε 16 από τους παραπάνω ασθενείς, περιφερικό αίμα συλλέχθηκε επίσης 3-6 μήνες μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας ή/και ακτινοθεραπείας. Επιπρόσθετα, από 11 από τους παραπάνω ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου, παρασκευάστηκε εναιώρημα κυττάρων του όγκου.

ΜΕΘΟΔΟΙ Η συχνότητα των ειδικών έναντι πεπτιδίων των αντιγόνων MAGE-A1 και MAGE-A3 κυτταρολυτικών CD8+ T κυττάρων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μία ευαίσθητη τεχνική που συνδυάζει αντιγονοειδική *in vitro* ενεργοποίηση υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης και ανίχνευση με κυτταρομετρία ροής, μέσω της τεχνολογίας των HLA-πολυμερών. Τα αντιγονοειδικά κύτταρα απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό και μελετήθηκε: (α) η ικανότητά τους να λύουν καρκινικά κύτταρα σεσημασμένα

με ^{51}Cr , (β) η συγγένεια του TcR τους ως προς το ειδικό πεπτιδίο με τη χρήση ^{51}Cr σεσημασμένων κυττάρων, (γ) η έκφραση των επιφανειακών μορίων διαφοροποίησης CD28, CD45RA, CD45RO και CCR7 με κυτταρομετρία ροής, (δ) η ικανότητά τους να εκκρίνουν IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ και TNF-α έπειτα από ειδική και μη ειδική πεπτιδική διέγερση, (ε) η έκφραση μεταγράφων του Bcl-2, και τέλος (ζ) η αλληλουχοποίηση της Vβ περιοχής του TCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Στο περιφερικό αίμα των ασθενών, κατά τη διάγνωση, ανιχνεύθηκε αυξημένη συχνότητα αντιγονοειδικών CD8+ T κυττάρων που αναγνωρίζουν πεπτιδία των πρωτεϊνών MAGE-A1 και MAGE-A3 ($13 \pm 20,5 \times 10^{-7}$) συγκριτικά με τη συχνότητα παρόμοιων κυττάρων στο αίμα υγιών ατόμων ($1,8 \pm 1 \times 10^{-7}$). Η συχνότητα αυτή, παρουσίαζε μεγαλύτερη διακύμανση στους ασθενείς και δεν επηρεάστηκε από το είδος της θεραπείας. Ανάμεσα στους ασθενείς, η συχνότερη απάντηση ήταν έναντι των πεπτιδίων MAGE-A3.A2 και MAGE-A3.A24 (36% και 44%, αντίστοιχα), ενώ ανάμεσα στους υγιείς, το 56% εμφάνισε απάντηση έναντι του πεπτιδίου MAGE-A3.A2. Αντίθετα, η απάντηση έναντι των MAGE-A3.A1, MAGE-A3.B35 και MAGE-A1 πεπτιδίων ήταν πρακτικά μη ανιχνεύσιμη. Οι ασθενείς με καρκίνο είχαν αντι-EBV CD8+ T κύτταρα στα ίδια επίπεδα με αυτά των φυσιολογικών ατόμων. Στα TILs των ασθενών, δεν ανιχνεύθηκε CD8+ T απάντηση έναντι πεπτιδίων των MAGE-A3 και MAGE-A1 παρά μόνο έναντι ιικών πεπτιδίων. Σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, τα αντιγονοειδικά CD8+ T κύτταρα των ασθενών, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μείωση της ικανότητάς τους να λύουν κύτταρα-στόχους ($p=0,013$), μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού ($p=0,041$) και μικρότερη ικανότητα σύνδεσης με τα HLA-πολυμερή ($p=0,038$). Όλα τα αντιγονοειδικά CD8+ T κύτταρα, ανεξαρτήτως προέλευσης, είχαν φαινότυπο μνημονικών κυττάρων (εκφράζοντας CD28, αλλά όχι CD57), εξέφραζαν Bcl-2 και εμφάνιζαν παρόμοια ικανότητα παραγωγής IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ και TNF-α, αλλά όχι IL-10.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Παρατηρήθηκε ότι, οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, παρουσιάζουν στο περιφερικό τους αίμα ευρύτατη διακύμανση στη συγκέντρωση αντιγονοειδικών CD8+ T κυττάρων με σημαντικές λειτουργικές διαφορές από τα αντίστοιχα των φυσιολογικών ατόμων. Τα χαρακτηριστικά αυτά (αριθμός και λειτουργία), θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχή έκβαση της ανοσοθεραπείας του καρκίνου και να εξηγήσουν τη μέχρι τώρα χαμηλή ανταπόκριση των ασθενών σε πρωτόκολλα εμβολιασμών.

ABSTRACT

CD8 cytolytic T cell response against MAGE-A3 and MAGE-A1 in lung cancer

Maria Zamanakou

Department of Immunology - Histocompatibility

School of Medicine – University of Thessaly

(Director: Prof. A.E. Germenis)

OBJECTIVE The aim of cancer immunotherapy is to stimulate pre-existing anti-tumour specific CD8+ T cells, in order to recognise and destroy the cancer. Although such destruction has been described for a limited number of patients, the study of the interplayers of such an effect has never taken place in conjunction with normal individuals. This study was scheduled in order to determine in patients with lung cancer the magnitude and function of the pre-existing, naturally occurring cytolytic CD8+ T-cell responses against peptides of the most widely used cancer-testis antigens in cancer immunotherapy, namely MAGE-A1 and MAGE-A3 and compare these findings with those that might be unravelled in aged-matched healthy individuals.

MATERIALS Peripheral blood mononuclear cells were collected from 15 patients with non-small cell lung carcinoma and 10 patients with small cell lung carcinoma upon diagnosis and 15 aged matched healthy individuals, expressing at least one of the HLA-A1, -A2, -A24 and/or HLA-B35 alleles. In 16 of the patients, cells were also collected 3-6 months post treatment with chemotherapy and/or radiotherapy. Finally, in 11 patients that underwent surgery for removal of their tumour, tumor infiltrating lymphocytes and tumor tissue were collected.

METHODS The frequency of peptide-specific T cells 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. Amplified T cells were magnetically sorted and used to: (a) characterise their ability to lyse chromium labelled cells expressing the relevant antigens, (b) determine their TCR affinity against peptide loaded chromium labelled cells, (c) identify the expression of the differentiation molecules CD28, CD45RA, CD45RO and CCR7 by flow cytometry, (d) determine their ability to secrete IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ and TNF- α after peptide specific stimulation, (e) determine the expression of Bcl-2 transcripts, and finally (f) determine the TcR V β sequence.

RESULTS Anti-MAGE CD8 T cells were detected in the blood of both healthy individuals and lung cancer patients upon diagnosis. The cumulative frequency of circulating peptide-specific T cells was found to be higher in cancer patients ($13 \pm 20.5 \times 10^{-7}$) than normal individuals ($1.8 \pm 1 \times 10^{-7}$), varied widely amongst patients and was not affected by radiotherapy and/or chemotherapy. Amongst patients, the most frequent responses were those detected against MAGE-A3.A2 and MAGE-A3.A24 (36% και 44%, respectively), whereas 56% of normal individuals responded against the MAGE-A3.A2 peptide. T cell responses against the other peptides were limited in both groups. Patients had similar numbers of anti-EBV T cells as did normal individuals. In none of the tumor infiltrating lymphocyte samples was an anti-MAGE T cell response detected despite the identification of anti-EBV T cells. Compared to normal individuals, CD8 T cells from patients presented with a reduced ability to lyse targets ($p=0.013$), proliferate to antigenic stimuli ($p=0.041$) and to bind the peptide-MHC complex with a high affinity ($p=0.038$). All anti-tumour specific T cells, irrespective of their origin, displayed a memory phenotype (CD28+/CD57-), expressed Bcl-2 and secreted IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ and TNF- α but not IL-10.

CONCLUSION This 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. Furthermore, tumor-specific pCTLs of cancer patients present with functional differences when compared to those of healthy individuals. In the light of recent evidence, both of these findings (number and function) might have played a detrimental role in the limited success of current immunotherapy protocols and could represent an important determinant for the fate of cancer immunotherapy. Thus, improving our understanding as to what affects these parameters, promises to have a significant impact on the design of future cancer immunotherapy protocols.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 DAVIS ID, JEFFORD M, PARENTE P, CEBON J. Rational approaches to human cancer immunotherapy *J Leukoc Biol* 2003, 73:3-29
- 2 ZIMMERMANN SV, BENIGNI F, MONDINO A. Immune surveillance and anti-tumor immune responses: an anatomical perspective *Immunology Letters* 2005, 98:1-8
- 3 DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H, OLD LJ, SCHREIBER RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape *Nat. Immunol* 2002, 3:991-998
- 4 DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting *Immunity* 2004, 21:137-148
- 5 MOCELLIN S, MANDRUZZATO S, ZANOVELLO P, BRONTE V. Cancer rejection by the immune system: Forcing the check-points of tumor immune escape *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2005, 2: 191-197
- 6 CASTELLI C, DALERBA P, CASATI C, NOVELINO L, PARMIANI G, FILIPPO DE A. Immune mechanisms in neoplasia *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004, 1:375-381
- 7 SMYTH MJ, GODFREY DI, TRAPANI JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy *Nat Immunol* 2001, 2:293-299
- 8 HARTY JT, TVINNEREIM AR, WHITE DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection *Annu Rev Immunol* 2000, 18:275-308
- 9 SCHREIBER H. Tumor immunology in *Fundamental Immunology*, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 1557-1592
- 10 ROSENBERG SA, YANG CJ, RESTIFO PN. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines *Nat Med* 2004, 10:909-915
- 11 DUDLEY ME, ROSENBERG SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer *Nat Rev Cancer* 2003, 3:666-675
- 12 GORDAN JD, VONDERHEIDE RH. Universal tumor antigens as targets for immuno therapy *Cytotherapy* 2002, 4:317-327
- 13 KARANIKAS V, GERMENIS A. Tumor specific CD8+ T cells in patients with lung cancer and healthy individuals *J BUON* 2009, 14(Suppl 1):S153-157
- 14 PASCHEN A, EICHMULLER S, SCHADENDORF D. Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53:196-203
- 15 NOVELINO L, CASTELLI C, PARMIANI G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:187-207
- 16 BOURGAULT VILLADA I, BÉNÉTON N, BONY C, CONNAN F, MONSONEGO J, BIANCHI A, SAIAG P, LÉVY JP, GUILLET JG, CHOPPIN J. Identification in humans of HPV-16 E6 and E7 protein epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B18 and determination of the HLA-B18-specific binding motif *Eur J Immunol* 2000, 30:2281-2289
- 17 KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, DELGADO CH, ROBBINS PF, RIVOLTINI L, TOPALIAN SL, MIKI T, ROSENBERG SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:3515-3519
- 18 BAKKER AB, SCHREURS MW, DE BOER AJ, KAWAKAMI Y, ROSENBERG SA, ADEMA GJ, FIGDOR CG. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes *J Exp Med* 1994, 179:1005-1009
- 19 BRICHARD V, VAN PEL A, WOLFEL T, WOLFEL C, DE PLAEN E, LETHE B, COULIE P, BOON T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas *J Exp Med* 1993, 178:489-495
- 20 WANG RF, APPELLA E, KAWAKAMI Y, KANG X, ROSENBERG SA. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes *J Exp Med* 1996, 184:2207-2216
- 21 VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, VAN DEN EYNDE B, KNUTH A, BOON T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma *Science* 1991, 254:1643-1647
- 22 BOEL P, WILDMANN C, SENSI ML, BRASSEUR R, RENAULD JC, COULIE P, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes *Immunity* 1995, 2:167-175

