



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
**«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής  
Ιατρικής»**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Διπλωματική Εργασία

**«ΕΙΔΙΚΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΤΙΚΑ  
CD8 Τ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΟΜΦΑΛΙΚΟ ΑΙΜΑ»  
ΤΣΟΛΗΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2011

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Γερμενής**

*Καθηγητής Ανοσολογίας*

(επιβλέπων)

**Γεώργιος Χατζηγεωργίου**

*Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας*

**Ματθαίος Σπελέτας**

*Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας*

# Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>5</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>6</b>
1.1 Εισαγωγή Στην Ανοσοθεραπεία	6
1.2 Εισαγωγή στην γήρανση των Τ κυττάρων	8
1.2.1 Διαταραχές στη σηματοδότηση	9
1.2.2 Αντιγραφική γήρανση	10
1.2.3 Μεταβολές σε επίπεδο πληθυσμού	13
1.3 Προκλήσεις ανοσοθεραπείας	15
1.4 Ομφαλικό αίμα	17
1.4.1 Τ κύτταρα στο ομφαλικό αίμα	17
1.4.2 Ανάπτυξη Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος	19
1.4.3 Ανάπτυξη ειδικών έναντι του όγκου Τ κυττάρων, από το ομφαλικό αίμα	22
1.5 Υπόθεση Εργασίας	26
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>27</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ</b>	<b>28</b>
2.1 Μονάδες Ομφαλικού Αίματος	28
2.2 Πεπτίδια	28
2.3 HLA-πολυμερή	28
2.4 Καρκινικές Γραμμές – EBV-B Μετασχηματισμένα Κύτταρα	29
2.5 Ορός	29
2.6 Λοιπά Υλικά	29
<b>3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ</b>	<b>32</b>
3.1 Απομόνωση – Διατήρηση – Ανάκτηση CBMCs/PBMCs	32
3.2 Παρασκευή Ορού από Πλάσμα	33
3.3 Καλλιέργεια Καρκινικών Γραμμών και EBV-B Κυττάρων	34
3.4 Ακτινοβολήση Κυττάρων	35
3.5 Αναστολή του πολλαπλασιασμού – Επώαση με μιτομυκίνη	35
3.6 Μεικτή Λεμφοκυτταρική Καλλιέργεια (MLPC)	36
3.7 Καλλιέργεια Τ Γραμμών	39
3.8 Απομόνωση CD8 Τ κυτταρικών κλώνων	40
3.9 Καλλιέργεια CD8 Τ κυτταρολυτικών κλώνων	43
3.10 Προσδιορισμός κυτταροκινών - Ενδοκυττάρια χρώση	44
3.11 Παραγωγή εναιωρήματος λυμένων καρκινικών κυττάρων	45
3.12 Παραγωγή δενδριτικών κυττάρων	46
3.13 HLA-A2 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός	48
3.14 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός CD8 Τ κυττάρων	48
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>49</b>
4.1 Παραγωγή και ωρίμανση Δενδριτικών Κυττάρων	49
4.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός Δενδριτικών κυττάρων	50
4.3 Ανάπτυξη αντιγονοειδικών πληθυσμών CD8 Τ κυττάρων με εναιώρημα λυμένων καρκινικών κυττάρων ως μέσο ωρίμανσης των DCs	52
4.4 Στο ομφαλικό αίμα περιέχονται κυρίως παρθένοι πληθυσμοί Τ κυττάρων	53
4.5 Συχνότητα των κυκλοφορούντων CD8 Τ κυττάρων έναντι αντιγόνων του όγκου στο ομφαλικό αίμα	53
4.6 Συχνότητα ειδικών έναντι καρκινικών αντιγόνων CD8 Τ κυττάρων ομφαλικού αίματος	56
4.7 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός	57
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>59</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>62</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ανοσιακό σύστημα, έχει την ικανότητα να περιπολεί, να αναγνωρίζει και να καταστρέφει τα εξαλλαγμένα κύτταρα, εμποδίζοντας την ανάπτυξη όγκων. Παρόλα αυτά, μέσω διαφόρων μηχανισμών, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ξεφύγουν από την επιτήρηση του ανοσιακού συστήματος, με αποτέλεσμα την κλινική εμφάνιση της ασθένειας. Σκοπός της ανοσοθεραπείας είναι, μέσω διαφορετικών προσεγγίσεων, το ανοσιακό σύστημα να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα διαφυγόντα καρκινικά κύτταρα. Μία παράμετρος που μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία της ανοσοθεραπείας, είναι οι ποιοτικές μεταβολές που πραγματοποιούνται στα T λεμφοκύτταρα, όπως έχουν περιγραφεί εξαιτίας του φαινομένου της ανοσογήρανσης. Κατά συνέπεια, σε πρωτόκολλα παθητικής ανοσοθεραπείας, αποτελεί ελκυστική προσέγγιση, η χρήση «νεαρότερων» κυττάρων. Στην παρούσα εργασία, θελήσαμε να εξετάσουμε αν στο ομφαλικό αίμα περιέχονται CD8 T κύτταρα, με ειδικότητα έναντι των αντιγόνων του όγκου και να μελετήσουμε τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 9 μονάδες ομφαλικού αίματος, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, σε κατάλληλες συνθήκες ώστε να αναπτυχθούν CD8 T κύτταρα ειδικά για τα αντιγόνα των όγκων MAGE-A3, hTERT540 και Survivin. Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει ότι στο ομφαλικό αίμα, η αθροιστική συχνότητα των CD8 T κυττάρων, των HLA-A2 παρουσιαζόμενων πεπτιδίων έναντι των αντιγόνων MAGE-A3, hTERT540 και Survivin είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συχνότητα νεαρών ενηλίκων και των υπόλοιπων ηλικιακών ομάδων. Η συχνότητα αυτή μειώνεται σημαντικά προοίησης της ηλικίας. Επίσης, έπειτα από αρκετές ενεργοποιήσεις, ο αντιγονοειδικός πληθυσμός των CD8 T κυττάρων παρουσίαζε φαινότυπο μνημονικών κυττάρων ( $T_{EM}$ ). Καθώς η συχνότητα των ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων είναι αυξημένη στο ομφαλικό αίμα και της προοπτικής που παρουσιάζουν τα «νεαρά» κύτταρα του ομφαλικού αίματος για την χρήση τους σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας, μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε ο λεπτομερής *in vitro* και *in vivo* λειτουργικός τους χαρακτηρισμός.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

---

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

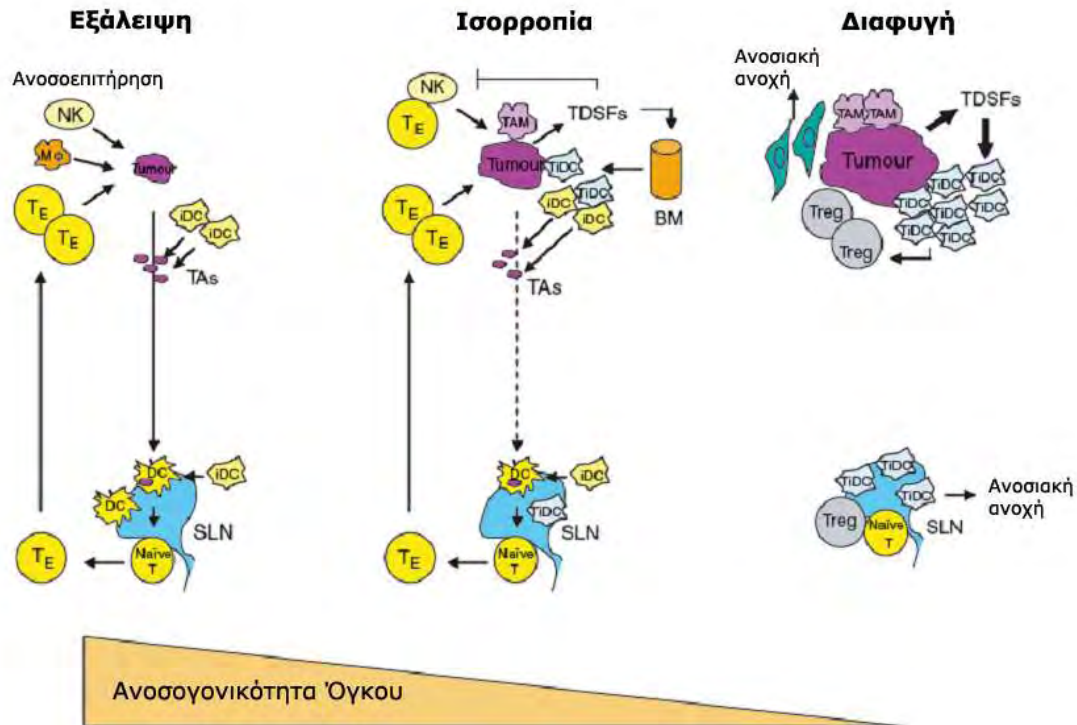
Η παθητική ανοσοθεραπεία (Adoptive Cancer Immunotherapy, ACIT), θεωρείται μια ελκυστική στρατηγική για την θεραπεία διαφόρων νεοπλασιών. Ο σκοπός της μεθόδου είναι η χορήγηση ενός μεγάλου αριθμού ενεργοποιημένων CD8 T λεμφοκυττάρων τα οποία θα αναγνωρίσουν και θα καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα T κύτταρα, μπορεί να προέρχονται από την ίδιο τον ασθενή ή από διαφορετικό άτομο όπου στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να αναγνωρίζουν το ίδιο μόριο HLA. Τα κύρια πλεονεκτήματα, που μπορεί να προσφέρει η παθητική ανοσοθεραπεία σε σχέση με την χημειοθεραπεία, είναι η χαμηλή τοξικότητα αλλά και η μακροχρόνια προστασία, καθώς μετά την εξάλειψη του όγκου διατηρούνται μνημονικοί πληθυσμοί T λεμφοκυττάρων, ικανοί να προστατέψουν τον ασθενή σε μετέπειτα εμφάνιση καρκινικών κυττάρων οι οποίοι θα εκφράζουν τα ίδια αντιγόνα.

Ενώ σε θεωρητικό επίπεδο, αυτή η προσέγγιση θεωρείται ιδανική, τα κλινικά αποτελέσματα μέχρι τώρα είναι τα αντίθετα. Το ποσοστό των ασθενών στους οποίους παρατηρείται ανοσιακή απάντηση έναντι του όγκου είναι πολύ μικρό και τις περισσότερες φορές δεν παρατηρείται ίαση της ασθένειας. Παράγοντες όπως τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των T κυττάρων των ασθενών, αλλά και το μικροπεριβάλλον του όγκου, επηρεάζουν σημαντικά την έκβαση της ανοσοθεραπείας. Όσον αφορά τις ποιοτικές μεταβολές των T κυττάρων, αυτές μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ανοσογήρανσης. Κατά συνέπεια, η χρήση «νεαρότερων» T λεμφοκυττάρων σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας, πολύ πιθανόν να οδηγούσε σε καλύτερα αποτελέσματα. Σαν προέκταση αυτής της άποψης, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη του ομφαλικού αίματος για την ανίχνευση CD8 T λεμφοκυττάρων ειδικότητας έναντι αντιγόνων του όγκου, αλλά και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των κυττάρων αυτών.

### 1.1 Εισαγωγή Στην Ανοσοθεραπεία

Το ανοσιακό σύστημα, έχει την ικανότητα να περιπολεί, να αναγνωρίζει και να καταστρέφει τα εξαλλαγμένα κύτταρα, εμποδίζοντας την ανάπτυξη όγκων. Η θεωρία της ανοσο-επιτήρησης προτάθηκε στις αρχές του 20 αιώνα και έκτοτε, έχει ενισχυθεί από μια σειρά πειραματικών και κλινικών δεδομένων. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, αρχικά τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας ενεργοποιούνται από σήματα κινδύνου και φλεγμονώδη κυτταροκίνες που ελευθερώνονται από τα αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια, η καταστροφή των εξαλλαγμένων κυττάρων από αυτά της μη ειδικής ανοσίας, οδηγεί στην απελευθέρωση καρκινικών αντιγόνων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την έναρξη ειδικών ανοσιακών απαντήσεων.<sup>1</sup> Η συνεχής εξελικτική πίεση, που ασκείτε στα καρκινικά κύτταρα από το ανοσιακό σύστημα, έχει σαν αποτέλεσμα την επιλογή αυτών των καρκινικών κυττάρων που παρουσιάζουν μειωμένη ανοσογονικότητα. Με αυτόν τον τρόπο, από το στάδιο της ανοσιακής

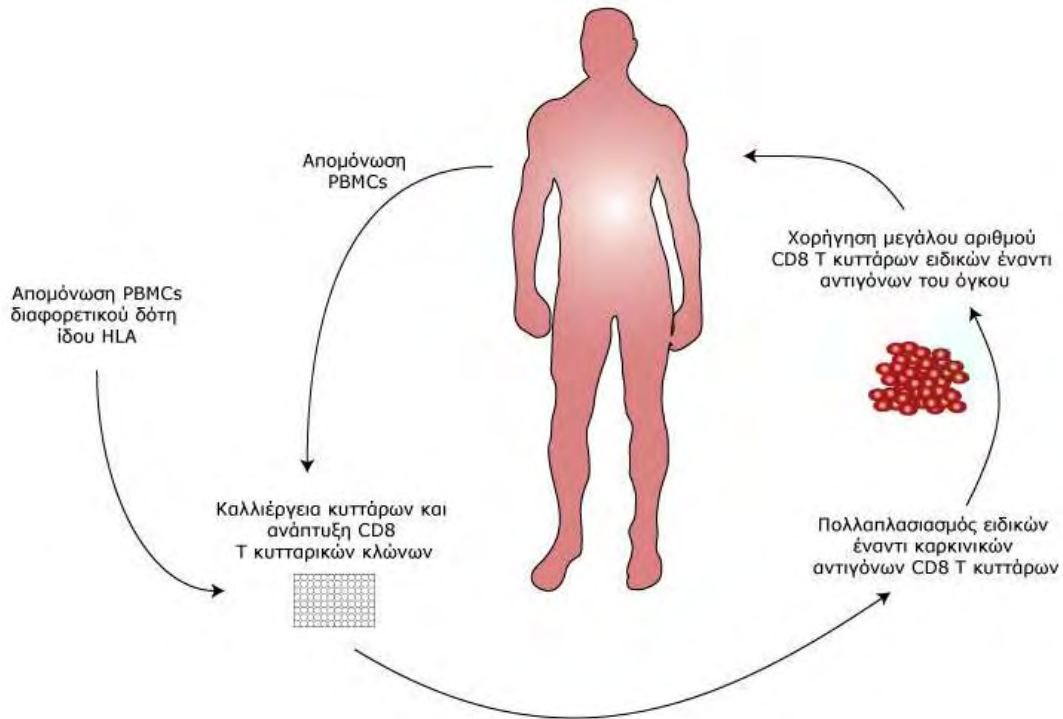
επιτήρησης, μπορεί να γίνει το πέρασμα στο στάδιο της ισορροπίας και τελικά στο στάδιο της ανοσιακής διαφυγής, όπου παρατηρείται και η κλινική εμφάνιση του όγκου (Εικόνα 1).<sup>1,2</sup> Σκοπός της ανοσοθεραπείας είναι, μέσω διαφορετικών προσεγγίσεων, το ανοσιακό σύστημα να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα, επιστρέφοντας έτσι στο στάδιο της ανοσιακής επιτήρησης.