- 23 VAN DEN EYNDE B, PEETERS O, DE BACKER O, GAUGLER B, LUCAS S, BOON T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma *J Exp Med* 1995, 182:689-698
- 24 LUPETTI R, PISARRA P, VERRECCHIA A, FARINA C, NICOLINI G, ANICHINI A, BORDIGNON C, SENSI M, PARMIANI G, TRAVERSARI C. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage *J Exp Med* 1998, 188:1005-1016
- 25 WOLFEL T, HAUER M, SCHNEIDER J, SERRANO M, WOLFEL C, KLEHMANN- HIEB E, DE PLAEN E, HANKELN T, MEYER ZUM BUSCHENFELDE KH, BEACH D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma *Science* 1995, 269:1281-1284
- 26 COULIE PG, LEHMANN F, LETHE B, HERMAN J, LURQUIN C, ANDRAWISS M, BOON T. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:7976-7980
- 27 ROBBINS PF, EL-GAMIL M, LI YF, KAWAKAMI Y, LOFTUS D, APPELLA E, ROSENBERG SA. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes *J Exp Med* 1996, 183:1185-1192
- 28 MANDRUZZATO S, BRASSEUR F, ANDRY G, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma *J Exp Med* 1997, 186:785-793
- 29 DOMENECH N, HENDERSON RA, FINN OJ. Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin *J Immunol* 1995, 155:4766-4774
- 30 TSANG KY, ZAREMBA S, NIERODA CA, ZHU MZ, HAMILTON JM, SCHLOM J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:982-990
- 31 VONDERHEIDE RH, HAHN WC, SCHULTZE JL, NADLER LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumorassociated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes *Immunity* 1999, 10:673-679
- 32 SCHMITZ M, DIESTELKOETTER P, WEIGLE B, SCHMACHTENBERG F, STEVANOVIC S, OCKERT D, RAMMENSEE HG, RIEBER EP. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides *Cancer Res* 2000, 60:4845-1849
- 33 RAMMENSEE HG, FALK K, ROTZSCHKE O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 1993, 5:35-44
- 34 CELIS E, TSAI V, CRIMI C, DEMARS R, WENTWORTH PA, CHESNUT RW, GREY HM, SETTE A, SERRA HM. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitope *Proc Natl Acad Sci* 1994, 91:2105-2109
- 35 WEINSCHENK T, GOUTTEFANGEAS C, SCHIRLE M, OBERMAYR F, WALTER S, SCHOOR O, KUREK R, LOESER W, BICHLER KH, WERNET D, STEVANOVIC S, RAMMENSEE HG. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines *Cancer Res* 2002, 62:5818-5827
- 36 ROMERO P, CEROTTINI JC, SPEISER DE. Monitoring tumor antigen specific T- cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53:249-255
- 37 SCHULTZE JL, MAECKER B, VON BERGWELT-BAILDON MS, ANDERSON KS, VONDERHEIDE RH. Tumour immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens *Vox Sang* 2001, 80:81-89
- 38 SCANLAN MJ, GURE AO, JUNGBLUTH AA, OLD LJ, CHEN YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy *Immunol Rev* 2002, 188:22-32
- 39 SCANLAN MJ, SIMPSON AJ, OLD LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary *Cancer Immunol* 2004, 4:1
- 40 STOCKERT E, JAGER E, CHEN YT, SCANLAN MJ, GOUT I, KARBACH J, ARAND M, KNUTH A, OLD LJ. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens *J Exp Med* 1998, 187:1349-1354

- 41 AYYOUB M, STEVANOVIC S, SAHIN U, GUILLAUME P, SERVIS C, RIMOLDI D, VALMORI D, ROMERO P, CEROTTINI JC, RAMMENSEE HG, PFREUNDSCHUH M, SPEISER D, LEVY F. Proteasome-assisted identification of a S5X-2-derived epitope recognized by tumor-reactive CTL infiltrating metastatic melanoma *J Immunol* 2002, 168:1717-1722
- 42 JAGER E, NAGATA Y, GNJATIC S, WADA H, STOCKERT E, KARBACH J, DUNBAR PR, LEE SY, JUNGBLUTH A, JAGER D, ARAND M, RITTER G, CERUNDOLO V, DUPONT B, CHEN YT, OLD LJ, KNUTH A. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:4760-4765
- 43 JÄGER E, KARBACH J, GNJATIC S, NEUMANN A, BENDER A, VALMORI D, AYYOUB M, RITTER E, RITTER G, JÄGER D, PANICALI D, HOFFMAN E, PAN L, OETTGEN H, OLD LJ, KNUTH A. Recombinant vaccinia / fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14453–14458
- 44 MARCHAND M, VAN BAREN N, WEYNANTS P, BRICHARD V, DRÉNO B, TESSIER MH, RANKIN E, PARMIANI G, ARIENTI F, HUMBLET Y, BOURLOND A, VANWIJCK R, LIÉNARD D, BEAUDUIN M, DIETRICH PY, RUSSO V, KERGER J, MASUCCI G, JÄGER E, DE GREVE J, ATZPODIEN J, BRASSEUR F, COULIE PG, VAN DER BRUGGEN P, BOON T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1 *Int J Cancer* 1999, 80: 219–230
- 45 SIMPSON AJ, CABALLERO OL, JUNGBLUTH A, CHEN YT, OLD LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer *Nat Rev Cancer* 2005, 5:615-625
- 46 CHOMEZ P, DE BACKER O, BERTRAND M, DE PLAEN E, BOON T, LUCAS S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family *Cancer Res* 2001, 61:5544–5551
- 47 CABALLERO O, CHEN YT. Cancer/ testis (CT) antigens: Potential targets for immuno-therapy *Cancer Sci* 2009, 100:2014-2021
- 48 DE SMET C, DE BACKER O, FARAONI I, LURQUIN C, BRASSEUR F, BOON T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:7149–7153
- 49 YANG B, O'HERRIN SM, WU J, REAGAN-SHAW S, MA Y, BHAT KM, GRAVEKAMP C, SETALURI V, PETERS N, HOFFMANN FM, PENG H, IVANOV AV, SIMPSON AJ, LONGLEY BJ. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines *Cancer Res* 2007, 67: 9954–9962
- 50 LADURON S, DEPLUS R, ZHOU S, Kholmanskikh O, GODELAINE D, DE SMET C, HAYWARD SD, FUKS F, BOON T, DE PLAEN E. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription *Nucleic Acids Res* 2004, 32:4340-4350
- 51 DUAN Z, DUAN Y, LAMENDOLA DE, YUSUF RZ, NAEEM R, PENSON RT, SEIDEN MV. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines *Clin Cancer Res* 2003, 9:2778-2785
- 52 BERTRAM J, PALFNER K, HIDDEMANN W, KNEBA M. Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression *Anticancer Drugs* 1998, 9:311-317
- 53 PARK JH, KONG GH, LEE SW. hMAGE-A1 overexpression reduces TNF- alpha cytotoxicity in ME-180 cells *Mol Cells* 2002, 14:122-129
- 54 GRAFF-DUBOIS S, FAURE O, GROSS DA, ALVES P, SCARDINO A, CHOUAIB S, LEMONNIER FA, KOSMATOPOULOS K. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy *J Immunol* 2002, 169:575-580
- 55 WEYNANTS P, LETHÉ B, BRASSEUR F, MARCHAND M, BOON T. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas *Int J Cancer* 1994, 56:826-829
- 56 LI J, YANG Y, FUJIE T, BABA K, UEO H, MORI M, AKIYOSHI T. Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma *Clin Cancer Res* 1996, 2:1619-1625