**Εικόνα 1.** Το ανοσιακό σύστημα έχει την ικανότητα να επιτηρεί και να καταστρέφει τα εξαλλαγμένα κύτταρα, εμποδίζοντας την εμφάνιση όγκων. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τη θεωρία της ανοσοδιαμόρφωσης, η αλληλεπίδραση των κυττάρων του ανοσιακού με τα εξαλλαγμένα κύτταρα, λόγω διαφόρων αιτιών, μπορεί να μετατοπιστεί από το στάδιο της επιτήρησης στο στάδιο της ισορροπίας και στη συνέχεια σε αυτό της διαφυγής, οδηγώντας στην κλινική εμφάνιση του όγκου. Προσαρμοσμένη από [1].

Μια στρατηγική για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου είναι η χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων, αυτόλογων ή ετερόλογων CD8 T κυττάρων ειδικών για καρκινικά αντιγόνα, τα οποία θα αναγνωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα και εξαλείφοντας τον όγκο.<sup>3</sup> Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των διαφόρων κλινικών δοκιμών έχουν δείξει ότι το ποσοστό επιτυχίας είναι μικρότερο από 3%.<sup>4</sup> Η αποτυχία των κλινικών δοκιμών της ανοσοθεραπείας οφείλεται από την μία στο γεγονός ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζει την λειτουργία των T κυττάρων, με αποτέλεσμα, τα ειδικά έναντι των καρκινικών αντιγόνων T κύτταρα, να συμπεριφέρονται διαφορετικά *in vivo* από ότι *in vitro*. Από την άλλη, η αποτυχία της ανοσοθεραπείας μπορεί να οφείλεται στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του T κυτταρικού

πληθυσμού των ασθενών, τα οποία μεταβάλλονται με την ηλικία. Το τελευταίο είναι πιθανόν να οφείλεται στην ανοσογήρανση.



**Εικόνα 2.** Μια στρατηγική της ανοσοθεραπείας του καρκίνου, είναι η *in vitro* ανάπτυξη και χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων CD8 T κυττάρων ειδικών για αντιγόνα του όγκου, τα οποία μπορεί να προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή είτε από διαφορετικό δότη.

## 1.2 Εισαγωγή στην γήρανση των T κυττάρων

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες επικεντρώνονται γύρω από το φαινόμενο της γήρανσης του ανοσιακού συστήματος, το οποίο περιγράφεται στην βιβλιογραφία ως «ανοσογήρανση».<sup>5</sup> Όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί, επηρεάζονται με την αύξηση της ηλικίας του ανθρώπου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται πολλά από τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά. Όπως περιγράφηκε και προηγουμένως, η μειωμένη επιτυχία της ανοσοθεραπείας πιθανόν να οφείλεται σε ποιοτικές μεταβολές των T κυττάρων. Κατά συνέπεια, η χρήση αυτόλογων T κυττάρων ηλικιωμένων σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας μπορεί να μη αποτελεί την καλύτερη επιλογή, όπως φάνηκε από το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου.<sup>4,32</sup>

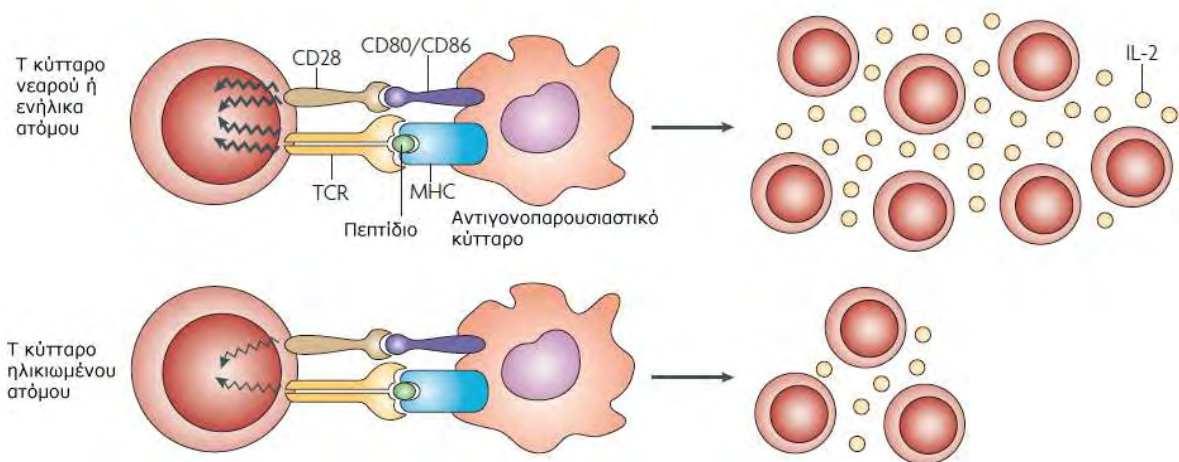
Κεντρικό γεγονός στο φαινόμενο της γήρανσης του ανοσιακού συστήματος, αποτελεί η γήρανση του T κυτταρικού πληθυσμού. Με την ηλικία, οι μεταβολές που πραγματοποιούνται στα T κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν σε δύο επίπεδα, σε επίπεδο κυττάρων και σε επίπεδο πληθυσμού. Σε κυτταρικό επίπεδο παρατηρείται μειωμένη σηματοδότηση, αλλά και



εξάντληση των κυττάρων λόγω των συνεχών διαιρέσεων, με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται σε γερασμένα Τ κύτταρα με διαφορετικά φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.<sup>6</sup> Σε επίπεδο πληθυσμού, οι μεταβολές που πραγματοποιούνται προϋούσης της ηλικίας, είναι αποτέλεσμα τεσσάρων γεγονότων: της ατροφίας του θύμου αδένου, της μείωσης του αριθμού των παρθένων Τ κυττάρων, την μείωση της ποικιλομορφίας των TCR υποδοχέων και την συσσώρευση μνημονικών πληθυσμών με ειδικότητα έναντι συχνών αντιγόνων.<sup>6</sup> Όλα τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας των Τ κυττάρων να προστατεύουν τον οργανισμό έναντι νέων αλλά και παλιών παθογόνων, αλλά και τη μειωμένη ικανότητα του οργανισμού να αναπτύξει μια ειδική έναντι του όγκου απάντηση.<sup>7,8</sup>

### 1.2.1 Διαταραχές στη σηματοδότηση

Μελέτες σε Τ κύτταρα ηλικιωμένων επίμυων, έδειξαν ελλιπή σηματοδότηση των κυττάρων αυτών λίγα λεπτά μετά την ενεργοποίηση μέσω του TCR, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα νεαρών (Εικόνα 3).<sup>9</sup> Αντίθετα, στα CD4 Τ κύτταρα των ηλικιωμένων δοτών παρουσιάσθηκε μειωμένη ικανότητα σχηματισμού ανοσολογικής σύναψης, παρόλο που η συγκέντρωση ή η ενζυμική δραστικότητα διάφορων πρωτεϊνών/ενζύμων δεν διέφερε σημαντικά. Η μειωμένη ικανότητα σχηματισμού της σύναψης, επηρεάζει και την παραγωγή IL-2 από τα κύτταρα αυτά, όπως και την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Επίσης, η αναποτελεσματική συναρμολόγηση των ινιδίων του κυτταροσκελετού και η γλυκοσυλίωση των επιφανειακών πρωτεϊνών των Τ κυττάρων έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένη σηματοδότηση των κυττάρων αυτών μέσω των πρωτεϊνών της επιφάνειας. Αντίθετα, απογλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών της επιφάνειας έδειξε, *in vitro*, ότι μπορεί να επαναφέρει την λειτουργία των CD4 Τ κυττάρων ηλικιωμένων πειραματόζων.



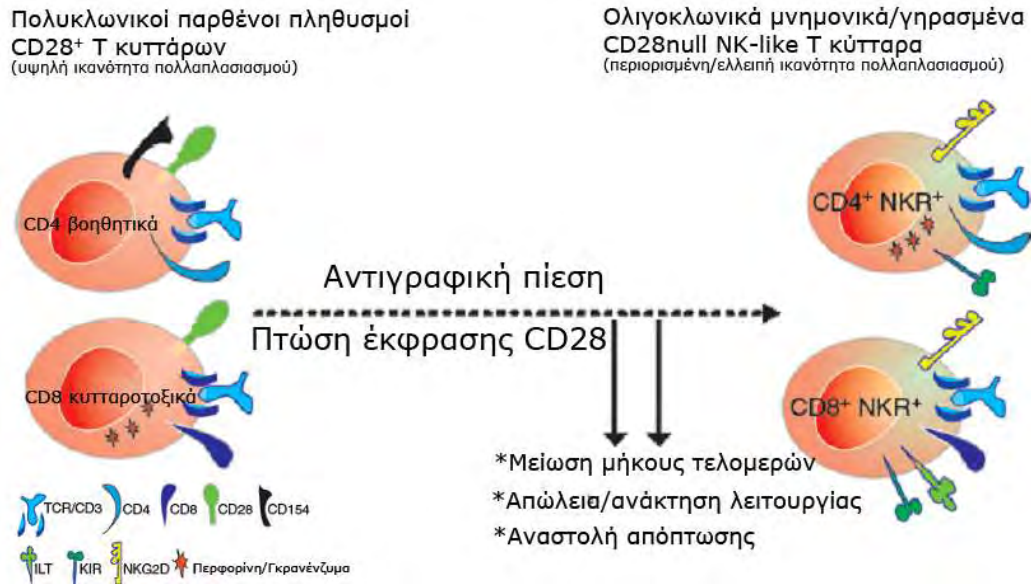
**Εικόνα 3.** Με την ηλικία παρατηρείται μειωμένη ικανότητα σχηματισμού της ανοσολογικής σύναψης και μειωμένη απόκριση των Τ κυττάρων, έπειτα από ενεργοποίηση μέσω του TCR και του συνδεδεργετικού μονοπατιού παρατηρείται με την ηλικία. Τις μεταβολές αυτές ακολουθούν και η

ελάττωση της παραγωγή IL-2 όπως και μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών. Προσαρμοσμένη από [6]

### 1.2.2 Αντιγραφική γήρανση

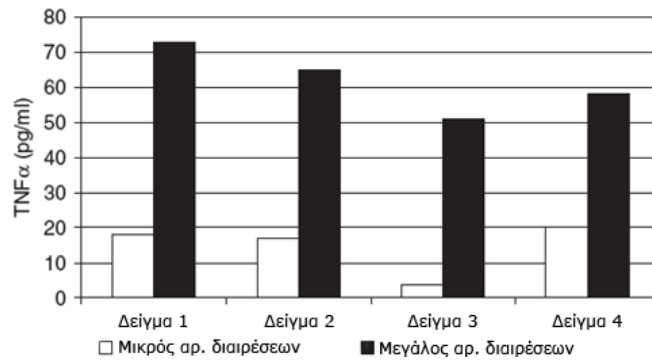
Ο τρόπος που μελετάται η γήρανση των Τ κυττάρων *in vitro* είναι μέσω της αντιγραφικής γήρανση, ενώ *in vivo*, παρατηρώντας τα χαρακτηριστικά αντιγονοειδικών κυτταρικών πληθυσμών σε ηλικιωμένους, καθώς δεν μπορεί να βρεθεί κάποιο άλλο αντιπροσωπευτικότερο πειραματικό μοντέλο. Έτσι, τα Τ κύτταρα, όπως και όλα τα σωματικά κύτταρα, σε ένα σύστημα *in vitro* καλλιέργειας, μπορούν να υποστούν γήρανση λόγω αντιγραφής.<sup>10,11</sup> Ο αριθμός των διαιρέσεων που μπορεί να πραγματοποιήσει ένα κύτταρο έχει περιγραφεί ως όριο Hayflick και σχετίζεται με το μήκος των τελομερών. Με βάση το μοντέλο της αντιγραφικής γήρανσης τα Τ κύτταρα, έπειτα από συνεχείς διαιρέσεις, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα απόπτωσης, η οποία συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα έκφρασης *bcl2* και μειωμένης έκφρασης της κασπάσης-3.<sup>12</sup>

Ο μηχανισμός ο οποίος ελέγχει τη διαδικασία της γήρανσης, στα ανθρώπινα κύτταρα, θεωρείται ότι είναι η σμίκρυνση του μήκους των τελομερών. Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλους τύπους κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες, το μήκος των τελομερών των ανθρώπινων Τ-κυττάρων σταδιακά μειώνεται. Η επαγόμενη από το αντιγόνο υπερέκφραση της τελομεράσης, μειώνεται σταδιακά, ώσπου τελικά χάνεται. Την κινητική της τελομεράσης φαίνεται να ακολουθεί η έκφραση του μορίου CD28.<sup>13</sup> Το CD28 είναι το κύριο συνδιεγερτικό μόριο των Τ κυττάρων. Η αλληλεπίδρασή του με τον αντίστοιχο προσδέτη, την πρωτεΐνη B7 (B7-1:CD80, B7-2:CD86), στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων αποτελεί το δεύτερο σήμα για την ενεργοποίηση των παρθένων Τ κυττάρων.<sup>14</sup> Η μείωση της έκφρασης του CD28 στα CD4 κύτταρα ακολουθείται και από μείωση της έκφρασης του CD154 (CD40L), καθιστώντας τα CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> Τ κύτταρα μη ικανά να παρέχουν βοήθεια για τον πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων.<sup>15</sup> Τα CD8<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> κύτταρα αποτελούν τελικώς διαφοροποιημένα (terminally differentiated effector lymphocytes) κύτταρα τα οποία δεν έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζεται μειωμένη ικανότητα λύσης είτε λόγω έλλειψης περφορίνης και κοκκιοενζύμων (granzymes) είτε λόγω ελαττωματικής σηματοδότησης για την εκκένωση των κοκκίων. Η μείωση της έκφρασης του CD28 και στο CD4 και στο CD8 πληθυσμό, ακολουθείται από την έκφραση υποδοχέων που βρίσκονται στα NK κύτταρα, από υποδοχείς (KIR) και του NKG2D. Αποτέλεσμα του μοντέλου της αντιγραφικής γήρανσης είναι η συσσώρευση τελικώς διαφοροποιημένων, ολιγοκλωνικών πληθυσμών, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στην απόπτωση και εκφράζουν υποδοχείς οι οποίοι είναι χαρακτηριστικοί των NK κυττάρων (Εικόνα 4).

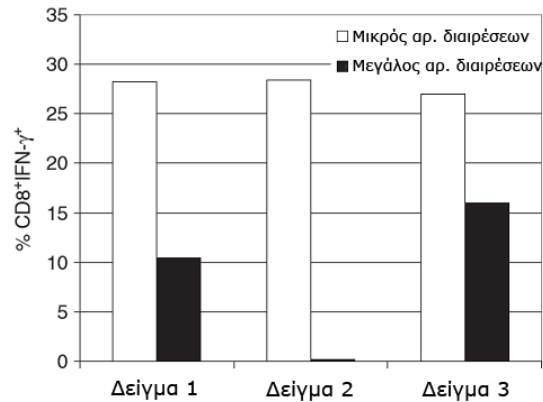


**Εικόνα 4.** Η πτώση της έκφρασης του CD28 είναι κεντρικό γεγονός στην μετάβαση πολυκλωνικών παρθένων T κυττάρων σε γερασμένα, ολιγκκλωνικά, ανθεκτικά στην απόπτωση κύτταρα τα οποία εκφράζουν υποδοχείς χαρακτηριστικούς των NK κυττάρων. Συνεχόμενη ενεργοποίηση με το ίδιο αντιγόνο και η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε πτώση της έκφρασης του CD28 και του μήκους των τελομερών που περιορίζει ή προκαλεί την πλήρη παύση πολλαπλασιασμού των T κυττάρων. Προσαρμοσμένη από [15].

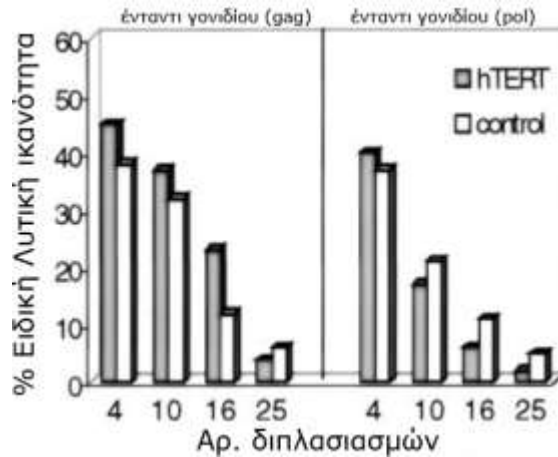
Έπειτα από διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής, η παραγωγή κυτταροκινών από τα T κύτταρα μεταβάλλεται. T κύτταρα που έχουν υποστεί αντιγραφική γήρανση, σε ένα σύστημα *in vitro* καλλιέργειας, παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή TNF- $\alpha$  (Εικόνα 5). Επίσης, σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- $\gamma$  παρατηρήθηκε στα ίδια κύτταρα, σε σχέση με την ποσότητα που παράγεται από κύτταρα που έχουν πραγματοποιήσει μικρότερο αριθμό διαιρέσεων (Εικόνα 6).<sup>16</sup> Ακόμη, παρόλο που η μείωση του μήκους των τελομερών, θεωρείται κεντρικό γεγονός της γήρανσης των T κυττάρων, CD8<sup>+</sup> T κύτταρα ειδικά για διαφορετικά αντιγόνα του HIV παρουσίασαν μείωση της αντιγόνο-ειδικής λύσης κυττάρων στόχων, ακόμη και μετά την επαγωγή της έκφρασης της τελομεράσης (Εικόνα 7).<sup>16,17</sup> Συνοψίζοντας, στα T κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί αντιγραφική γήρανση *in vitro*, παρατηρούνται μη αντιστρεπτές λειτουργικές και φαινοτυπικές αλλοιώσεις, οι οποίες δεν μπορούν να αναστραφούν ακόμη και με την επαναφορά της έκφρασης της τελομεράσης με μεθόδους γενετικής μηχανικής.



**Εικόνα 5.** Αυξημένα επίπεδα TNF-α έπειτα από διαδοχικές διαιρέσεις CD8 κύτταρα από διαφορετικούς δότες, ενεργοποιήθηκαν μη ειδικά και η συγκέντρωση των κυτταροκινών μετρήθηκε με ELISA («Μικρός αρ. διαιρέσεων» <10 διπλασιασμοί, «Μεγάλος αρ. διαιρέσεων» >20 διπλασιασμοί). Προσαρμοσμένη από [16].



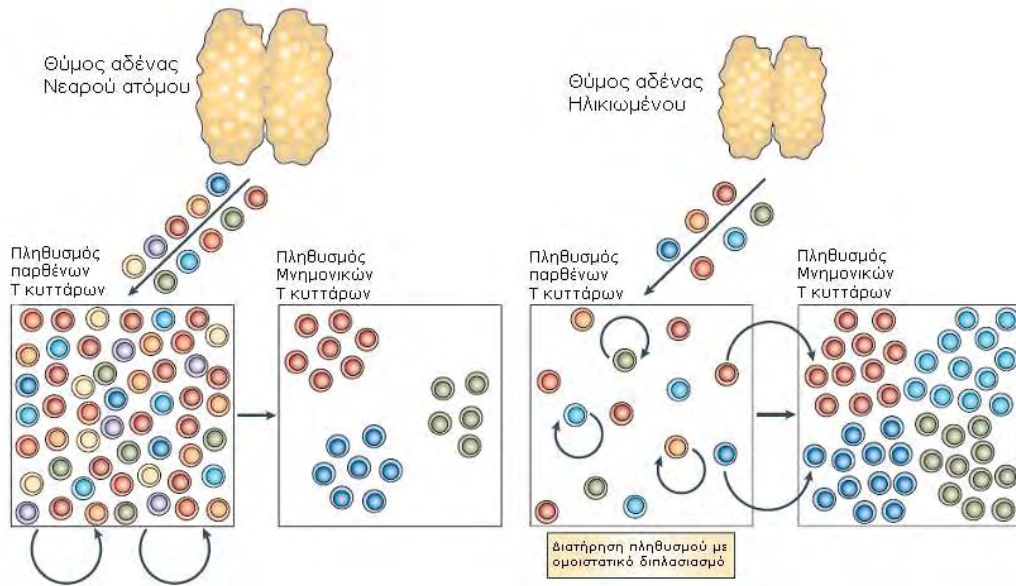
**Εικόνα 6.** Μείωση της παραγωγής IFN-γ έπειτα από διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής CD8 T κυττάρων. Μακροπρόθεσμες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν, ενεργοποιώντας CD8+ T κύτταρα από HLA-A2<sup>+</sup> από HIV-μολυσμένους ανθρώπους με τα αντίστοιχα πεπτίδια των ιικών γονιδίων gag, pol, env. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση IFN-γ τριών διαφορετικών δοτών, σε κύτταρα που έχουν πραγματοποιήσει μικρό ή μεγάλο αριθμό διαιρέσεων, μετρήθηκε χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Προσαρμοσμένη από [16].



**Εικόνα 7.** Μείωση της αντιγονοειδικής λυτικής ικανότητας σε σχέση με τον αριθμό των διαιρέσεων. Η επαναφορά της έκφρασης της τελομεράσης (hTERT), με μεθόδους γενετικής μηχανικής, δεν είναι ικανή να επαναφέρει την ικανότητα λύσης, για τα δυο διαφορετικά πεπτιδικά που μελετήθηκαν, σε σχέση με τον πληθυσμό στον οποίο δεν πραγματοποιήθηκε επαναφορά της έκφρασης της τελομεράσης. Προσαρμοσμένη από [16].

### 1.2.3 Μεταβολές σε επίπεδο πληθυσμού

Η κυριότερη μεταβολή, όσον αφορά τον T κυτταρικό πληθυσμό, που παρατηρείται με την ηλικία, είναι σταδιακή μείωση της λειτουργίας του θύμου (Εικόνα 8).<sup>18</sup> Ενώ ο συνολικός όγκος του θύμου αδένου δεν αλλάζει με την ηλικία, το αντίθετο συμβαίνει με τους διαφορετικούς ιστούς που συγκροτούν τον αδένα.<sup>19</sup> Τόσο η περιοχή του φλοιού (cortex) όσο και του μυελού (medulla), στις οποίες πραγματοποιείται η ωρίμανση και εκπαίδευση των T λεμφοκυττάρων μειώνονται σε όγκο από το πρώτο έτος της ζωής και ο χώρος αντικαθίσταται από λιπώδη ιστό. Η υποστρόφη της λειτουργίας του θύμου, έχει σαν αποτέλεσμα μια μικρότερης έκτασης παραγωγή παρθένων T κυττάρων. Έτσι, ο κύριος μηχανισμός ο οποίος συντηρεί την ποικιλομορφία, μετά την έκπτυξη του θύμου, είναι ο ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός. Όμως, οι συνεχείς διαιρέσεις και ο ανταγωνισμός των κυττάρων μεταξύ τους ως προς θρεπτικά και θέσεις προσκόλλησης, έχει σαν αποτέλεσμα τα παρθένα T κύτταρα των ηλικιωμένων να παρουσιάζουν μικρότερου μήκους τελομερή και περιορισμένη ποικιλομορφία των TCR υποδοχέων.<sup>20</sup>



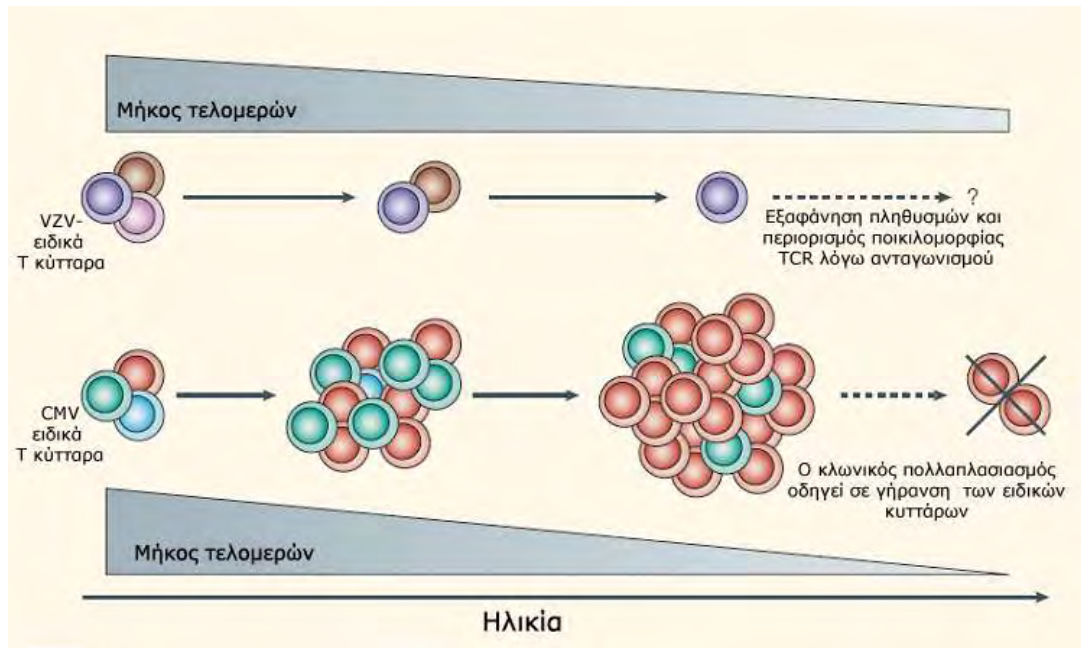
**Εικόνα 8.** Η υποστροφή του θύμου αδένος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιγότερων παρθένων T κυττάρων τα οποία διατηρούνται με ομοιοστατικό πολλαπλασιασμό. Επίσης, προόδου της ηλικίας παρατηρείται μείωση της ποικιλομορφίας των υποδοχέων των T κυττάρων, μείωση του ποσοστού των παρθένων T κυττάρων και συσσώρευση μνημονικών κυττάρων με περιορισμένης ποικιλομορφίας. Προσαρμοσμένη από [6].

Επιπλέον, βασικό χαρακτηριστικό των ηλικιωμένων, είναι η συσσώρευση μνημονικών πληθυσμών T κυττάρων ειδικών για συχνά, συνήθως ιικά, αντιγόνα. Σε επίμυες, η εξάπλωση κλωνικών CD8 T κυτταρικών πληθυσμών έχει δείχθει ότι επηρεάζει αρνητικά την λειτουργία T κυττάρων έναντι ιών οδηγώντας σε ανοσοανεπάρκεια.<sup>21</sup> Στους ανθρώπους, η συσσώρευση ειδικών έναντι του CMV T κυττάρων έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να μειώσει την ανοσιακή απόκριση έναντι άλλων ιών όπως για παράδειγμα του EBV αλλά και την αποδοτικότητα του εμβολιασμού έναντι του ιού της γρίπης.<sup>22,23</sup> Επίσης, έχει δείχθει, ότι σε σχέση με τα νεαρά άτομα, οι ηλικιωμένοι παρουσιάζουν αυξημένους αριθμούς T κυττάρων ειδικών για χρόνιες μολύνσεις, όπως στην περίπτωση του EBV και του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) (Εικόνα 9), ενώ ταυτόχρονα, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα να εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ).<sup>24,25,26</sup> Οι πληθυσμοί αυτοί παρουσιάζουν έναν τελικώς διαφοροποιημένο φαινότυπο (Terminally Differentiated), δείχνοντας ότι τα κύτταρα τα οποία έχουν εισέλθει στο στάδιο της αντιγραφικής γήρανσης, συσσωρεύονται με την ηλικία.