- 57 BRASSEUR F, MARCHAND M, VANWIJCK R, HÉRIN M, LETHÉ B, CHOMEZ P, BOON T. Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors *Int J Cancer* 1992, 52:839-841
- 58 VAN DER BRUGGEN P, BASTIN J, GAJEWSKI T, COULIE PG, BOËL P, DE SMET C, TRAVERSARI C, TOWNSEND A, BOON T. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3 *Eur J Immunol* 1994, 24:3038-3043
- 59 <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>
- 60 TAKAHASHI K., SHICHIJO S, NOGUCHI M, HIROHATA M, ITOH K. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis *Cancer Res* 1995, 55:3478-3482
- 61 UYTENHOVE C, GODFRAIND C, LETHE B, AMAR-COSTESECC A, RENAULD JC, GAJEWSKI TF, DUFFOUR T, WARNIER G, BOON T, VAN DEN EYNDE BJ. The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen *Int J Cancer* 1997, 70:349-356
- 62 VAN DEN EYNDE B, VAN DER BRUGGEN P. Peptide database of T cell defined tumor antigens *Cancer Immunity* 2001
- 63 HÉRIN M, LEMOINE C, WEYNANTS P, VESSIÈRE F, VAN PEL A, KNUTH A, DEVOS R, BOON T. Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma *Int J Cancer* 1987, 39:390-396
- 64 TRAVERSARI C, VAN DER BRUGGEN P, LUESCHER IF, LURQUIN C, CHOMEZ P, VAN PEL A, DE PLAEN E, AMAR-COSTESECC A, BOON T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E *J Exp Med* 1992, 176:1453-1457
- 65 OTTAVIANI S, ZHANG Y, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:1214-220
- 66 PASCOLO S, SCHIRLE M, GUCKEL B, DUMRESE T, STUMM S, KAYSER S, MORIS A, WALLWIENER D, RAMMENSEE H-G, STEVANOVIC S. A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry *Cancer Res* 2001, 61:4072-4077
- 67 CHAUX P, LUITEN R, DEMOTTE N, VANTOMME V, STROOBANT V, TRAVERSARI C, RUSSO V, SCHULTZ E, CORNELIS GR, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1 *J Immunol* 1999, 163:2928-2936
- 68 LUITEN R, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-A1 peptide is recognized on HLA-B7 human tumors by cytolytic T lymphocytes *Tissue Antigens* 2000, 55:149-152
- 69 LUITEN RM, DEMOTTE N, TINE J, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-A1 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by both HLA-B35 and HLA-A1 molecules *Tissue Antigens* 2000, 56:77-81
- 70 TANZARELLA S, RUSSO V, LIONELLO I, DALERBA P, RIGATTI D, BORDIGNON C, TRAVERSARI C. Identification of a promiscuous T cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family *Cancer Res* 1999, 59:2668-2674
- 71 CORBIÈRE V, NICOLAY H, RUSSO V, STROOBANT V, BRICHARD V, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. Identification of a MAGE-1 peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-B*5701 tumors *Tissue Antigens* 2004, 63:453-457
- 72 VAN DER BRUGGEN P, SZIKORA JP, BOEL P, WILDMANN C, SOMVILLE M, SENSI M, BOON T. Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonapeptide on melanomas expressing HLA-Cw*1601 *Eur J Immunol* 1994, 24:2134-2140
- 73 WANG HY, LEE DA, PENG G, GUO Z, LI Y, KINIWA Y, SHEVACH EM, WANG RF. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy *Immunity* 2004, 20:107-118
- 74 CHAUX P, VANTOMME V, STROOBANT V, THIELEMANS K, CORTHALS J, LUITEN R, EGGERMONT AM, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes *J Exp Med* 1999, 189:767-778

- 75 CHAUX P, LETHÉ B, VAN SNICK J, CORTHALS J, SCHULTZ ES, CAMBIASO CL, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-1 peptide recognized on HLA-DR15 by CD4+ T cells *Eur J Immunol* 2001, 31:1910-1916
- 76 MARSH SGE, PARHAM P, BARBER LD. The HLA Factsbook for HLA-A, B, C, and DR Academic Press 2000
- 77 COLOMBANI J. HLA, Fonctions immunitaires et applications médicales John Libbey Eurotext 1993
- 78 GAUGLER B, VAN DEN EYNDE B, VAN DER BRUGGEN P, ROMERO P, GAFORIO JJ, DE PLAEN E, LETHE B, BRASSEUR F, BOON T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes *J Exp Med* 1994, 179:921-930
- 79 KAWASHIMA I, HUDSON SJ, TSAI V, SOUTHWOOD S, TAKESAKO K, APPELLA E, SETTE A, CELIS E. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors *Hum Immunol* 1998, 59:1-14
- 80 OISO M, EURA M, KATSURA F, TAKIGUCHI M, SOBAO Y, MASUYAMA K, NAKASHIMA M, ITOH K, ISHIKAWA T. A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes *Int J Cancer* 1999, 81:387-394
- 81 MIYAGAWA N, KONO K, MIMURA K, OMATA H, SUGAI H, FUJII H. A newly identified MAGE-3-derived, HLA-A24-restricted peptide is naturally processed and presented as a CTL epitope on MAGE-3-expressing gastrointestinal cancer cells *Oncology* 2006, 70:54-62
- 82 BILSBOROUGH J, PANICHELLI C, DUFFOUR MT, WARNIER G, LURQUIN C, SCHULTZ ES, THIELEMANS K, CORTHALS J, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-3 peptide presented by HLA-B44 is also recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-B18 *Tissue Antigens* 2002, 60:16-24
- 83 SCHULTZ ES, ZHANG Y, KNOWLES R, TINE J, TRAVERSARI C, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes *Tissue Antigens* 2001, 57:103-109
- 84 SCHULTZ ES, CHAPIRO J, LURQUIN C, CLAVEROL S, BURLET-SCHILTZ O, WARNIER G, RUSSO V, MOREL S, LEVY F, BOON T, VAN DEN EYNDE BJ, VAN DER BRUGGEN P. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome *J Exp Med* 2002, 195:391-399
- 85 HERMAN J, VAN DER BRUGGEN P, LUESCHER IF, MANDRUZZATO S, ROMERO P, THONNARD J, FLEISCHHAUER K, BOON T, COULIE PG. A peptide encoded by the human gene MAGE-3 and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3 *Immunogenetics* 1996, 43:377-383
- 86 RUSSO V, TANZARELLA S, DALERBA P, RIGATTI D, ROVERE P, VILLA A, BORDIGNON C, TRAVERSARI C. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:2185-2190
- 87 BRECKPOT K, HEIRMAN C, DE GREEF C, VAN DER BRUGGEN P, THIELEMANS K. Identification of new antigenic peptide presented by HLA-Cw7 and encoded by several MAGE genes using dendritic cells transduced with lentiviruses *J Immunol* 2004, 172:2232-2237
- 88 SCHULTZ ES, LETHE B, CAMBIASO CL, VAN SNICK J, CHAUX P, CORTHALS J, HEIRMAN C, THIELEMANS K, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes *Cancer Res* 2000, 60:6272-6275
- 89 SCHULTZ ES, SCHULER-THURNER B, STROOBANT V, JENNE L, BERGER TG, THIELEMANS K, VAN DER BRUGGEN P, SCHULER G. Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell- based immunotherapy *J Immunol* 2004, 172:1304-1310
- 90 ZHANG Y, CHAUX P, STROOBANT V, EGGERMONT AM, CORTHALS J, MAILLERE B, THIELEMANS K, MARCHAND M, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4+ T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein *J Immunol* 2003, 171:219-225
- 91 KOBAYASHI H, SONG Y, HOON DS, APPELLA E, CELIS E. Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various major histocompatibility complex class II alleles *Cancer Res* 2001, 61:4773-4778

- 92 CONSOGNO G, MANICI S, FACCHINETTI V, BACHI A, HAMMER J, CONTI-FINE BM, RUGARLI C, TRAVERSARI C, PROTTI MP. Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3 *Blood* 2003, 101:1038-1044
- 93 MANICI S, STURNIOLO T, IMRO MA, HAMMER J, SINIGAGLIA F, NOPPEN C, SPAGNOLI G, MAZZI B, BELLONE M, DELLABONA P, PROTTI MP. Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11 *J Exp Med* 1999, 189:871-876
- 94 SALGALLER ML, WEBER JS, KOENIG S, YANNELLI JR, ROSENBERG SA. Generation of specific anti-melanoma reactivity by stimulation of human tumor-infiltrating lymphocytes with MAGE-1 synthetic peptide *Cancer Immunol Immunother* 1994, 39:105-116
- 95 VALMORI D, LIÉNARD D, WAANDERS G, RIMOLDI D, CEROTTINI JC, ROMERO P. Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patient *Cancer Res* 1997, 57:735-741
- 96 ZHANG HG, CHEN HS, PENG JR, SHANG XY, ZHANG J, XING Q, PANG XW, QIN LL, FEI R, MEI MH, LENG XS, CHEN WF. 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
- 97 ZERBINI A, PILLI M, SOLIANI P, ZIEGLER S, PELOSI G, ORLANDINI A, CAVALLO C, UGGERI J, SCANDROGLIO R, CRAFA P, SPAGNOLI GC, FERRARI C, MISSALE G. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma *J Hepatol* 2004, 40:102-109
- 98 FUJIE T, TANAKA F, MORI M, TAKESAKO K, SUGIMACHI K, AKIYOSHI T. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes from the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients using HLA-A2-restricted MAGE-3 peptide *in vitro Clin Cancer Res* 1997, 3:2425-2430
- 99 GODELAINE D, CARRASCO J, LUCAS S, KARANIKAS V, SCHULER-THURNER B, COULIE PG, SCHULER G, BOON T, VAN PEL A. Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide *J Immunol* 2003, 171:4893-4897
- 100 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 U S A* 2004, 101 Suppl 2:14631-14638
- 101 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
- 102 NAGORSEN D, SCHEIBENBOGEN C, MARINCOLA FM, LETSCH A, KEILHOLZ U. Natural T cell immunity against cancer *Clin Cancer Res* 2003, 9:4296-4303
- 103 SCHEIBENBOGEN C, LEE KH, STEVANOVIC S, WITZENS M, WILLHAUCK M, WALDMANN V, NAEHER H, RAMMENSEE HG, KEILHOLZ U. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN- γ -ELISPOT assay *Int J Cancer* 1997, 71: 932-936
- 104 GRIFFIOEN M, BORCHI M, SCHRIER PI, OSANTO S. Detection and quantification of CD8 T cells specific for HLA-A*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN- γ -ELISPOT assay *Int. J. Cancer* 2001, 93: 549-555
- 105 DHODAPKAR MV, YOUNG JW, CHAPMAN PB, COX WI, FONTENEAU JF, AMIGORENA S, HOUGHTON AN, STEINMAN RM, BHARDWAJ N. Paucity of functional T cell memory to melanoma antigens in healthy donors and melanoma patients *Clin Cancer Res* 2000, 6: 4831-4838
- 106 TANAKA F, FUJIE T, GO H, BABA K, MON M, TAKESAKO K, AKIYOSHI T. Efficient induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes from a healthy donor using HLA-A2-restricted MAGE-3 peptide *in vitro Cancer Immunol Immunother* 1997, 44: 21-26
- 107 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
- 108 REYNOLDS SR, ORATZ R, SHAPIRO RL, HAO P, YUN Z, FOTINO M, VUKMANOVIĆ S, BYSTRYN JC. Stimulation of CD8+ T cell responses to MAGE-3 and Melan A/MART-1 by immunization to a polyvalent melanoma vaccine *Int J Cancer* 1997, 72:972-976