Παρά την αύξηση του αριθμού των ειδικών για συχνά ιικά αντιγόνα CD8 T κυττάρων, η ανοσιακή απόκριση έναντι των συγκεκριμένων ιών φαίνεται να είναι μειωμένη.<sup>27</sup> Δύο υποθέσεις μπορούν να εξαχθούν από αυτήν την παρατήρηση. Πρώτον ότι, οι κλώνοι που αναπτύσσονται δεν έχουν ικανοποιητική λειτουργικότητα και δεύτερον, οι ειδικοί πληθυσμοί που παρατηρούνται με την ηλικία αποτελούνται από κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν



μειωμένη συγγένεια με το ιικό αντιγόνο.<sup>25</sup> Η δεύτερη υπόθεση στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι κλώνοι με την μεγαλύτερη συγγένεια, παρουσιάζουν εντονότερη πρωτογενή απόκριση ενώ εξαφανίζονται συντομότερα σε χρόνιες μολύνσεις, πιθανόν λόγω γρηγορότερης εξάντλησης των κυττάρων αυτών.<sup>27</sup> Αντίθετα με τις χρόνιες μολύνσεις, T κύτταρα ειδικά για άλλα λιγότερο συχνά αντιγόνα, όπως για παράδειγμα για τον ιό της γρίπης ή τον VZV, δεν οδηγούνται σε γήρανση και παρουσιάζουν λιγότερο διαφοροποιημένους πληθυσμούς με μεγαλύτερα τελομερή.<sup>28,29</sup> Παρόλα αυτά είναι πιθανόν ότι αυτοί οι μνημονικοί πληθυσμοί να εξαλειφτούν λόγω του ανταγωνισμού με πληθυσμούς για κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες.<sup>29</sup>

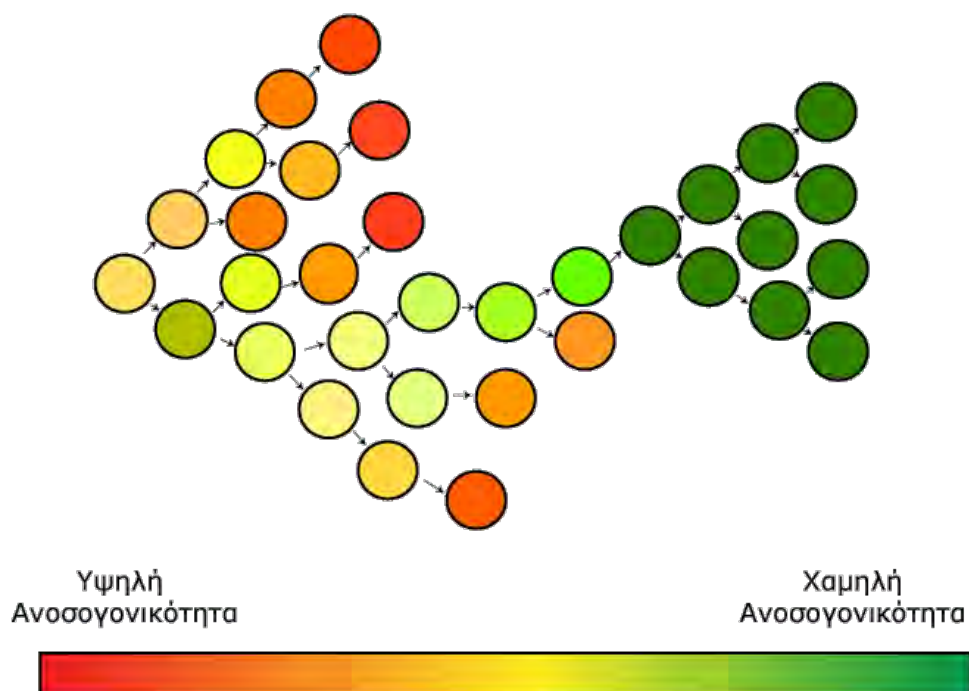


**Εικόνα 9.** Χρόνιες μολύνσεις με ιούς όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) οδηγούν σε κλωνικό πολλαπλασιασμό και μείωση του μήκους των τελομερών των ειδικών για τα ιικά πεπτιδία CD8<sup>+</sup> T κυττάρων. Ο συνεχής πολλαπλασιασμός, οδηγεί σε αντιγραφική γήρανση και εξάντληση των κυττάρων αυτών, μειώνοντας την ποικιλομορφία των ειδικών για τα ιικά αντιγόνα TCRs στον μνημονικό πληθυσμό. Η εξάπλωση πληθυσμών για συχνά αντιγόνα έχει σαν αποτέλεσμα τον ανταγωνισμό των πληθυσμών αυτών με πληθυσμούς λιγότερο συχνών αντιγόνων για κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Προσαρμοσμένη από [29].

### 1.3 Προκλήσεις ανοσοθεραπείας

Στην περίπτωση της παθητικής ανοσοθεραπείας, η επιτυχία της μεθόδου βασίζεται στην παραδοχή ότι τα ειδικά έναντι του όγκου T κύτταρα θα μπορούν, μετά την *ex vivo* ανάπτυξη τους, να λύσουν ειδικά τα κύτταρα στόχους. Όμως, μία παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι η επίδραση της ανοσογήρανσης στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των T κυττάρων, το οποίο έχει σαν συνέπεια την αναποτελεσματικότητα των κυττάρων αυτών να προκαλέσουν

ικανοποιητικές έναντι του όγκου απαντήσεις.<sup>30,31</sup> Επιπλέον, μια δεύτερη και εξίσου σημαντική παράμετρος, είναι η επίδραση που ασκούν τα καρκινικά κύτταρα στα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, όπως περιγράφεται από την θεωρία της ανοσολογικής επιλογής.<sup>1</sup> Με βάση τη θεωρία αυτή, η ανάπτυξη του όγκου είναι αποτέλεσμα φυσικής επιλογής των καρκινικών κυττάρων, λόγω της εξελικτικής πίεσης που τους ασκείται από τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, με αποτέλεσμα να επιλέγονται κλώνοι καρκινικών κυττάρων με την μικρότερη ανοσογονικότητα (Εικόνα 10). Κατά συνέπεια, η χρήση αυτόλογων κυττάρων ηλικιωμένων ασθενών, να μην αποτελεί υποσχόμενη επιλογή για την θεραπεία της νόσου.



**Εικόνα 10.** Σύμφωνα με την θεωρία της ανοσολογικής επιλογής, το ανοσιακό σύστημα ασκεί εξελικτική πίεση στα εξαλλαγμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα να επιλέγονται τα καρκινικά κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν την μικρότερη ανοσογονικότητα.

Για την αντιμετώπιση, αυτών των δύο βασικών εμποδίων, έχει περιγραφεί η ανάγκη μελέτης των T λεμφοκυττάρων του ομφαλικού αίματος, ώστε τα κύτταρα αυτά να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας, αντί των αυτόλογων T κυττάρων.<sup>32</sup> Τα κύρια πλεονεκτήματα από την χρήση νεαρότερων T κυττάρων είναι ότι τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί στο ελάχιστο της επιπτώσεις της ανοσογήρανσης και της αντιγραφικής γήρανσης, ενώ ακόμη αναμένεται να αναγνωρίζουν καλύτερα τα καρκινικά κύτταρα, καθώς δεν έχουν ξανά έρθει σε επαφή με αυτά. Η ανάγκη χρήσης νεαρότερων κυττάρων, έχει διατυπωθεί και προηγουμένως, όπου είχε προταθεί η προληπτική αποθήκευση λεμφοκυττάρων από νεαρά φυσιολογικά άτομα, με σκοπό να υπάρχουν άμεσα διαθέσιμα



νεαρά λεμφοκύτταρα, σε περίπτωση που χρειαστεί το ίδιο το άτομο, μετέπειτα στην ζωή του.<sup>33</sup> Επιπλέον οι τελευταίες εξελίξεις γύρω από τις εφαρμογές των κυττάρων του ομφαλικού αίματος αλλά και την ικανότητα ανάπτυξης των T λεμφοκυττάρων, του βιολογικού υλικού αυτού, οδήγησαν στην αρχική πρόταση, ότι δηλαδή το ομφαλικό αίμα μπορεί να αποτελέσει πηγή ανάπτυξης CD8 T κυτταρικών κλώνων, ώστε τα κύτταρα αυτά να χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα παθητικής ανοσοθεραπείας.

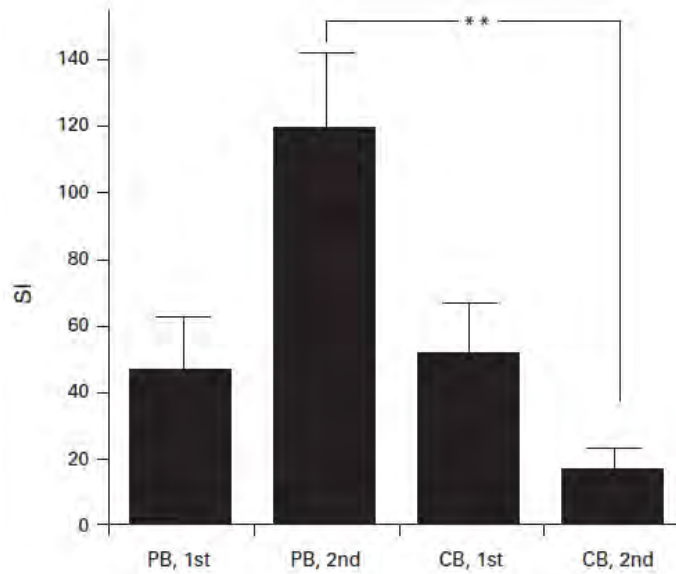
#### **1.4 Ομφαλικό αίμα**

Μέχρι σήμερα, το ομφαλικό αίμα, παρουσιάζει πλεονεκτήματα και έχει εφαρμοσθεί επιτυχώς αντί της μεταμόσχευσης μυελού των οστών.<sup>34,35</sup> Επίσης, στο ομφαλικό αίμα περιέχονται αρχέγονα κύτταρα ικανά να διαφοροποιηθούν εκτός από κύτταρα του αιμοποιητικού, σε επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και κύτταρα του νευρικού ιστού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Γι' αυτόν τον λόγο μελετάται η χρήση τους για την θεραπεία διαφόρων καρδιαγγειακών, νευρολογικών, ορθοπεδικών ή ενδοκρινικών παθήσεων.<sup>36</sup>

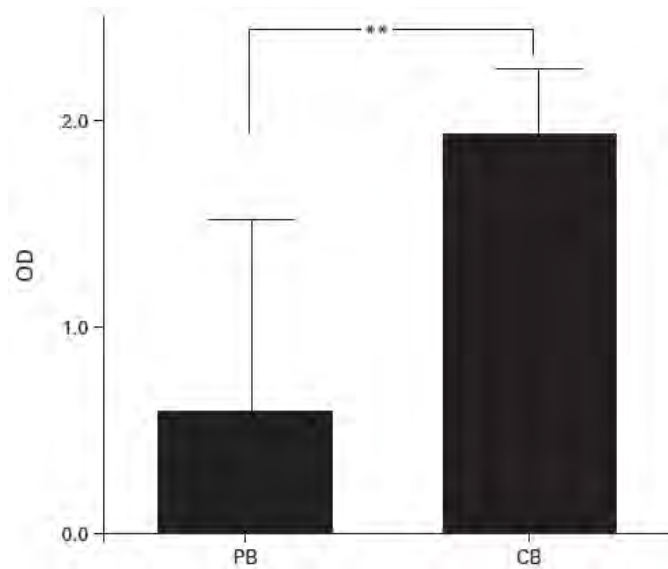
Για να εξετάσουμε την άποψη ότι από το ομφαλικό αίμα μπορούν να αναπτυχθούν CD8 T κυτταρικοί κλώνοι, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα παθητικής ανοσοθεραπείας, υπάρχουν ορισμένα ερωτήματα που πρέπει να διευκρινιστούν. Καθώς το ομφαλικό αίμα αποτελεί ένα βιολογικό υλικό το οποίο έχει αρχίσει να μελετάται τα τελευταία χρόνια, θα πρέπει να μελετηθεί η βιολογία των T λεμφοκυττάρων στο υλικό αυτών αλλά και η ύπαρξη όπως και η δυνατότητα ανάπτυξης T λεμφοκυττάρων με συγκεκριμένη ειδικότητα.

##### **1.4.1 T κύτταρα στο ομφαλικό αίμα**

Τόσο ο CD4 όσο και ο CD8 T κυτταρικός πληθυσμός του ομφαλικού αίματος αποτελείται, κυρίως, από παρθένα κύτταρα τα οποία εκφράζουν την ισομορφή CD45RA.<sup>37</sup> Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών, έπειτα από πρωτογενή ενεργοποίηση δεν φαίνεται να διαφέρει με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των αντίστοιχων κυττάρων των ενηλίκων.<sup>38</sup> Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί μειωμένος πολλαπλασιασμός των T κυττάρων του ομφαλικού αίματος, έπειτα από δευτερογενή ενεργοποίηση (Εικόνα 11).<sup>39</sup> Η μειωμένη σηματοδότηση μέσω του Ras μπορεί να αιτιολογήσει αυτό το φαινόμενο, ενώ αντίθετα η σηματοδότηση μέσω του συνδιεγερτικού μονοπατιού, της πρωτεΐνης του CD28, δεν φαίνεται να επηρεάζεται.<sup>40</sup> Επίσης, αυξημένα επίπεδα απόπτωσης έχουν παρατηρηθεί στα T κύτταρα του ομφαλικού αίματος, έπειτα από ενεργοποίηση, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ενηλίκων (Εικόνα 12).<sup>39</sup>



**Εικόνα 11.** Πολλαπλασιασμός CD4 T κυττάρων ομφαλικού αίματος έπειτα από πρωτογενή ή δευτερογενή ενεργοποίηση. Προσαρμοσμένη από [39].



**Εικόνα 12.** Επίπεδο απόπτωσης έπειτα από πρωτογενή MLC, όπως μελετήθηκαν με τη μέθοδο Tunel. Ο CD4 T κυτταρικός πληθυσμός του ομφαλικού αίματος, παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα απόπτωσης σε σχέση με τον CD4 T κυτταρικό πληθυσμό περιφερικού αίματος ενηλίκων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα της οπτικής πυκνότητας. ( $P < 0.01$ ). Προσαρμοσμένη από [39].