- 109 GAJEWSKI TF, FALLARINO F, ASHIKARI A, SHERMAN M. Immunization of HLA-A2⁺ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12 *Clin Cancer Res* 2001 , 7(Supl):895s-901s
- 110 WEBER JS, HUA FL, SPEARS L, MARTY V, KUNIYOSHI C, CELIS E. A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma *J Immunother* 1999, 22:431-440
- 111 BOON T, COULIE PG, VAN DEN EYNDE BJ, VAN DER BRUGGEN P. Human T cell responses against melanoma *Annu Rev Immunol* 2006, 24:175-208
- 112 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 U S A* 2001, 98:10290-10295
- 113 MARCHAND M, PUNT CJ, AAMDAL S, ESCUDIER B, KRUIT WH, KEILHOLZ U, HÅKANSSON L, VAN BAREN N, HUMBLET Y, MULDER P, AVRIL MF, EGGERMONT AM, SCHEIBENBOGEN C, UITERS J, WANDERS J, DELIRE M, BOON T, STOTER G. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report *Eur J Cancer* 2003, 39:70-77
- 114 KRUIT WH, VAN OJIK HH, BRICHARD VG, ESCUDIER B, DORVAL T, DRÉNO B, PATEL P, VAN BAREN N, AVRIL MF, PIPERNO S, KHAMMARI A, STAS M, RITTER G, LETHÉ B, GODELAINE D, BRASSEUR F, ZHANG Y, VAN DER BRUGGEN P, BOON T, EGGERMONT AM, MARCHAND M. Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma *Int J Cancer* 2005, 117:596-604
- 115 VAN BAREN N, BONNET MC, DRÉNO B, KHAMMARI A, DORVAL T, PIPERNO-NEUMANN S, LIÉNARD D, SPEISER D, MARCHAND M, BRICHARD VG, ESCUDIER B, NÉGRIER S, DIETRICH PY, MARANINCHI D, OSANTO S, MEYER RG, RITTER G, MOINGEON P, TARTAGLIA J, VAN DER BRUGGEN P, COULIE PG, BOON T. Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells *J Clin Oncol* 2005, 23:9008-9021
- 116 THURNER B, HAENDLE I, RÖDER C, DIECKMANN D, KEIKAVOUSSI P, JONULEIT H, BENDER A, MACZEK C, SCHREINER D, VON DEN DRIESCH P, BRÖCKER EB, STEINMAN RM, ENK A, KÄMPGEN E, SCHULER G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma *J Exp Med* 1999, 190:1669-1678
- 117 MACKENSEN A, HERBST B, CHEN JL, KÖHLER G, NOPPEN C, HERR W, SPAGNOLI GC, CERUNDOLO V, LINDEMANN A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells *Int J Cancer* 2000, 86:385-392
- 118 TOUNGOUZ M, LIBIN M, BULTÉ F, FAID L, LEHMANN F, DURIAU D, LAPORTE M, GANGJI D, BRUYNS C, LAMBERMONT M, GOLDMAN M, VELU T. Transient expansion of peptide-specific lymphocytes producing IFN-gamma after vaccination with dendritic cells pulsed with MAGE peptides in patients with mage-A1/A3-positive tumors *J Leukoc Biol* 2001, 69:937-943
- 119 BANCHEREAU J, PALUCKA AK, DHODAPKAR M, BURKEHOLDER S, TAQUET N, ROLLAND A, TAQUET S, COQUERY S, WITTKOWSKI KM, BHARDWAJ N, PINEIRO L, STEINMAN R, FAY J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine *Cancer Res* 2001, 61:6451-6458
- 120 DHODAPKAR MV, STEINMAN RM, SAPP M, DESAI H, FOSSELLA C, KRASOVSKY J, DONAHOE SM, DUNBAR PR, CERUNDOLO V, NIXON DF, BHARDWAJ N. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells *J Clin Invest* 1999, 104:173-180
- 121 PACZESNY S, BANCHEREAU J, WITTKOWSKI KM, SARACINO G, FAY J, PALUCKA AK. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8⁺ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells *J Exp Med* 2004, 199:1503-1511
- 122 CARRASCO J, VAN PEL A, NEYNS B, LETHÉ B, BRASSEUR F, RENKVIST N, VAN DER BRUGGEN P, VAN BAREN N, PAULUS R, THIELEMANS K, BOON T, GODELAINE D. Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells *J Immunol* 2008, 180:3585-3593

- 123 SADANAGA N, NAGASHIMA H, MASHINO K, TAHARA K, YAMAGUCHI H, OHTA M, FUJIE T, TANAKA F, INOUE H, TAKESAKO K, AKIYOSHI T, MORI M. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas *Clin Cancer Res* 2001, 7:2277-2284
- 124 SAROBE P, FEIJÓ E, ALFARO C, MAZZOLINI G, MELERO I. MAGE antigens: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma? *J Hepatol* 2004, 40:155-158
- 125 TAJIMA K, OBATA Y, TAMAKI H, YOSHIDA M, CHEN YT, SCANLAN MJ, OLD LJ, KUWANO H, TAKAHASHI T, TAKAHASHI T, MITSUDOMI T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer *Lung Cancer* 2003, 42:23-33
- 126 GROEPER C, GAMBAZZI F, ZAJAC P, BUBENDORF L, ADAMINA M, ROSENTHAL R, ZERKOWSKI HR, HEBERER M, SPAGNOLI GC. Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer *Int J Cancer* 2007, 120:337-343
- 127 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
- 128 BOLLI M, KOCHER T, ADAMINA M, GULLER U, DALQUEN P, HAAS P, MIRLACHER M, GAMBAZZI F, HARDER F, HEBERER M, SAUTER G, SPAGNOLI GC. Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma *Ann Surg* 2002, 236:785-793
- 129 Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer *Clin Cancer Res* 2005, 11:8055-8062
- 130 SCHILLER JH, HARRINGTON D, BELANI CP, LANGER C, SANDLER A, KROOK J, ZHU J, JOHNSON DH. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer *N Engl J Med* 2002, 346:92-98
- 131 MOUNTAIN CF. Staging classification of lung cancer. A critical evaluation *Clin Chest Med* 2002, 23:103-121
- 132 HIRSCHOWITZ EA, HIESTAND DM, YANNELLI JR. Vaccines for lung cancer *J Thorac Oncol* 2006, 1:93-104
- 133 YASUMOTO K, HANAGIRI T, TAKENOYAMA M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer *Gen Thorac Cardio-vasc Surg* 2009, 57:449-457
- 134 SUGAYA M, TAKENOYAMA M, OSAKI T, YASUDA M, NAGASHIMA A, SUGIO K, YASUMOTO K. Establishment of 15 cancer cell lines from patients with lung cancer and the potential tools for immunotherapy *Chest* 2002, 122:282-288
- 135 HIRAOKA K, MIYAMOTO M, CHO Y, SUZUOKI M, OSHIKIRI T, NAKAKUBO Y, ITOH T, OHBUCHI T, KONDO S, KATOH H. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma *Br J Cancer* 2006, 94:275-280
- 136 KARANIKAS V, COLAU D, BAURAIN JF, CHIARI R, THONNARD J, GUTIERREZ-ROELENIS I, GOFFINET C, VAN SCHAFTINGEN EV, WEYNANTS P, BOON T, COULIE PG. High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival *Cancer Res* 2001, 6:3718-3724
- 137 MAMI-CHOUAIB F, ECHCHAKIR H, DOROTHÉE G, VERGNON I, CHOUAIB S. Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen *Immunol Rev* 2002, 188:114-121
- 138 SUGAYA M, TAKENOYAMA M, SHIGEMATSU Y, BABA T, FUKUYAMA T, NAGATA Y, MIZUKAMI M, SO T, ICHIKI Y, YASUDA M, SO T, HANAGIRI T, SUGIO K, YASUMOTO K. Identification of HLA-A24 restricted shared antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes from a patient with large cell carcinoma of the lung *Int J Cancer* 2007, 120:1055-1062
- 139 YASUMOTO K, HANAGIRI T, TAKENOYAMA M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer *Gen Thorac Cardio-vasc Surg* 2009, 57:449-457