Η μειωμένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT-1, ενός βασικού μεταγραφικού παράγοντα για την έκφραση κυτταροκινών από τα T κύτταρα του ομφαλικού αίματος, θεωρείται η αιτία της μειωμένης αντίδρασης κατά του μοσχεύματος κατά τις μεταμοσχεύσεις.<sup>41</sup> Τα επίπεδα της πρωτεΐνης του μεταγραφικού παράγοντα NFAT-1 είναι σημαντικά χαμηλότερα σε μη ενεργοποιημένα T κύτταρα του ομφαλικού αίματος, σε σχέση με

τα αντίστοιχα κύτταρα περιφερικού αίματος ενηλίκων και αυξάνονται μόνο μετά από παρατεταμένη ενεργοποίηση μέσω του TCR, όπου και πάλι πλησιάζουν το 45% των επιπέδων της πρωτεΐνης που μετρήθηκε σε αντίστοιχα κύτταρα ενηλίκων. Ένα microRNA, το miR-184, αναστέλλει την πρωτεϊνική έκφραση του NFAT1 στα CD4 Τ κύτταρα.<sup>42</sup> Η ενδογενής έκφραση του miR-184 στα Τ κύτταρα του ομφαλικού αίματος είναι 58.4-φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ενηλίκων, ενώ ο τρόπος με τον οποίο το miR-184 εμποδίζει την παραγωγή του NFAT1 είναι μέσω υβριδισμού με την αλληλουχία-στόχο στο mRNA του NFATc2 και αναστολή της μετάφρασης, χωρίς αποικοδόμηση του μορίου mRNA.

Επιπλέον, η μεταγραφή διαφόρων κυτταροκινών, όπως της IFN- $\gamma$  και του TNF- $\alpha$  ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα NFAT-1.<sup>43</sup> Η μειωμένη έκφραση του NFAT1 στα Τ κύτταρα του ομφαλικού αίματος σχετίζεται και με την μειωμένη παραγωγή IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  από τα ίδια κύτταρα έπειτα από ενεργοποίηση μέσω του TCR.<sup>41</sup> Πραγματοποιώντας μελέτη της έκφρασης γονιδίων στον CD4 Τ πληθυσμό ομφαλικού αίματος, με μικροσυστοιχίες, βρέθηκε ότι πολλά γονίδια που εξαρτώνται από το μονοπάτι του NFAT παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση.<sup>44</sup> Όσον αφορά την έκφραση των κυτταροκινών, η ανάλυση μικροσυστοιχιών αποκάλυψε μειωμένη έκφραση τόσο των Th1 όσο και των Th2 κυτταροκινών όπως και χημειοκινών.

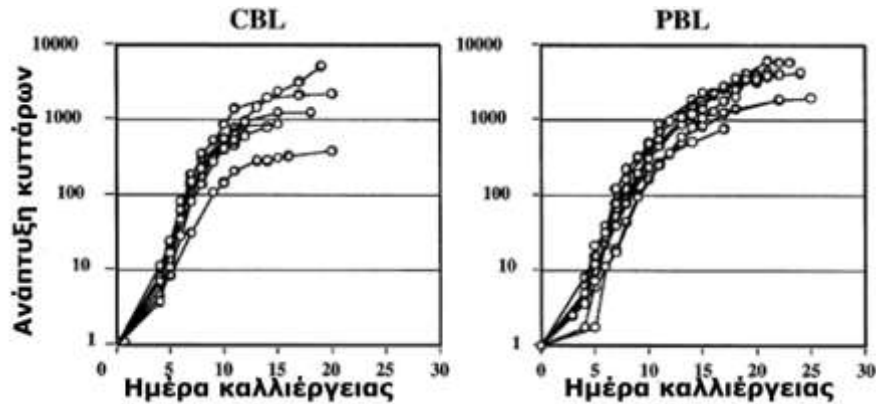
Αντίθετα με την έκφραση άλλων κυτταροκινών, η έκφραση της IL-2 δεν φάνηκε να διαφέρει μεταξύ των Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος και αυτών των ενηλίκων, τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης.<sup>44</sup> Καθώς ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της IL-2, θα ήταν αναμενόμενο η έκφραση του γονιδίου να ήταν μειωμένη στα Τ κύτταρα του ομφαλικού αίματος. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ανοσοκαθήλωσης χρωματίνης (chromatin immunoprecipitation), παρατηρήθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας BACH2 είναι προσδεσμένος στον υποκινητή του γονιδίου της IL-2, ενώ από πειράματα αποσιώπησης του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα BACH2 έδειξαν ότι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα αυτού είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί η έκφραση της IL-2, όταν τα επίπεδα του NFAT1 είναι μειωμένα.<sup>45</sup>

#### **1.4.2 Ανάπτυξη Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος**

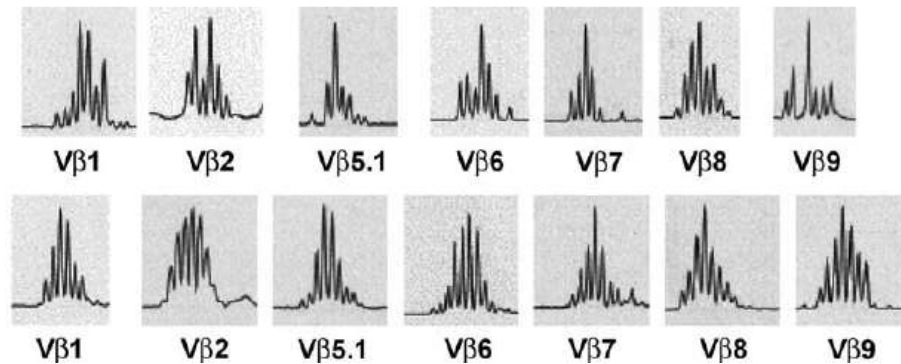
##### *Μη-ειδική ανάπτυξη Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος*

Τα Τ κύτταρα του ομφαλικού αίματος μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro*. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πρωτόκολλα τόσο για τον μη ειδικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, όσο και για την ανάπτυξη Τ κυττάρων ειδικών για συγκεκριμένα αντιγόνα. Ενεργοποίηση με αντι-CD3 αντισώμα ή αντι-CD3/CD28 αντισώματα παρουσία IL-2, έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος, σε παρόμοια επίπεδα με τα αντίστοιχα κύτταρα του περιφερικού αίματος ενηλίκων (Εικόνα 13).<sup>46,47</sup> Ο CD8

όπως και ο CD4 πληθυσμός του ομφαλικού αίματος μετά το τέλος της καλλιέργειας αποτελούταν κυρίως από μνημονικούς πληθυσμούς ( $CD27^+CD28^-$ ,  $CD27^-CD28^+$ ,  $CCR7^-CD45RA^-$ ,  $CCR7^+CD45RA^-$ ).<sup>47</sup> Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε μείωση της ποικιλομορφίας των TCR υποδοχέων.<sup>47</sup> Αντίθετα, μετά το τέλος της καλλιέργειας, η κατανομή των διαφορετικών TCR υποδοχέων πλησίαζε περισσότερο την κανονική κατανομή σε σχέση με την αντίστοιχη εικόνα για την ημέρα 0 της καλλιέργειας (Εικόνα 14), δείχνοντας ότι ο T κυτταρικός πληθυσμός του ομφαλικού αίματος μπορεί να αναπτυχθεί *in vitro* διατηρώντας την ποικιλομορφία των TCR υποδοχέων.



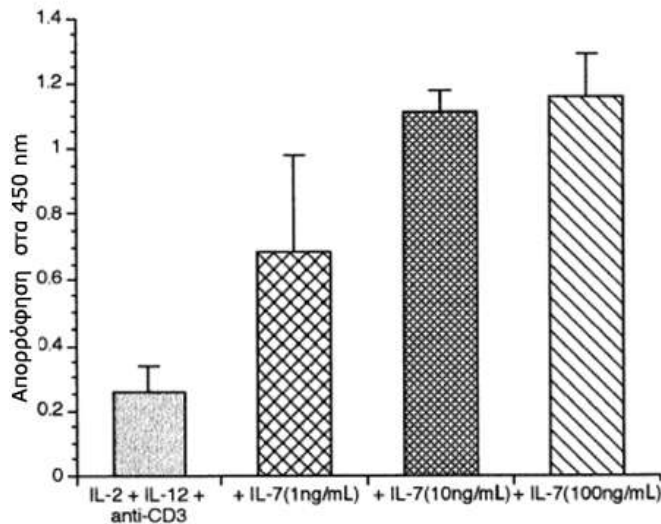
**Εικόνα 13.** Ανάπτυξη T κυττάρων ομφαλικού και περιφερικού αίματος κατά τη διάρκεια καλλιέργειας 14 ημερών. Η ενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντι-CD3 αντίσωμα, σε θρεπτικό μέσο RPMI παρουσία  $rIL-2$  (175U/mL). Την ημέρα 4 πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων και μεταφορά σε μη-καλυμμένες φλάσκες παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης  $IL-2$ . Προσαρμοσμένη από [46].



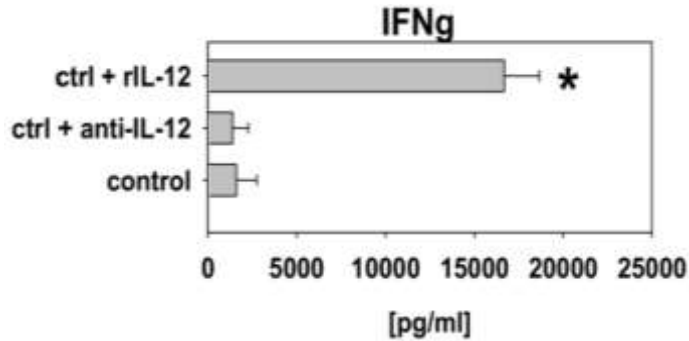
**Εικόνα 14.** Μη ειδική ενεργοποίηση με αντι-CD3 αντίσωμα και ανάπτυξη T κυττάρων ομφαλικού αίματος, δεν μεταβάλλει την ποικιλομορφία των TCR υποδοχέων. Στην επάνω σειρά παρουσιάζεται η ποικιλομορφία των TCR υποδοχέων την ημέρα 0 και στην κάτω σειρά, η ποικιλομορφία μετά το τέλος της καλλιέργειας. Προσαρμοσμένη από [47].

Ορισμένες κυτταροκίνες, όπως η  $IL-7$  και  $IL-12$ , φαίνεται να είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των T κυττάρων του ομφαλικού αίματος. Η προσθήκη  $IL-7$  σε συνδυασμό με  $IL-2$ ,

IL-12 και ενεργοποίηση με αντι-CD3, φαίνεται να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος, σε ένα σύστημα σύντομης καλλιέργειας (48 ωρών), ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μεταξύ των συγκεντρώσεων 10 και 100ng/mL (Εικόνα 15).<sup>48,49</sup> Από προηγούμενες μελέτες, έχει δειχθεί ότι η IL-7 αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NFAT.<sup>50</sup> Η προσθήκη της IL-7 πιθανόν να αντισταθμίζει τα μειωμένα επίπεδα αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, δεδομένης της μειωμένης έκφρασης που παρατηρήθηκε στα Τ κύτταρα του ομφαλικού αίματος.<sup>41</sup> Αντίθετα, η προσθήκη της IL-12 φαίνεται να είναι σημαντική για την διαφοροποίηση των Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος. Όταν ενεργοποιήθηκαν Τ κύτταρα ομφαλικού αίματος με anti-CD3/CD28 αντισώματα δεν παρατηρήθηκε παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα κύτταρα αυτά. Προσθήκη IL-12 αύξησε σημαντικά την παραγωγή IFN- $\gamma$ , ενώ όταν μαζί με την IL-12 προστέθηκε αντι-IL12p70 αντίσωμα, παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της παραγωγή IFN- $\gamma$  (Εικόνα 16).<sup>51</sup> Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το εύρημα ότι συνεχής σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της IL-12 οδηγεί στη διαφοροποίηση των Τ κυττάρων σε Th1 φαινότυπο.<sup>52</sup>



**Εικόνα 15.** Πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων έπειτα από 48 ώρες καλλιέργειας. Τα Τ λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν με αντι-CD3 αντίσωμα, παρουσία IL-2, IL-12 και διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-7. Προσαρμοσμένη από [49].



**Εικόνα 16.** Προσθήκη IL-12 στην καλλιέργεια έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή IFN- $\gamma$ . Προσαρμοσμένη από [51].

#### Ανάπτυξη ειδικών έναντι ιικών αντιγόνων CD8 T κυττάρων από το ομφαλικό αίμα

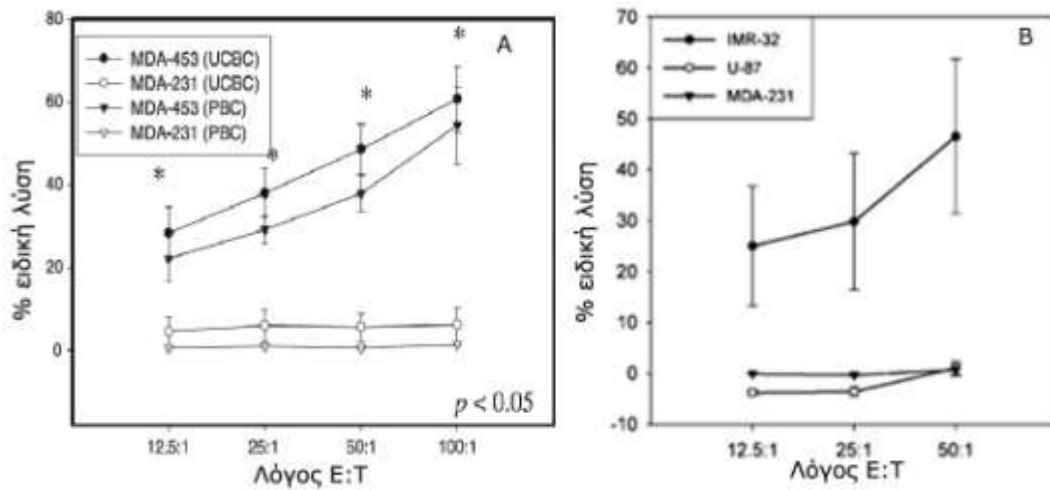
Σε νεότερη μελέτη, αναπτύχθηκαν T κυτταρικές γραμμές, από κύτταρα ομφαλικού αίματος, με ειδικότητα έναντι των ιών CMV, EBV και του Adv.<sup>53</sup> Οι ιοί αυτοί αποτελούν παράγοντες κινδύνου και θνησιμότητας σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, με αποτέλεσμα η παραγωγή T κυττάρων ειδικών έναντι των αντιγόνων των ιών αυτών να παρουσιάζει κλινικό ενδιαφέρον. Μετά από δύο περίπου εβδομάδες καλλιέργειας παρουσία των κυτταροκινών IL-7, IL-12, IL-15 και χρησιμοποιώντας αυτόλογα δενδριτικά ή EBV μετασχηματισμένα κύτταρα, αναπτύχθηκαν T κυτταρικές γραμμές οι οποίες παρουσίασαν ειδική λυτική ικανότητα *in vitro*. Αντίθετα με άλλες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια για την ενεργοποίηση των T κυττάρων, στην συγκεκριμένη εργασία, δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα δενδριτικά κύτταρα που εκφράζουν πρωτεΐνες επιφανείας του CMV ή του Adv, για την ανάπτυξη CMV και Adv ειδικών πληθυσμών, ενώ για την ανάπτυξη EBV ειδικών T κυττάρων η αντιγονοπαρουσίαση πραγματοποιήθηκε από EBV μετασχηματισμένα κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτού του συστήματος αντιγονοπαρουσίασης είναι ότι δημιουργήθηκαν CD4 και CD8 T κυτταρικοί πληθυσμοί για μια πληθώρα επιτόπων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα διαφυγής των ιών-στόχων.