- 140 ATANACKOVIC D, ALTORKI NK, STOCKERT E, WILLIAMSON B, JUNGBLUTH AA, RITTER E, SANTIAGO D, FERRARA CA, MATSUO M, SELVAKUMAR A, DUPONT B, CHEN YT, HOFFMAN EW, RITTER G, OLD LJ, GNJATIC S. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients *J Immunol* 2004, 172:3289-3296
- 141 VANSTEENKISTE J, ZIELINSKI M, LINDER A, DAHABRE J, ESTEBAN E, MALINOWSKI W, JASSEM J, PASSLICK B, LEHMANN F, BRICHARD VG. Final results of a multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy of MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy in stage IB/II non-small cell lung cancer (NSCLC) *J Clin Oncol* 2007, 25:7554 (suppl)
- 142 LEHMANN F LJ, GAULIS S, GRUSELLE O, BRICHARD V. Clinical response to the MAGE-A3 immunotherapeutic in metastatic melanoma patients is associated with a specific gene profile present prior to treatment *XVith meeting in the Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium Series and the 2008 Meeting of the Cancer Vaccine Consortium* New York City, 2008, S25
- 143 HIRSCHOWITZ EA, FOODY T, KRYSZCIO R, DICKSON L, STURGILL J, YANNELLI J. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer *J Clin Oncol* 2004, 22:2808-2815
- 144 HIRSCHOWITZ EA, FOODY T, HIDALGO GE, YANNELLI JR. Immunization of NSCLC patients with antigen-pulsed immature autologous dendritic cells *Lung Cancer* 2007, 57:365-372
- 145 LUITEN RM, DEMOTTE N, TINE J, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-A1 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by both HLA-B35 and HLA-A1 molecules *Tissue Antigens* 2000, 56:77-81
- 146 SCHULTZ ES, ZHANG Y, KNOWLES R, TINE J, TRAVERSARI C, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes *Tissue Antigens* 2001, 57:103-109
- 147 DiBRINO M, TSUCHIDA T, TURNER RV, PARKER KC, COLIGAN JE, BIDDISON WE. HLA-A1 and HLA-A3 T cell epitopes derived from influenza virus proteins predicted from peptide binding motifs. *J Immunol* 1993, 151:5930-5935
- 148 CALLAN MF, TAN L, ANNELS N, OGG GS, WILSON JD, O'CALLAGHAN CA, STEVEN N, McMICHAEL AJ, RICKINSON AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 1998, 187:1395-1402
- 149 RICKINSON AB, MOSS DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:405-431
- 150 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
- 151 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
- 152 KUHN MS, DAVIS MM, GARCIA KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex *Immunity* 2006, 24:133-139
- 153 KONIG R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR *Curr Opin Immunol* 2002, 14:75-83
- 154 RUDOLPH MG, STANFIELD RL, WILSON IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors *Annu Rev Immunol* 2006, 24:419-466
- 155 COLE DK, GAO GF. CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator *Cell Mol Immunol* 2004, 1:81-88
- 156 SHARPE AH, FREEMAN GJ. The B7-CD28 superfamily *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 116-126
- 157 GREENWALD RJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. The B7 family revisited *Annu Rev Immunol* 2005, 23:515-548
- 158 HOLMES N. CD45: al is not yet crystal clear *Immunology* 2006, 117:145-155
- 159 HERMISTON ML, XU Z, WEISS A. CD45: a critical regulator of signaling threshold in immune cells *Annu Rev Immunol* 2003, 21:107-137
- 160 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

- 161 SANCHO D, GOMEZ M, SANCHEZ-MADRID F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation *Trends Immunol* 2005, 26:136-140
- 162 CAMPBELL JJ, BUTCHER EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing *Curr Opin Immunol* 2000, 12:336-341
- 163 SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression *Immunol Rev* 2000, 177:134-140
- 164 TURNER D. The human leukocyte antigen (HLA) system. *VOX SANG* 2004, 87:87-90
- 165 SLAVIK JM, HUTCHCROFT JE, BIERER BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function *Immunol Res* 1999, 19:1-24
- 166 BALDUS SE, ENGELMANN K, HANISCH FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004, 41:189-231
- 167 BUCCHERI G, FERRIGNO D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview *Lung Cancer* 2001, 2:65-69
- 168 LATZA U, NIEDOBITEK G, SCHWARTING R, NEKARDA H, STEIN H: BerEp 4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia *J Clin Pathol* 1990, 43: 213-219
- 169 LEONG CF, RAUDHAWATI O, CHEONG SK, SIVAGENGEI K, NOOR HAMIDAH H. Epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 expression in monocytes and monoblasts *Pathology* 2003, 35:422-427
- 170 CARNEY DN, BUNN PA JR, GAZDAR AF, PAGAN JA, MINNA JD. Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of the lung *PNAS* 1981, 78:3185-3189
- 171 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
- 172 LEFRANC MP, GIUDICELLI V, GINESTOUX C, BODMER J, MULLER W, BONTROP R, LEMAITRE M, MALIK A, BARBIE V, CHAUME D. IMGT, the international ImMunoGeneTics database *Nucleic Acids Res* 1999, 27:209-212
- 173 LEFRANC MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2003, 31, 307-331
- 174 FUJIWARA T, ODA K, YOKOTA S, TAKATSUKI A, IKEHARA Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum *J Biol Chem* 1988, 263:18545-52.
- 175 LECOEUR H, FEVRIER M, GARCIA S, RIVIERE Y, GOUGEON ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity *J Immunol Methods* 2001, 253:177-187
- 176 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, 56:259-269
- 177 VALMORI D, GILEADI U, SERVIS C, DUNBAR PR, CEROTTINI JC, ROMERO P, CERUNDOLO V, LÉVY 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
- 178 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, [Epub ahead of print] doi:10.1038 /icb.2010
- 179 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
- 180 LINSLEY PS, LEDBETTER JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen *Annu Rev Immunol* 1993, 11:191-212
- 181 CHAO DT, KORSMEYER SJ. BCL-2 family: regulators of cell death *Annu Rev Immunol* 1998, 16:395-419

- 182 DHODAPKAR MV, YOUNG JW, CHAPMAN PB, COX WI, FONTENEAU JF, AMIGORENA S, HOUGHTON AN, STEINMAN RM, BHARDWAJ N. Paucity of functional T-cell memory to melanoma antigens in healthy donors and melanoma patients *Clin Cancer Res* 2000, 6:4831-4838
- 183 DANKE NA, KOELLE DM, YEE C, BEHERAY S, KWOK WW. Autoreactive T cells in healthy individuals *J Immunol* 2004, 172:5967-5872
- 184 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, 206:849-866
- 185 ROMERO P, CEROTTINI JC, SPEISER DE. The human T cell response to melanoma antigens *Adv Immunol* 2006, 92:187-224
- 186 COULIE PG, KARANIKAS V, LURQUIN C, COLAU D, CONNEROTTE T, HANAGIRI T, VAN PEL A, LUCAS S, GODELAINE D, LONCHAY C, MARCHAND M, VAN BAREN N, BOON T. Cytolytic Tcell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen *Immunol Rev* 2002, 188:33-42
- 187 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-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals *J Exp Med* 1999, 190:705-715
- 188 DUNBAR PR, SMITH CL, CHAO D, SALIO M, SHEPHERD D, MIRZA F, LIPP M, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F, EVANS A, RUSSELL-JONES R, HARRIS AL, CERUNDOLO V. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response *J Immunol* 2000, 165:6644-6652
- 189 MACZEK C, BERGER TG, SCHULER-THURNER B, SCHULTZ ES, HAMANN A, DUNBAR PR, CERUNDOLO V, STEINKASSERER A, SCHULER G. Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A*0201 melanoma patients *Int J Cancer* 200, 115:450-455
- 190 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, FRANCIANI G. 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
- 191 NOWAK AK, LAKE RA, ROBINSON BW. Combined chemoimmunotherapy of solid tumors: improving vaccines? *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58:975-990
- 192 ZITVOGEL L, APETH L, GHIRINGHELLI F, ANDRÉ F, TESNIERE A, KROEMER G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008, 118:1991-2001
- 193 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
- 194 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, 14:3185-3192
- 195 SCHEFFER SR, NAVE H, KORANGY F, SCHLOTE K, PABST R, JAFFEE EM, MANNS MP, GRETEN TF. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response *in vivo Int J Cancer* 2003, 103:205-211
- 196 WAKABAYASHI O, YAMAZAKI K, OIZUMI S, HOMMURA F, KINOSHITA I, OGURA S, DOSAKA-AKITA H, NISHIMURA M. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers *Cancer Sci* 2003, 94:1003-1009
- 197 CHIOU SH, SHEU BC, CHANG WC, HUANG SC, HONG-NERNG H. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies *J Reprod Immunol* 2005, 67:35-50
- 198 HARLIN H, KUNA TV, PETERSON AC, MENG Y, GAJEWSKI TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:1185-1197

- 199 KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, SOUKOU F, KERENIDI T, TSUGOS 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* [submitted]
- 200 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
- 201 NIKOLICH-ZUGICH J. Ageing and life-long maintenance of T cell subsets in the face of latent persistent infections *Nat Rev Immunol* 2008, 8:512-522
- 202 WENG NP. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 2006, 24: 495-499
- 203 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
- 204 EFFROS RB, DAGARAG M, SPAULDING C, MAN J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging *Immunol Rev* 2005, 205:147-157
- 205 VALLEJO AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence *Immunol Rev* 2005, 205:158-169
- 206 LIÉNARD D, RIMOLDI D, MARCHAND M, DIETRICH PY, VAN BAREN N, GELDHOF C, BATARD P, GUILLAUME P, AYYOUB M, PITTET MJ, ZIPPELIUS A, FLEISCHHAUER K, LEJEUNE F, CEROTTINI JC, ROMERO P, SPEISER DE. *Ex vivo* detectable activation of Melan-A-specific T cells correlating with inflammatory skin reactions in melanoma patients vaccinated with peptides in IFA *Cancer Immun* 2004, 19;4:4
- 207 COULIE PG, CONNEROTTE T. Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? *Curr Opin Immunol* 2005, 17:320-325
- 208 GERMEAU C, MA W, SCHIAVETTI F, LURQUIN C, HENRY E, VIGNERON N, BRASSEUR F, LETHÉ B, DE PLAEN E, VELU T, BOON T, COULIE PG. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens *J Exp Med* 2005, 201:241-248
- 209 BUTTERFIELD LH, RIBAS A, DISSETTE VB, AMARNANI SN, VU HT, OSEGUERA D, WANG HJ, ELASHOFF RM, MCBRIDE WH, MUKHERJI B, COCHRAN AJ, GLASPY JA, ECONOMOU JS. Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma *Clin Cancer Res* 2003, 9:998-1008
- 210 LALLY KM, MOCELLIN S, OHNMACHT GA, NIELSEN MB, BETTINOTTI M, PANELLI MC, MONSURRO V, MARINCOLA FM. Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading *Int J Cancer* 2001, 93:841-847
- 211 KLEBANOFF CA, GATTINONI L, RESTIFO NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy *Immunol Rev* 2006, 211:214-224
- 212 LINTON PG, DORSHKIND K. Age-related changes in lymphocyte development and function *Nat Immunol* 2004, 5:133-139
- 213 NIKOLICH-ZUGICH J. Ageing and life-long maintenance of T cell subsets in the face of latent persistent infections *Nat Rev Immunol* 2008, 8:512-522
- 214 EFFROS RB. Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53:925-933
- 215 KNUTSON KL, DISIS ML, SALAZAR LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:271-285
- 216 WHELAN JA, DUNBAR PR, PRICE DA, PURBHOO MA, LECHNER F, OGG GS, GRIFFITHS G, PHILLIPS RE, CERUNDOLO V, SEWELL AK. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent *J Immunol* 1999, 163:4342-4348
- 217 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
- 218 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 het-

- erogeneous avidity in tumor-associated antigen-specific T lymphocytes from primary melanoma patients *Eur J Immunol* 2001, 31:412-420
- 219 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
- 220 KROGER CJ, ALEXANDER-MILLER MA. Dose-dependent modulation of CD8 and functional avidity as a result of peptide encounter *Immunology* 2007, 122:167-178
- 221 BELZ GT, CARBONE FR, HEATH WR. Cross-presentation of antigens by dendritic cells *Crit Rev Immunol* 2002,22:439-448
- 222 LEE PP, YEE C, SAVAGE PA, FONG L, BROCKSTEDT D, WEBER JS, JOHNSON D, SWETTER S, THOMPSON J, GREENBERG PD, ROEDERER M, DAVIS MM. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients *Nat Med* 1999, 5:677-685
- 223 ZIPPELIUS A, BATARD P, RUBIO-GODOY V, BIOLEY G, LIÉNARD D, LEJEUNE F, RIMOLDI D, GUILLAUME P, MEIDENBAUER N, MACKENSEN A, RUFER N, LUBENOW N, SPEISER D, CEROTTINI JC, ROMERO P, PITTET MJ. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance *Cancer Res* 2004, 64:2865-2873
- 224 GERMENIS AE, KARANIKAS V. Cord blood as a source of non-senescent lymphocytes for tumor immunotherapy *J Reprod Immunol* 2010, 85:47-50

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Cytolytic T-cell response against Epstein-Barr virus in lung cancer patients and healthy subjects

Vaios Karanikas^{1,5}, Maria Zamanakou¹, Faye Soukou¹, Theodora Kerenidi², Ioannis Tsougos³, Kiki Theodorou³, Panagiotis Georgoulas⁴, Konstantinos I. Gourgoulianis², Anastasios E. Germenis¹

¹Cancer Immunology Unit, Department of Immunology & Histocompatibility,

²Department of Respiratory Medicine, ³Department of Medical Physics, ⁴Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, GR-411 10 Larissa, Greece

⁵Corresponding author

E-mail address: vkaran@med.uth.gr (V. Karanikas).

Running Title: Antiviral cytolytic response in lung cancer

Keywords: Cancer, Cytolytic T cells, EBV, HLA-multimer, Senescence

Abbreviations: APC, allophycocyanin; CMV, cytomegalovirus; CTL, cytolytic CD8⁺ T cell; DTH, delayed-type hypersensitivity; EBV, Epstein-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;

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 antitumor response, as is the case with the anti-EBV response.

Introduction

Evidence suggests that cancer patients present with an 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 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 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 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 ($26.6 \pm 26.4\%$, range 0.4–80.7%) than in lung cancer patients ($2.7 \pm 3.3\%$, range 0.1–19.0%) and younger healthy individuals ($2.4 \pm 1.7\%$, 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 ($r = 0.016$, $p = 0.435$).

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 reactivity. 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.

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, delayedtype hypersensitivity; EBV, Epstein-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;

Competing interests

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

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.

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.

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

^aValues represent number U/mL of anti-CMV IgG antibodies

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

^aValues represent number of EBV specific CTL amongst one million peripheral CD8 T cells.

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

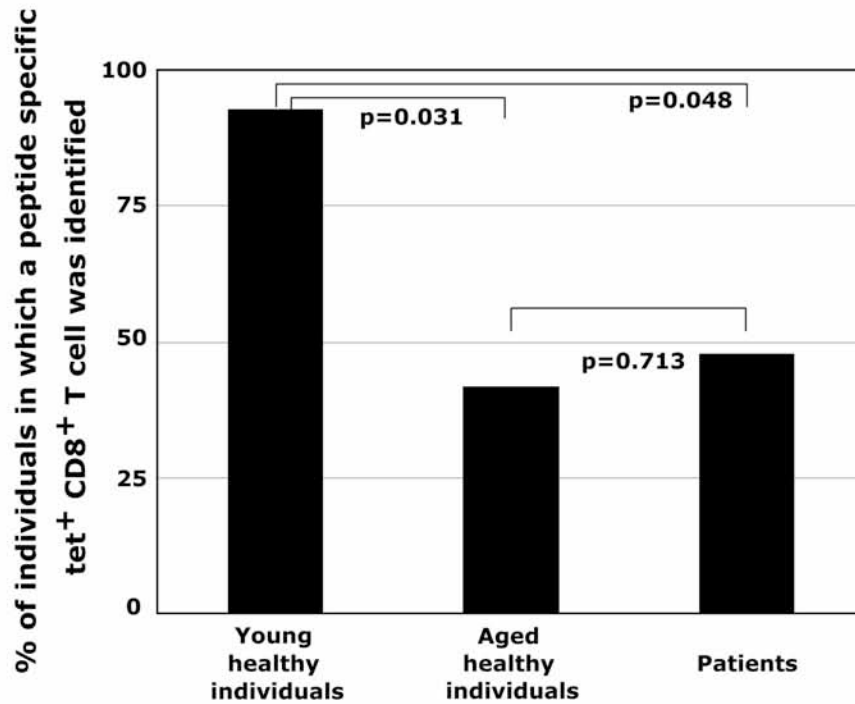


Figure 1 Proportion of individuals (young healthy, aged healthy and patients) containing an EBV peptide specific tet⁺CD8⁺ T cell amongst peripheral blood CD8 T cells.

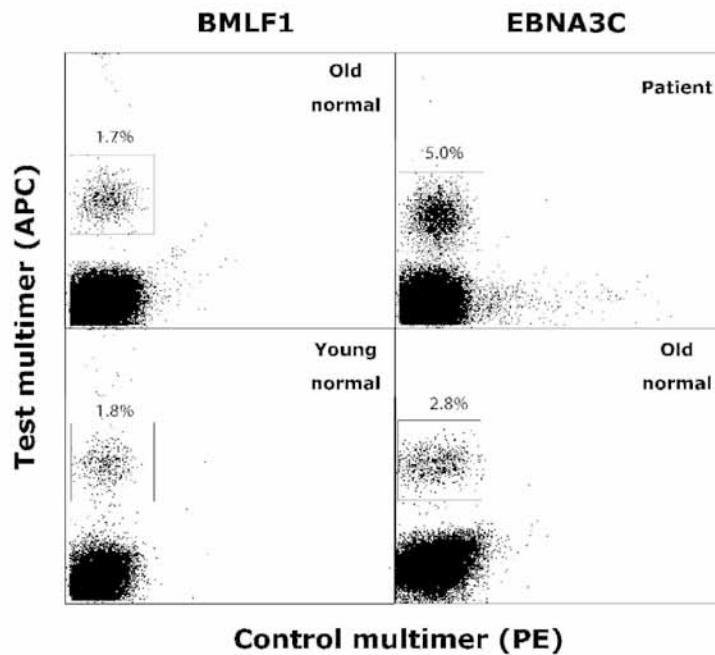


Figure 2 EBV multimer positive populations from patients, age-matched healthy individuals and healthy younger individuals. MLPC, were stained with test multimers folded with BMLF1.A2 or EBNA3C.A24 labelled with APC (y axis) and control multimers folded with irrelevant HLA-A2 or -A24 peptides labelled with PE (x axis). Each plot represents live CD8 lymphocytes with the multimer positive population indicated in each gate.

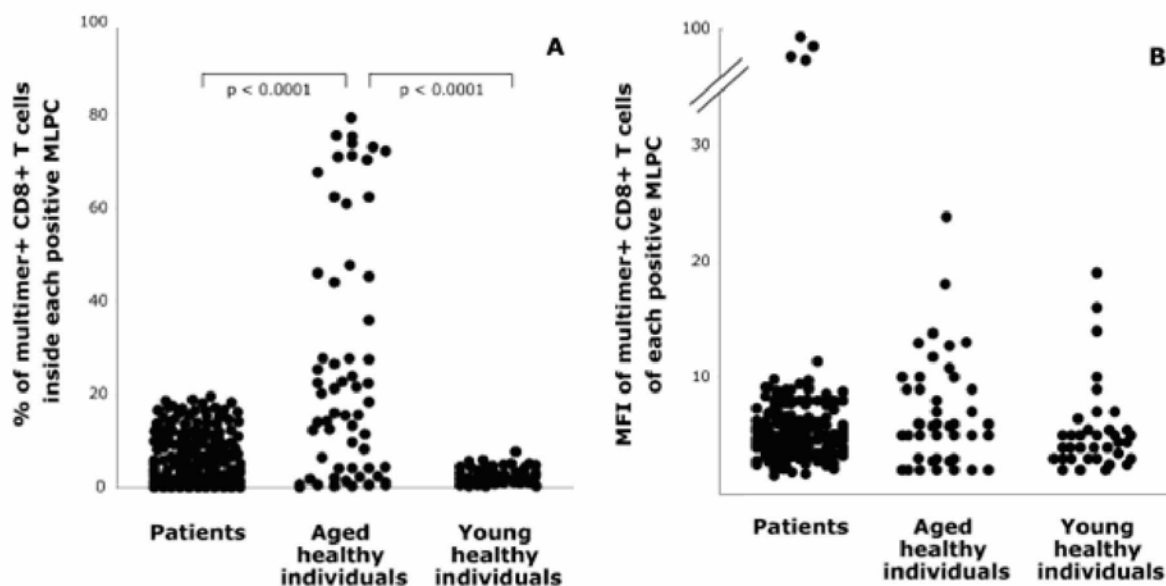


Figure 3 Flow cytometric characteristics of circulating anti-EBV specific pCTL from patients, age-matched healthy individuals and healthy younger individuals. (A) Percentage of multimer+CD8+ T cells inside each positive MLPCs (significance is indicated for comparisons between each group). (B) Mean Fluorescence Index (MFI) of HLAmultimers inside the positive MLPCs for each group.