#### 1.4.3 Ανάπτυξη ειδικών έναντι του όγκου T κυττάρων, από το ομφαλικό αίμα

##### Ανάπτυξη ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων από ομφαλικό αίμα

Εκτός από την μη ειδική ανάπτυξη των T κυττάρων του ομφαλικού αίματος, υπάρχουν και ορισμένες μελέτες οι οποίες περιγράφουν ανάπτυξη T κυττάρων ειδικών για αντιγόνα των όγκων. Για την ανάπτυξη ειδικών πληθυσμών χρησιμοποιούνται δενδριτικά κύτταρα σαν αντιγονοπαρουσιαστικά. Ειδικότερα, CD8 κύτταρα ειδικά για το Her2/neu E75 πεπτίδιο και τα αντιγόνα του νευροβλαστώματος αναπτύχθηκαν, έπειτα από ενεργοποίηση με ώριμα δενδριτικά τα οποία είχαν επωασθεί με το αντίστοιχο πεπτίδιο για την πρώτη περίπτωση, ή έπειτα από ενεργοποίηση με δενδριτικά στα οποία προστέθηκαν λυμένα καρκινικά κύτταρα

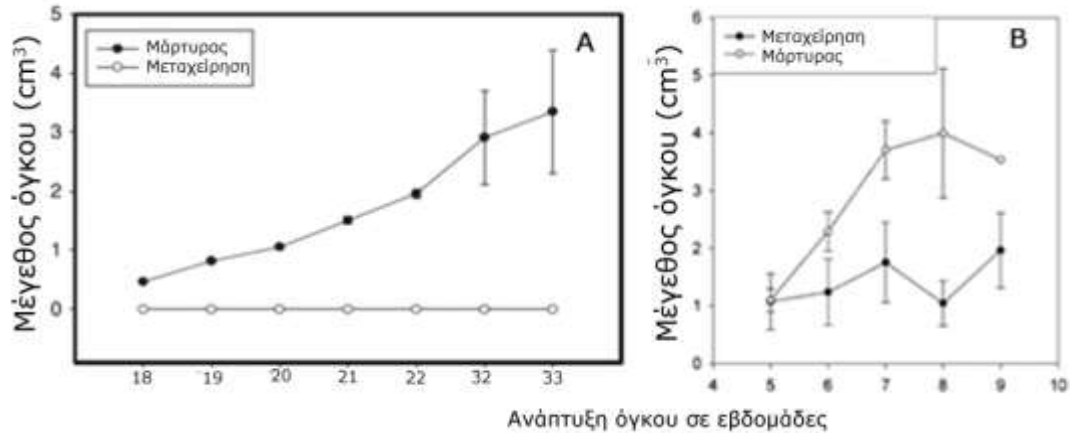
νευροβλαστώματος κατά την ωρίμανσή τους, για την δεύτερη περίπτωση, παρουσία μόνο IL2 50U/mL.<sup>54,55</sup> Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με αυτές τις δύο μεθόδους, παρουσίασαν ειδική κυτταροτοξικότητα *in vitro*. Τα ειδικά για το Her2/neu E75 πεπτιδίο, μπορούσαν να λύσουν ειδικά την καρκινική γραμμή MDA-453 η οποία εκφράζει υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Her2/neu, ενώ δεν παρατηρήθηκε λύση της καρκινικής γραμμής MDA-231, η οποία εκφράζει χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης (Εικόνα 17, Α). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε διαφορά της ικανότητας λύσης των κυττάρων στόχων, μεταξύ CTLs προερχόμενων από ομφαλικό ή περιφερικό αίμα.<sup>54</sup> Ομοίως, και τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν έναντι των αντιγόνων του νευροβλαστώματος, παρουσίασαν ειδική λυτική ικανότητα έναντι της καρκινικής γραμμής IMR-32 (νευροβλάστομα), ενώ δεν παρατηρήθηκε λύση έναντι των γραμμών U-87 (γλιοβλάστομα), MDA-231 (καρκινικά κύτταρα μαστού) (Εικόνα 17, Β).<sup>55</sup>



**Εικόνα 17.** *In vitro* κυτταροτοξικότητα CTLs. Α) CTLs με ειδικότητα έναντι του Her2/neu E75 πεπτιδίου, προερχόμενα από ομφαλικό (UCBC) ή περιφερικό αίμα (PBC), έναντι των γραμμών καρκίνου του μαστού MDA-453 και MDA-231. Η ειδική κυτταροτοξικότητα είναι σημαντικά μεγαλύτερη έναντι της καρκινικής γραμμής MDA-453, η οποία εκφράζει υψηλά επίπεδα του πεπτιδίου Her2/neu E75, σε σχέση με την γραμμή MDA-231, η οποία εκφράζει χαμηλά επίπεδα του πεπτιδίου. Επιπλέον, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ CTLs προερχόμενων από ομφαλικό ή περιφερικό αίμα. Β) CTLs ειδικά έναντι των αντιγόνων του νευροβλαστώματος προερχόμενα από ομφαλικό αίμα, παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής γραμμής IMR-32 (νευροβλάστομα), ενώ δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών γραμμών U-87 (γλιοβλάστομα) ή MDA-231 (καρκίνος του μαστού). Προσαρμοσμένη από [54, 55].

Εκτός από την *in vitro* μελέτη, η λειτουργία των ίδιων κυττάρων μελετήθηκε και *in vivo*. Σε ανοσοκατεσταλμένους επίμυες, αρχικά μεταμοσχεύθηκε η αντίστοιχη καρκινική γραμμή και μετά από δύο ή τρεις εβδομάδες, χορηγήθηκαν εβδομαδιαίως, οι αντίστοιχες κυτταρικές γραμμές T κυττάρων με ειδικότητα έναντι του Her2/neu E75 πεπτιδίου ή των αντιγόνων του νευροβλαστώματος.<sup>54,55</sup> Σε σχέση με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου, στους επίμυες όπου

χορηγήθηκαν οι Τ κυτταρικές γραμμές, περιορίστηκε η ανάπτυξη του όγκου, ενώ με βάση τις ιστολογικές μελέτες, δεν παρατηρήθηκε μετάσταση (Εικόνα 18, Α και Β). Επιπλέον, όλα τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου, στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η καρκινική γραμμή IMR-32, απεβίωσαν την τέταρτη εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 18, Β).<sup>55</sup> Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν, ότι τα ειδικά έναντι καρκινικών αντιγόνων Τ κύτταρα προερχόμενα από το ομφαλικό αίμα, όχι μόνο μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη του όγκου σε πειραματόζωα, αλλά επιπλέον, μπορούν να παρατείνουν τον χρόνο ζωής.



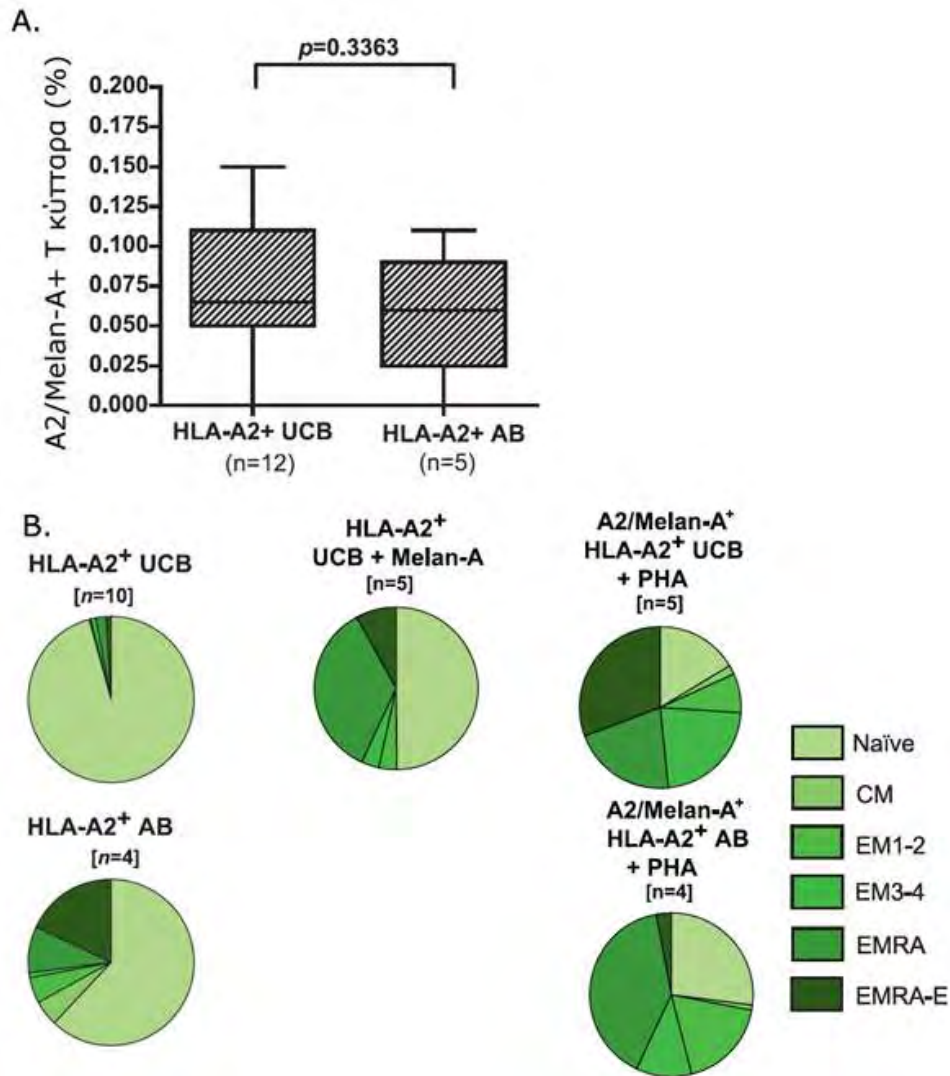
**Εικόνα 18.** *In vivo* θεραπευτικό αποτέλεσμα CTLs προερχόμενων από ομφαλικό αίμα. Α) CTLs ειδικά για το Her2/neu E75 αντιγόνο έναντι της καρκινικής γραμμής MDA-453 σε ανοσοκατεσταλμένα πειραματόζωα. Δύο εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση, πραγματοποιήθηκε εβδομαδιαίος εμβολιασμός με αντιγονοειδικά CTLs προερχόμενα από ομφαλικό αίμα. Το μέγεθος του όγκου μετρήθηκε και συγκρίνεται με την ομάδα ελέγχου. Κατά την όγδοη εβδομάδα, στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν CTLs δεν παρατηρήθηκε αύξηση του όγκου ή μετάσταση του όγκου σε άλλους ιστούς. Β) CTLs ειδικά για τα αντιγόνα του νευροβλαστώματος έναντι της καρκινικής γραμμής IMR-32. Τρεις εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση των καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε εβδομαδιαίος εμβολιασμός με αντιγονοειδικά CTLs προερχόμενα από ομφαλικό αίμα. Την τέταρτη εβδομάδα μετά την έναρξη των εμβολιασμών, όλα τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου είχαν αποβιώσει, ενώ μετάσταση παρατηρήθηκε και σε άλλους ιστούς. Αντίθετα στα ποντίκια που χορηγήθηκαν τα CTLs η ανάπτυξη του όγκου περιορίστηκε ενώ δεν παρατηρήθηκε μετάσταση. Προσαρμοσμένη από [54, 55].

### Συχνότητα ειδικών έναντι αντιγόνων CD8 Τ κυττάρων στο ομφαλικό αίμα

Οι μελέτες γύρω από την συχνότητα των ειδικών έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων CD8 Τ κυττάρων του ομφαλικού αίματος είναι περιορισμένες. Αναζητώντας στη βιβλιογραφία, μόνο σε μία μελέτη υπολογίστηκε η συχνότητα των CD8 Τ κυττάρων έναντι του αντιγόνου Melan-A/MART-1.<sup>56</sup> Για τον υπολογισμό της συχνότητας πραγματοποιήθηκε απ' ευθείας χρώση με HLA-πολυμερή ενώ η μέση συχνότητα των αντιγονοειδικών CD8 Τ κυττάρων υπολογίστηκε σε 0.04% στον πληθυσμό των CD8 κυττάρων (Εικόνα 19Α). Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων αυτών έδειξε ότι τα αντιγονοειδικά αυτά CD8 Τ κύτταρα παρουσίαζαν έναν



φαινότυπο παρθένων Τ κυττάρων την ημέρα της απομόνωσής τους, ενώ έπειτα από απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων αυτών χρησιμοποιώντας δενδριτικά κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά και κυτταροκίνες IL-7 (10ng/mL), IL-12 (10ng/mL) και IL-15 (5ng/mL), διαφοροποιήθηκαν σε μνημονικά και τελικώς διαφοροποιημένα Τ κύτταρα (Εικόνα 19B). Λειτουργική μελέτη των κυττάρων αυτών έδειξε ότι τα αντιγονοειδικά CD8 Τ κύτταρα του ομφαλικού αίματος, μπορούσαν να παράγουν IFN- $\gamma$  έπειτα από ειδική ενεργοποίηση, παρόλα αυτά όμως η παραγωγή IFN- $\gamma$  και ο αριθμός των κυττάρων που παρήγαγαν IFN- $\gamma$  ήταν χαμηλότερος στα κύτταρα του ομφαλικού αίματος σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ενηλίκων.