References

- 1 Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjöberg J, Pisa P, Petersson M. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 48: 353-362, 1999.
- 2 Hadden JW. The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol* 21: 79-101, 1999.
- 3 Brydak LB, Guzy J, Starzyk J, Bachala M, Gózdź SS. Humoral immune response after vaccination against influenza in patients with breast cancer. *Support Care Cancer* 9: 65-68, 2001.
- 4 Earle CC. Influenza vaccination in elderly patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21: 1161-1166, 2003.
- 5 Karanikas V, Tsochas S, Boukas K, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J, Poularakis T, Gourgoulianis KI, Germeis AE. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: Implications for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 7: 345-352, 2008.
- 6 Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, Kennedy M.M, King G, Cockburn J.S, Jeffrey R.R. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 27: 27-35, 2000.
- 7 Romero P. Current state of vaccine therapies in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 9, Suppl 1: S28-S36, 2008.
- 8 Karanikas V, Soukou F, Kalala F, Kerenidi T, Grammoustianou ES, Gourgoulianis KI, Germeis 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* 129: 230-240, 2008.
- 9 Nikolich-Zugich 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 TCRMHC/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; [Epub ahead of print].
 - 14 Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Bricard 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 U S A.* 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-Loebenstien B, Wikby A. Is immunosenescence infectious? *Trends Immunol* 2004, 25: 406-410.
 - 18 Walter S, Bioley G, Buhning 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. 15
 - 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.



ORIGINAL ARTICLE

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

Vaios Karanikas¹, Maria Zamanakou¹, Faye Soukou¹, Theodora Kerenidi², Konstantinos I Gourgoulianis² and Anastasios E Germenis¹

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 advance online publication, 9 February 2010; doi:10.1038/icb.2010.8

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

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

¹Cancer Immunology Unit, Department of Immunology & Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece and ²Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, Larissa, Greece

Correspondence: Associate 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

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 (Table 1).

Accumulating evidence during the last years indicates that radiotherapy and some chemotherapeutic agents can augment specific immune responses, offering the rationale for combined chemimmunotherapy.^{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 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.

^aPatients were grouped according to the histotype.

^bECOG 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-IL.A.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-IL.A.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-IL.A.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

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	<3.6							
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.

^aMillion CD8 tested.

^bThe expression levels for hTERT, MAGE-A1 and MAGE-A3 were determined as described previously⁵¹ and expressed as a percentage of expression levels by a testis sample; see text for the explanation of '<' and the abbreviations of the peptides.

^cf: Frequency of pCTLs specific for the given peptide per 10⁷ 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.

^aMillion CD8 tested.

^bThe frequency of pCTLs specific for the given peptide per 10⁷ 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.

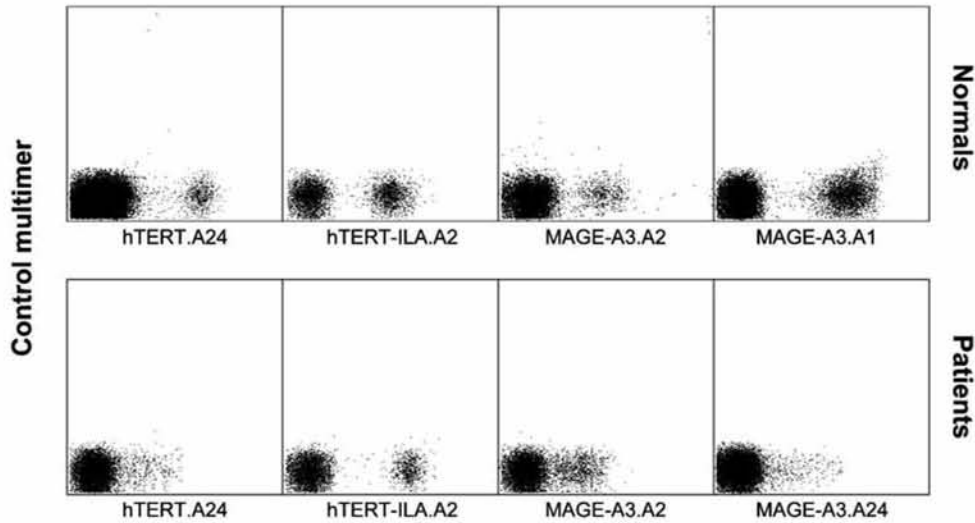


Figure 1 Representative multimer-positive plots. MLPC were stained as described under section Methods with control multimers labeled with allophycocyanin and multimers containing the peptide of interest labeled with PE, following exclusion of irrelevant binding events.¹⁵ The plots represent live CD8⁺ cells. MLPC, mixed lymphocyte-peptide culture; PE, phycoerythrin.

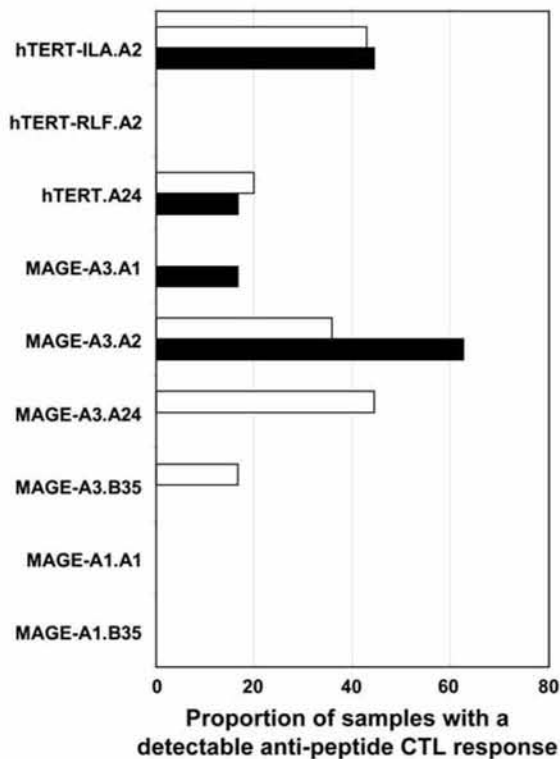


Figure 2 Proportion of patients upon diagnosis (white bars) and normal subjects (black bars) with a detectable peptide-specific CTL response. Peptides are described under section Methods. CTL, cytolytic CD8⁺ T-cell.

MLPCs was found to be significantly higher ($P=0.030$) in healthy subjects ($6.5 \pm 7.9\%$, range 0.2–30.0%) than in lung cancer patients ($1.5 \pm 2.1\%$, 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 clinico-pathological 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.

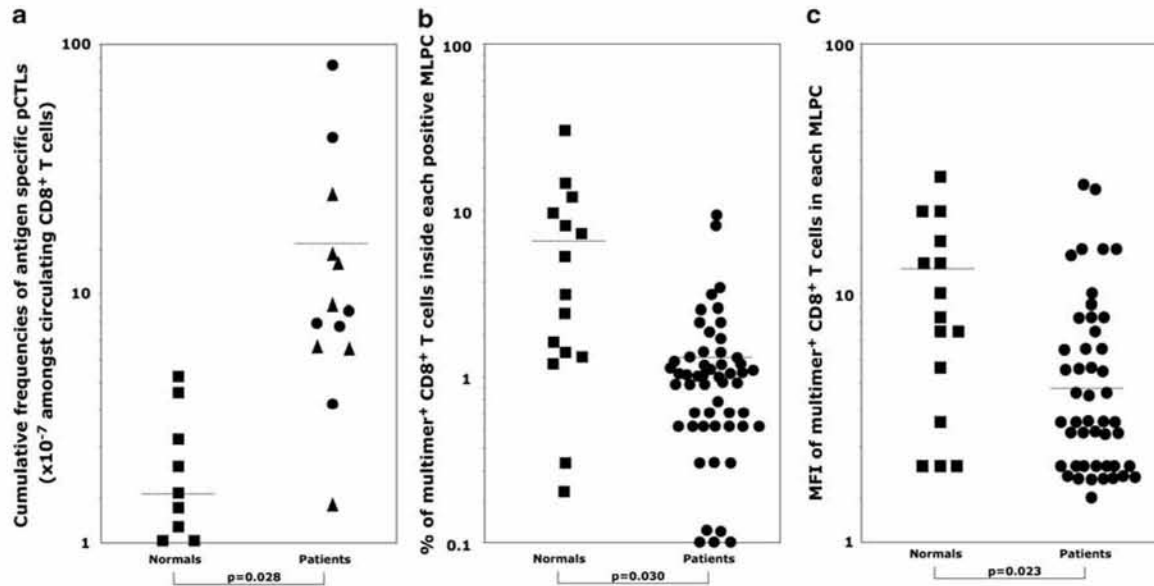


Figure 3 The frequencies and flow cytometric characteristics of circulating antitumor specific pCTL of patients with lung cancer and normal healthy individuals. (a) Cumulative frequencies of pCTLs ($\times 10^{-7}$ peripheral CD8⁺ T-cells) directed against all the tumor-antigen peptides in normal healthy 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.
^aThe 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

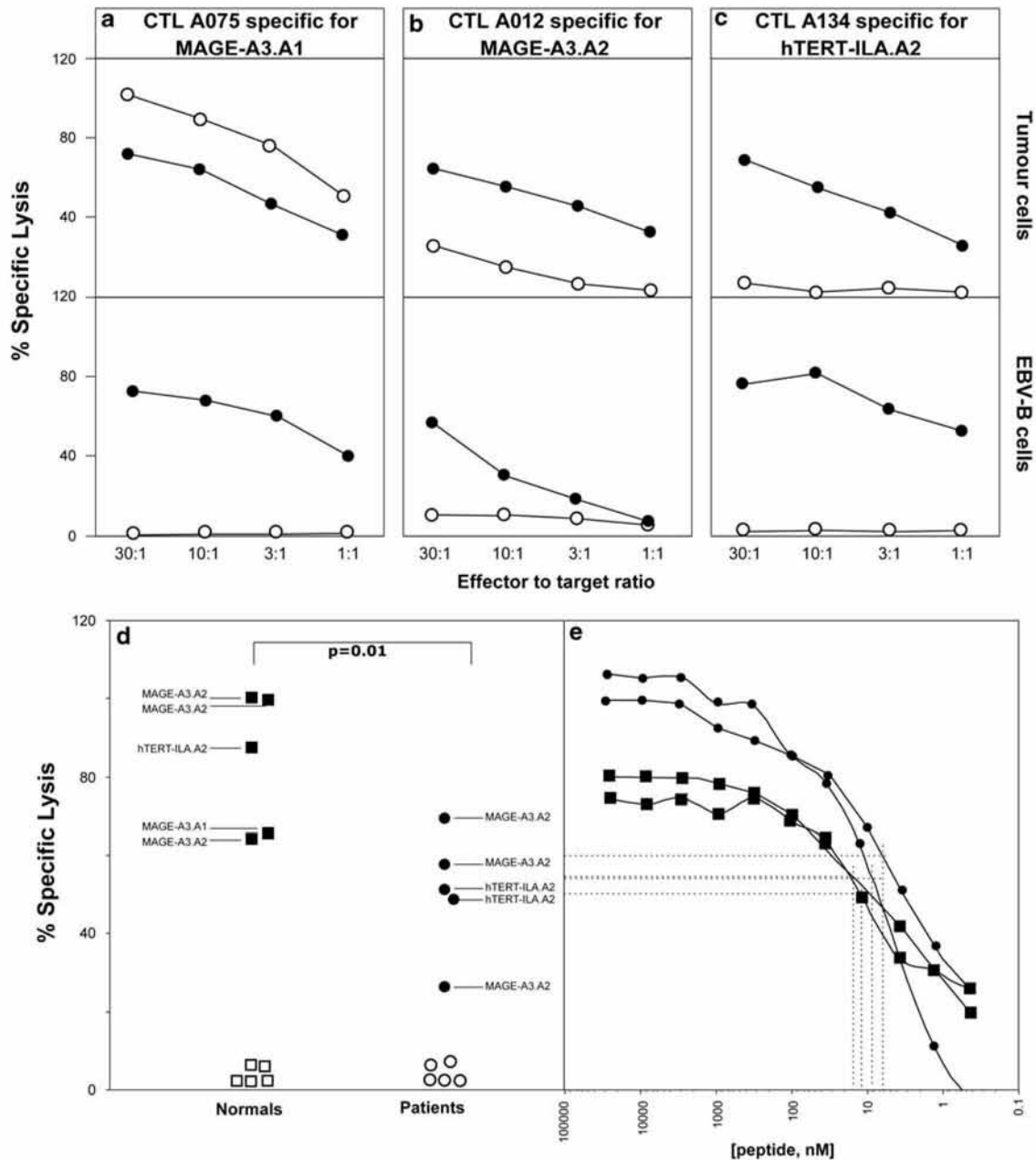


Figure 4 Characterization of the lytic capability of antitumor specific CTL clones. Percent specific lysis of representative clones: anti-MAGE-A3.A1 CTL clone A075 isolated from normal individual no. 3 (a); anti-MAGE-A3.A2 CTL clone A012 isolated from patient no. 12 (b) and anti-hTERT-ILA.A2 CTL clone A134 isolated from normal individual no. 6 (c). All clones in panels a–c recognized ⁵¹Cr-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.

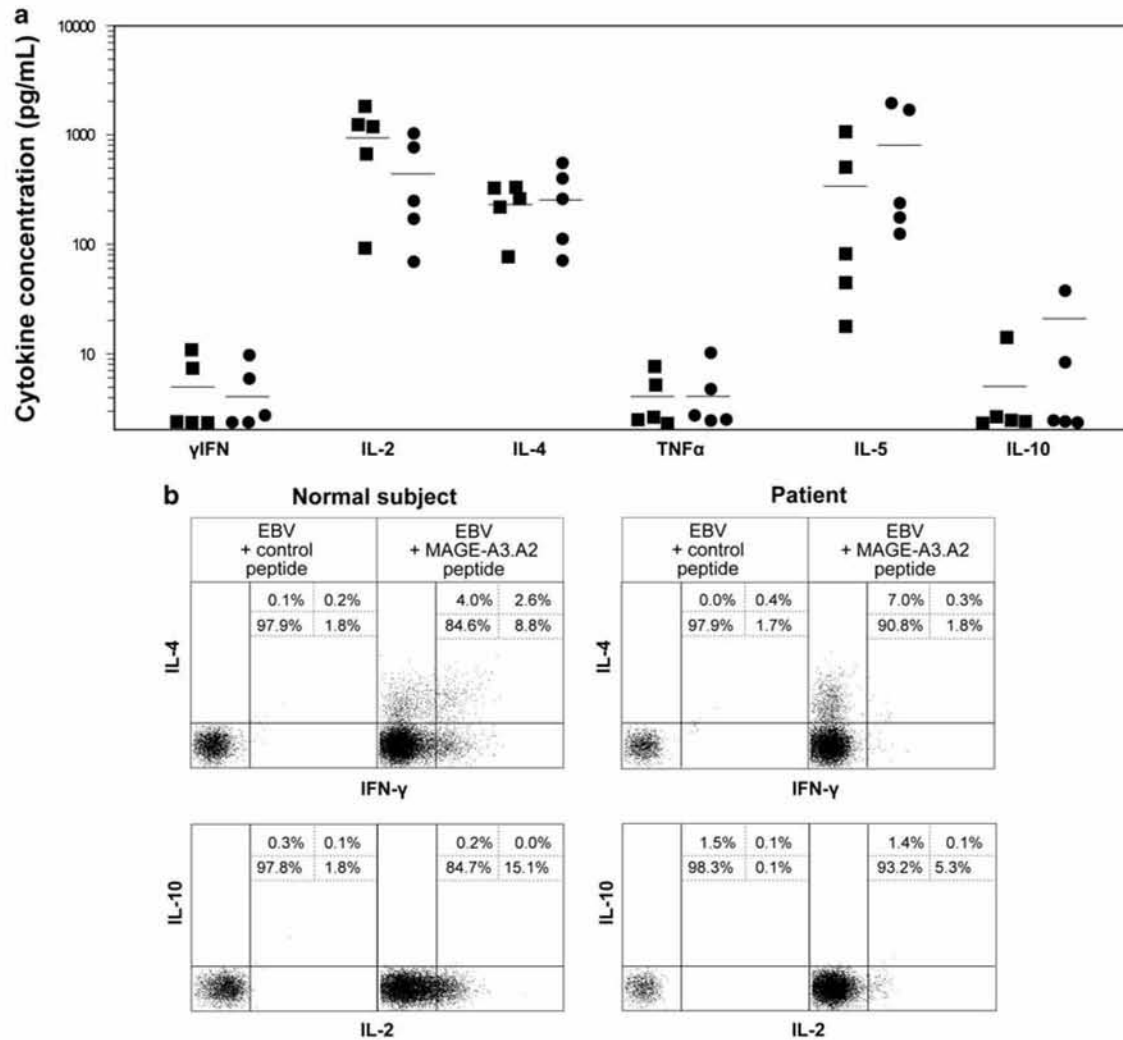


Figure 5 Functional characterization of antitumor specific CTL clones. (a) Production of cytokines by isolated CTL clones from normal subjects (■) and cancer patients (●) following peptide-specific stimulation. The results are mean from two independent experiments for each CTL clone. The lines represent 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 $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 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 MLPs 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

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-RLFA2 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-IL.A.2, 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 V β 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 anti-tumor 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

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-A1A1 presented by HLA-A1), EADPTGHSY (MAGE-A1B35 presented by HLA-B35), EVDPIGHLY (MAGE-A3A1 presented by HLA-A1), FLWGPRAIV (MAGE-A3A2 presented by HLA-A2), TFPDLESEF (MAGE-A3A24 presented by HLA-A24), EVDPIGHLY (MAGE-A3B35 presented by HLA-B35), ILAKFLHWL (hTERT-ILA.A2 presented by HLA-A2), RLFFYRKSV (hTERT-RLFA2 presented by HLA-A2) and VYAETKHFL (hTERT-TA24 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 (PB1A1 binding to HLA-A1) were used as controls. All peptides were synthesized on solid phase using F-moc for transient NH₂-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

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 ⁵¹Cr-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 Bead-based Luminex Technology (Biosource, Carlsbad, CA, 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 $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 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 PC7: SFC121Thy2D3 (anti-CD8; PC7; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD28.2 (anti-CD28; fluorescein isothiocyanate; Immunotech, Marseille, France), UCHL1 (anti-CD45RO; ECD; Beckman Coulter), NC1 (anti-CD57; fluorescein isothiocyanate; Immunotech) and 150503 (anti-CCR7; allophycocyanin; R&D systems, Minneapolis, MN, 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 \pm 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 cytotoxic 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, Papadimitrakaki 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, André 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, Korang 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.

- 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*. Chemotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOLX 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, Tsochias 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.