**Εικόνα 19.** Α) Συχνότητα CD8 Τ κυττάρων ειδικότητας έναντι του αντιγόνου Melan-A στο ομφαλικό (UCB) και περιφερικό αίμα (AB). Β) Φαινότυπος αντιγονοειδικών CD8 Τ κυττάρων πριν και μετά την ενεργοποίηση. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο φαινότυπος των κυττάρων, ομφαλικού (UCB) και περιφερικού (AB) αίματος την ημέρα 0. Στην δεύτερη στήλη παρουσιάζεται ο φαινότυπος του αντιγονοειδικού πληθυσμού, έπειτα από ενεργοποίηση με το ειδικό πεπτιδίο για δύο εβδομάδες. Στην

---

*τρίτη στήλη, παρουσιάζεται ο φαινότυπος απομονωμένων (sorted) κυττάρων έπειτα από δύο εβδομάδες ενεργοποίησης με ΡΗΑ.*

### **1.5 Υπόθεση Εργασίας**

Παρά τις εκτενείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας, το ποσοστό επιτυχίας της, παραμένει πολύ χαμηλό. Αυτή η χαμηλή αποτελεσματικότητα, ενδέχεται να οφείλεται σε παραμέτρους όπως η ανοσογήρανση αλλά και η χρόνια αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Ακόμη, γνωρίζουμε ότι, CD8 T κύτταρα ειδικότητας έναντι αντιγόνων των όγκων ανιχνεύονται τόσο σε ηλικιωμένους υγιείς όσο και σε ασθενείς με καρκίνο.<sup>65,71</sup> Σε μια προσπάθεια να παρακάμψουμε την επίδραση της ανοσογήρανσης στο ποιοτικά χαρακτηριστικά των T κυττάρων, θελήσαμε να μελετήσουμε τα κύτταρα αυτά στο ομφαλικό αίμα. Ειδικότερα, υποθέσαμε ότι στο ομφαλικό αίμα περιέχονται CD8 T κύτταρα με ειδικότητα έναντι των αντιγόνων του όγκου, όπως ανιχνεύθηκαν σε ηλικιωμένους, τα οποία είναι λειτουργικά ικανά να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Με βάση την υπόθεση αυτή, σκοπός της μελέτης ήταν ο υπολογισμός της συχνότητας των ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων στο ομφαλικό αίμα, καθώς και ο λειτουργικός τους χαρακτηρισμός.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

---

## 2. ΥΛΙΚΑ

### 2.1 Μονάδες Ομφαλικού Αίματος

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 9 μονάδες ομφαλικού αίματος. Οι μονάδες αυτές προέρχονται από τη δημόσια τράπεζα ομφαλικού αίματος του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IBEAA) και προσφέρθηκαν ευγενώς από την κ. Σταυροπούλου-Γκιόκα, ενώ προηγουμένως είχαν χαρακτηριστεί ως ακατάλληλες για την αποθήκευση βλαστοκυττάρων. Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 2-3 ημερών από την ημέρα λήψης των μονάδων, ενώ τα κύτταρα που συλλέχθηκαν είτε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα είτε παγώθηκαν, για μετέπειτα χρήση.

### 2.2 Πεπτίδια

Χρησιμοποιήθηκαν εννιαμερή πεπτίδια, γνωστής ικανότητας σύνδεσης με τα HLA-A2, ή -B35 που παρασκευάζονται με τη μεθοδολογία F-moc σε λυοφιλοποιημένη μορφή και σε καθαρότητα >90% (Abgent, San Diego, USA). Τα πεπτίδια διαλύονται σε DMSO σε συγκέντρωση 10 mg/mL και διατηρούνται στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους. 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 (Πίνακας 1).<sup>57</sup>

**Πίνακας 1.** Πεπτίδια αντιγόνων των όγκων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Πεπτίδιο	HLA	Αλληλουχία	Θέση	Εταιρεία	Βιβλιογραφία
MAGE-A3	A02	FLWGPRALV	271-279	Abgent, San Diego, USA	58
hTERT	A02	ILAKFLHWL	540-548	Abgent, San Diego, USA	59
Survivin	A02	LTLGEFLKL	96-104	Abgent, San Diego, USA	65
BMLF1	A02	GLCTLVAML	280-288	Abgent, San Diego, USA	60
CMV	A02	NLVPMVATV	495-503	Abgent, San Diego, USA	61

### 2.3 HLA-πολυμερή

HLA-πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν για την άμεση ανίχνευση αντιγονοειδικών CD8 T κυττάρων σε μεικτούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς και την απεικόνισή 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 φροριόχρωμα 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.<sup>62</sup> 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), προτυποποιήθηκαν για χρήση σε κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται από τους Karanikas et al., και προσφέρθηκαν ευγενώς από τον Prof. P. Coullie.<sup>67</sup> Τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων ελέγχου ήταν συνδεδεμένα με φθοριόχρωμα PE, ενώ τα HLA-πολυμερή των πεπτιδίων-μαρτύρων ήταν συνδεδεμένα με φθοριόχρωμα APC.

## 2.4 Καρκινικές Γραμμές – EBV-B Μετασχηματισμένα Κύτταρα

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) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Όνομα γραμμής	Προέλευση	HLA	Ανάπτυξη	Χρόνος διαίρεσης
GERL	Μελάνωμα	A01, A02	Προσκολλημένα	40-45 h
DAJU	EBV B κύτταρα	A01, A02	Σε διάλυμα	30-35 h
ROSI	EBV B κύτταρα	A24	Σε διάλυμα	55-60 h
SEE	EBV B κύτταρα	B35	Σε διάλυμα	40-45 h

## 2.5 Ορός

Για την καλλιέργεια των CTL χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές παρτίδες ορού ανθρώπινης προέλευσης, οι οποίες παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο (βλέπε παρ. 5.3.2). 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.

## 2.6 Λοιπά Υλικά

### α) Κυτταροκίνες

Για την διατήρηση και διέγερση των CTL αλλά και για την παραγωγή δενδριτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταροκίνες IL-2, IL-4, IL-7 και GM-CSF (Πίνακας 3). Οι κυτταροκίνες διαλύθηκαν σε 0.1%HS-IDc και διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

**β) Μονοκλωνικά αντισώματα**

Για τις κυτταρομετρικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

**Γ) Λοιπά υλικά**

Τα αναλώσιμα υλικά όπως και το σύνολο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 5).

**Πίνακας 3.** Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των CTL και την παραγωγή δενδριτικών κυττάρων.

Κυτταροκίνη	Όνομα αντιδραστηρίου	Εταιρεία	Αρ. καταλόγου
IL-2	Recombinant Human IL-2	R&D Systems	202-IL
IL-4	Recombinant Human IL-4	R&D Systems	204-IL
IL-7	Recombinant Human IL-7	R&D Systems	207-IL
GM-CSF	Recombinant Human GM-CSF	R&D Systems	215-GM

**Πίνακας 4.** Λίστα αντισωμάτων.

Αντιγόνο	Φθοριό-χρώμα	Εταιρεία	Αρ. καταλόγου	Περιγραφή	Κύτταρα
CD1a	PE	Immunotech	A07742	Γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας	Θυμοκύτταρα του φλοιού (κυρίως), Κύτταρα Langerhans, DCs, B, T
CD3	FITC	Immunotech	A07746	Αποτελεί μέρος του TCR υποδοχέα	T κύτταρα
CD4	PC5	Immunotech	A07752	Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη. Συνδέεται με το MHC II	T βοηθητικά κύτταρα και λιγότερο στα μονοκύτταρα
	PC7	Immunotech	737660		
CD8	FITC	Immunotech	A07756	Συνδέεται με το MHC I	T κύτταρα (CD8αβ), NK (CD8α)
	PC5	Immunotech	A07758		
	PC7	Immunotech	737661		
CD11c	PE	Immunotech	1760	Ιντεργκρίνη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, κοκκιοκύτταρα, DCs
CD14	FITC	Immunotech	IM0645U	Υποδοχέας του LPS	Μονοκύτταρα, Μακροφάγα, Ουδετερόφιλα, Κύτταρα Langerhans, Θυλακιάδη DCs
CD40	FITC	BD Bioscience	555588	Μέρος του TNFR	Ώριμα B, DCs, ινοβλάστες, μακροφάγα
CD45	FITC	Immunotech	A07782	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη	Σε όλα τα λεμφοκύτταρα
CD45RA	ECD	Immunotech	A07784		
	PC7	Immunotech	IM3548		
CD45RO	FITC	Immunotech	A07748		Παρθένα και τελικώς διαφοροποιημένα T κύτταρα
CD69	PE	Immunotech	A07787	Προσδέτης του CD28	Ενεργοποιημένα T κύτταρα
CD80	PC5	Immunotech	IM2656		
CD83	FITC	Immunotech	PN1M18534		
CD86	FITC	Immunotech	IM24104		
CCR7	PE	Immunotech	IM27294		
HLA-A2	APC	BD	BZL 00842	Υποδοχέας μετανάστευσης	Παρθένα και CM T κύτταρα
		Bioscience			
HLA-DR	PE	BIOZOL		HLA-02	Σε όλα τα κύτταρα που εκφράζουν MHC I
IFN-γ	PE	Immunotech	IM1639	HLA-DR	Αντιγονοπαρουσιαστικά
	PE	BD Bioscience	340449	IFN-γ	Ενεργοποιημένα T και NK

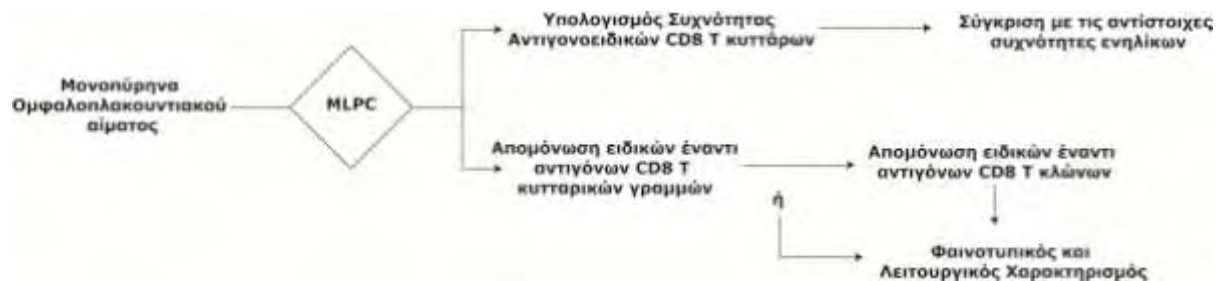
**Πίνακας 5. Θρεπτικά υλικά, διαλύματα, αναλώσιμα, εμπορικά kit.**

Αντιδραστήριο	Περιγραφή	Εταιρεία	Αρ. καταλόγου
1-μεθυλοτρυπτοφάνη	1-Methyl-DL-tryptophan 97% (1MW)		860646
2-ME	2-μερκαπτο-αιθανόλη	Gibco	31350-010
BD cytofix/cytoprmTM kit	BD cytofix/cytoprmTM kit	BD Bioscience	00-81014-4-c
BFA	Fast Immune Frefeldin A solution	BD Bioscience	347688
DMSO	DMSO	Sharlau Chemie SA, Barcelona, Spain	D5879
DNάση	Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, 100 mg/mL	Sigma	DN25
EDTA	UltraPure EDTA	Gibco	15575-038
FA	Formaldehyde Solution	Sharlau Chemie SA, Barcelona, Spain	FO 0010
Kit μαγνητικού διαχωρισμού PE	Human Pe Positive Selection Kit, EasySep	StemCell	18551-00001
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23227
VersaLyse Lysing Solution	VersaLyse Lysing Solution	Beckman Coulter	A09777
Βοδινός Ορός	Heat inactivated FBS	Gibco	10100-147
Διάλυμα CaCl <sub>2</sub>	Calcium Chloride 10%	-	
Διάλυμα PBS	10xPBS	Gibco	70013-065
Διάλυμα αμινοξέων	MEM aminoacids	Gibco	11140-035
Διάλυμα αντιβιοτικών	PSG	Gibco	10378-016
Ηπαρίνη	Heparin Leo		
Θρεπτικό μέσο	Iscoves (IMDM)	Gibco	21980-065
Λιποπολυσακχαρίτης	Lipopolysaccharides from <i>Escherichia coli</i> O127:B8	Sigma	L4516
Μαννόζη	D-(+)-mannose	Sigma	
Πιάτο καλλιέργειας F96	96 well Cell Culture Cluster, flat bottom	Costar	3596
Πιάτο καλλιέργειας U96	96 well Cell Culture Cluster, round bottom	Costar	3799
Πιάτο καλλιέργειας M24	24 well Cell Culture Cluster, flat bottom	Costar	3524
Πιάτο καλλιέργειας M48	24 well Cell Culture Cluster, flat bottom	Costar	3548
Τρυβλία με άγαρ	Gelose Count Tact		43501
Φικόλη	Ficoll Histopaque	Sigma	10771
Φλάσκες των 125cm <sup>2</sup>	125cm <sup>2</sup> Polystyrene Cell Culture Flask	Corning	431080
Φλάσκες των 25cm <sup>2</sup>	25cm <sup>2</sup> Polystyrene Cell Culture Flask	Corning	430639
Φλάσκες των 25cm <sup>2</sup> για ακτινοβόληση	25cm <sup>2</sup> Polystyrene Cell Culture Flask	Sars tedt, Inc. Newton, NC 28659 USA	83.1810
Φλάσκες των 75cm <sup>2</sup>	75cm <sup>2</sup> Polystyrene Cell Culture Flask	Corning	430641
Χρωστική	Trypan Blue	Gibco	15250-061

### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Ο στόχος της μελέτης ήταν ο υπολογισμός της συχνότητας των ειδικών έναντι καρκινικών αντιγόνων CD8 T κυττάρων στο ομφαλικό αίμα. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 9 μονάδες ομφαλικού αίματος, προερχόμενες από το νοσοκομείο παιδών «Αγία Σοφία», όπως περιγράφηκε προηγουμένως (παρ. 2.1). Στις μονάδες ομφαλικού αίματος αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μονοπύρηνων και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά είτε παγώθηκαν είτε χρησιμοποιήθηκε μέρος των κυττάρων αυτών για καλλιέργεια. Για τον υπολογισμό της συχνότητας των ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων στο ομφαλικό αίμα, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες, όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες.<sup>65,71</sup> Σε ορισμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν παραλλαγές της μεθόδου, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.5. Η συχνότητα των ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων που προέκυψε από μετά το πέρας των καλλιεργειών, συγκρίθηκε με την αντίστοιχη συχνότητα, αντίστοιχων κυττάρων ενηλίκων, όπως προέκυψε από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου.<sup>65,71</sup>

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αντιγονοειδικών πληθυσμών που αναπτύχθηκαν, με βάση το σύστημα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε. Οι T κυτταρικές γραμμές που αναπτύχθηκαν, καλλιεργήθηκαν περαιτέρω ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των ειδικών έναντι του αντιγόνου κυττάρων, ενώ σε ορισμένες επιχειρήθηκε η απομόνωση CD8 T κυτταρικών κλώνων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αντιγονοειδικών CD8 T κυττάρων για να προσδιοριστεί το στάδιο διαφοροποίησης αυτών (Εικόνα 20).



**Εικόνα 20.** Σύνοψη πειραματικής διαδικασίας. Πρωτεύων στόχος της εργασίας ήταν ο υπολογισμός της συχνότητας των ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου και ιικών αντιγόνων CD8 T κυττάρων στο ομφαλικό αίμα και σύγκριση της συχνότητας με τις αντίστοιχες συχνότητες ενηλίκων. Δευτερεύων στόχος της μελέτης ήταν η απομόνωση και ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός CD8 T κυτταρικών γραμμών/κλώνων.

#### 3.1 Απομόνωση – Διατήρηση – Ανάκτηση CBMCs/PBMCs

Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού και ομφαλικού αίματος απομονώθηκαν από ολικό αίμα ή από ασκό, αντίστοιχα, παρουσία πολυσακχαρίτη με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης



πυκνότητας και διαδοχικούς καθαρισμούς. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία 60-120 mL φλεβικού αίματος από ενήλικα δότη (2-5 U ηπαρίνης/mL αίματος, Heparin). Ακολούθησε προσθήκη του ολικού ή του ομφαλικού αίματος με αρχή έγχυση πάνω στη στιβάδα της φικόλης σε αναλογία 20-30 mL αίματος/20 mL φικόλης. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 min (400 g), σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Εν συνεχεία, έγινε συλλογή της στοιβάδας των μονοπύρηνων 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, 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 μια 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, (485,5 mL IMDNM, 5 mL PSG, 5 mL MEM, 0.5 mL 2ME) και 10% DMSO. Η εναιώρηση των κυττάρων στο ψυκτικό διάλυμα έγινε με βάση την συγκέντρωσή τους, περίπου  $20 \times 10^6$  CBMC/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.

### 3.2 Παρασκευή Ορού από Πλάσμα

Οι παρτίδες του ορού παρασκευάστηκαν από πλάσμα που προήλθε από κέντρα αιμοδοσίας και αποθηκεύθηκε στους -20 °C. Το πλάσμα είχε ελεγχθεί για HBV, HCV, HIV, HTLV1, HTLVII και σύφιλη και ήταν γνωστής ομάδας αίματος. Αρχικά παρασκευάζονται 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 °C για 24 h και την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (37 °C; ~30 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 °C; 1-2 h) μέχρι να παρατηρηθεί πήξη του υλικού. Με τη χρήση ξέστρου, από βαμβάκι, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του ορού από το ινώδογόνο, 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 °C; 30 min)

με συχνή ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε άμεσα σε παγωμένο νερό και αποθηκεύθηκε στους 4 °C μέχρι να διαπιστωθεί η στειρότητα της διαδικασίας.

Για τον έλεγχο της στειρότητας ελήφθησαν, από κάθε PS, δύο δείγματα των 500 µL. Μία σταγόνα τοποθετήθηκε για καλλιέργεια σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (Gelose Count Tact), ενώ δείγματα των 200 µL αναμιχθηκαν με 1.8 mL SF-IDc και τοποθετήθηκαν σε πλάκα καλλιέργειας M24. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (37 °C) για 48 h και ελέχθησαν για την παρουσία επιμόλυνσης. Εφόσον όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά ακολούθησε η Παρασκευή του ορού.

Για την παρασκευή της κάθε παρτίδας του ορού που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αναμιχθηκαν σε μπουκάλι 1000 mL, 500 mL ορού ομάδας A, 300 mL ορού ομάδας AB, 100 mL ορού ομάδας O και 100 mL ορού ομάδας B. 100 mL της ποσότητας αυτής διαμοιράστηκαν σε 10 μπουκάλια των 125 mL. Το υλικό αυτό τοποθετήθηκε στους 4 °C για 24 h και στη συνέχεια λήφθησαν διπλά δείγματα των 500 µL από το καθένα για έλεγχο στειρότητας. Τέλος, τα μπουκάλια των 125 mL αποθηκεύθηκαν στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους. Για την απόψυξη ποσότητας ορού, το μπουκάλι των 125 mL τοποθετείται στους 4 °C για 24 h. Η ποσότητα του ορού μεταφέρεται σε φιαλίδια 50 mL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (3500 rpm; 15 min; 4 °C). Αφαιρούνταν ποσότητα λίπους από την επιφάνεια των σωληναρίων, το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε νέα σωληνάρια και επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Ο ορός μεταφέρονταν σε νέο σωληνάριο 50 mL και αποθηκεύονταν στους 4 °C.

### 3.3 Καλλιέργεια Καρκινικών Γραμμών και EBV-B Κυττάρων

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 ακολούθησε 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 cm<sup>2</sup>, 1/3 και 2/3 των ανακτημένων κυττάρων αντίστοιχα. Οι φλάσκες τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης (37 °C, 8% CO<sub>2</sub>).

Ανάλογα με το χρόνο διαίρεσής τους οι καλλιέργειες παρατηρούνται και όταν έφταναν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, γίνονταν συλλογή των κυττάρων για χρήση τους και επανακαλλιέργεια. Εάν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε διάλυμα, γίνονταν συλλογή του θρεπτικού μέσου από την φλάσκα, πλύση της φλάσκας με ζεστό PBS και φυγοκέντρηση των κυττάρων (400 g; 6 min). Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10% FBS-IDc και μετριόταν ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Κατάλληλος αριθμός κυττάρων συλλέγονταν για χρήση,  $2-4 \times 10^6$  κύτταρα/φιαλίδιο παγώνονταν και διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων ( $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  και  $0.5 \times 10^6$ ) τοποθετούνται σε 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 ξαπαγώνονταν νέο φιαλίδιο.

### 3.4 Ακτινοβόληση Κυττάρων

Τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ακτινοβόληση ήταν καρκινικές γραμμές και EBV μετασχηματισμένα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως αντιγονοπαρουσιαστικά, καθώς και PMBCs που χρησιμοποιούνται ως κύτταρα τροφοί. Η ακτινοβόληση έχει ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του DNA, έτσι ώστε τα κύτταρα που ακτινοβολούνται να μπορούν να 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 3.3 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 ακτινοβόλησης. Η ακτινοβόληση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μαγνητικό επιταχυντή στα 100 Gray για 15 min. Με το πέρας της ακτινοβόλησης, τα κύτταρα συλλέχτηκαν από τη φλάσκα και μετρήθηκαν με πλάκα Neubauer. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων (6 διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από  $1 \times 10^6$  κύτταρα/φρεάτιο) τοποθετούνται 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  $5 \times 10^6$  κύτταρα/φιαλίδιο για τα κύτταρα που προορίζονται για αντιγονοπαρουσιαστικά και  $10 \times 10^6$  κύτταρα/φιαλίδιο για τα κύτταρα τροφούς.

### 3.5 Αναστολή του πολλαπλασιασμού – Επώαση με μιτομυκίνη

Σε άλλες περιπτώσεις, για την αναστολή του πολλαπλασιασμού κυττάρων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν αντιγονοπαρουσιαστικά ή σαν κύτταρα τροφοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε μιτομυκίνη. Η μιτομυκίνη είναι μια ένωση η οποία συνδέει τις

δύο αλυσίδες του DNA μεταξύ τους αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την διαίρεση του κυττάρου, οδηγώντας το σε απόπτωση.<sup>63,64</sup> Η συγκέντρωση μιτομυκίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50µg/mL σε θεραπευτικό διάλυμα που περιείχε 1% ανθρώπινο ορό, ενώ η συγκέντρωση των κυττάρων δεν υπερέβαινε τα  $6 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Η επώαση διαρκούσε 90 λεπτά και ακολουθούσαν 6 πλύσεις ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα μιτομυκίνης.

### 3.6 Μεικτή Λεμφοκυτταρική Καλλιέργεια (MLPC)

Η καλλιέργεια αυτή σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αυξήσει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει την ειδική απάντηση έναντι των αντιγόνων που εξετάζονται. Μονοπύρνα ομφαλικού αίματος διεγέρθηκαν σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των ανιγονοειδικών CD8 T κυττάρων, έτσι ώστε αυτά να μπορέσουν να ανιχνευθούν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, όπως έχει ήδη περιγραφεί.<sup>65,66</sup>

#### A) Αρχική ενεργοποίηση

Την πρώτη ημέρα γίνονταν απόψυξη των CBMC τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο, ή απευθείας χρήση ενός μέρους των CBMCs αμέσως μετά την απομόνωσή τους. Ακολούθησε 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 μονοπύρνων. Από αυτά,  $1 \times 10^6$  κύτταρα παγώνονται ως ίζημα και  $3 \times 10^5$  κύτταρα χρησιμοποιούνται για χρώση με αντι-CD3, αντι-CD4, αντι-CD8, αντι-CD45RA και αντι-CD45RO αντισώματα (παρ. 3.14), ώστε να γνωρίζουμε τα ακριβή ποσοστά των διαφόρων πληθυσμών της μικροαλλιέργειας (Εικόνα 21, B). Από τα υπόλοιπα κύτταρα ( $\sim 40 \times 10^6$  CBMC) χωρίζονται σε αντίστοιχα σωληνάρια για ξεχωριστή διέγερση με το κάθε πεπτιδίο ανάλογα με τον HLA γονότυπο του δότη. Η διέγερση πραγματοποιείται σε συγκέντρωση κυττάρων  $1 \times 10^7$  κύτταρα/mL θεραπευτικού μέσου εμπλουτισμένο με 1% HS (60 min; RT) με 20 µg/mL τελική συγκέντρωση πεπτιδίου σε κάθε φιαλίδιο. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων και ανάμειξη όλων των φιαλιδίων και κατανομή τους σε φρεάτια πλάκας μικροκαλλιιεργειών U96 σε συγκέντρωση  $2 \times 10^5$  κύτταρα/φρεάτιο σε 0,2 mL 10% HS-IDc και τελική συγκέντρωση κυτταροκινών 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 200 µM 1MW. Την 3<sup>η</sup> αι 5<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας γίνονταν παρατήρηση των μικροκαλλιιεργειών σχετικά με το χρώμα του θεραπευτικού μέσου, το μέγεθος του ιζήματος και την παρουσία μονοκυττάρων καθώς και αντικατάσταση του 50% του θεραπευτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 200 µM 1MW).

#### B) Επανενεργοποίηση

Την 7<sup>η</sup> ημέρα γίνονταν 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 τοποθετούνται σε διάλυμα 1% HS-IDc. Μετά τη μέτρησή τους χωρίζονται 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 διεγείρονται με το πεπτίδιο ελέγχου. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων και ανάμειξη όλων των φιαλιδίων εκτός του πεπτιδίου ελέγχου και κατανομή τους στα φρεάτια της πλάκας μικροκαλλιεργείων ( $2 \times 10^4$  EBV κύτταρα/φρεάτιο) σε 0,1 mL 10% HS-IDc και τελική συγκέντρωση κυτταροκινών 20 U/mL IL-2, 10 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 και 200  $\mu$ M 1MW. Την 7<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 11<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας γίνονταν παρατήρηση των μικροκαλλιεργείων 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 γίνονταν διαίρεση των μικροκαλλιεργείων σε καινούριες πλάκες, διαφορετικά γίνονταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (20 U/mL IL-2 και 200  $\mu$ M 1MW). Στην περίπτωση που απαιτούνταν διαίρεση των μικροκαλλιεργείων γίνονταν αντικατάσταση 0.1 mL θρεπτικού μέσου με νέο χωρίς την προσθήκη κυτταροκινών, ανάδευση των μικροκαλλιεργείων 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 200  $\mu$ M 1MW και στις δύο πλάκες. Με μέγιστο αριθμό διαιρέσεων τις δύο καταλήγαμε σε 2-4 αντίγραφα των αρχικών μικροκαλλιεργείων (Εικόνα 21, A).

### *Γ) Ανίχνευση θετικών μικροκαλλιεργείων*

Την 13<sup>η</sup> ημέρα γίνονταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο και στο ένα αντίγραφο της καλλιέργειας γίνονταν χρώση με τα πολυμερή για την ανίχνευση των ειδικών πληθυσμών. Αρχικά, η πλάκα φυγοκεντρούνταν (1800 rpm; 6 min) και ακολουθούσαν δύο πλύσεις με ισοτονικό διάλυμα χρώσης 1% HS-PBS. Στη συνέχεια προσθέτονταν το HLA πολυμερές σε συγκέντρωση 8.3  $\mu$ M και η πλάκα επωάζονταν 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 πραγματοποιούνται δύο πλύσεις (1800 rpm; 5min). Τέλος, τα δείγματα μονιμοποιούνται σε διάλυμα 0.5% FA-PBS και αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.<sup>67</sup>

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 γίνονταν επαναδιέγερση με το ειδικό πεπτίδιο χρησιμοποιώντας ακτινοβολημένα EBV μετασχηματισμένα B κύτταρα σαν APC και ακτινοβολημένα PBMC σαν κύτταρα τροφούς ( $0.6 \times 10^6$  κύτταρα/M24 φρεάτιο με  $20 \times 10^4$  EBV,  $1 \times 10^6$  PBMC και  $40 \text{ U/mL IL-2}$ ,  $20 \text{ ng/mL IL-4}$ ,  $20 \text{ ng/mL IL-7}$  και  $200 \text{ } \mu\text{M 1MW}$ ). Την 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διέγερση γίνονταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο ( $10\% \text{ HS-IDc}$  με  $20 \text{ U/mL IL-2}$  και  $100 \text{ } \mu\text{M 1MW}$ ) ή και διαίρεση των μικροκαλλιιεργειών ανάλογα με την ανάπτυξη των κυττάρων. Την 7<sup>η</sup> ημέρα συλλέγονταν μια μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιούνταν χρώση με το ειδικό MHC-πολυμερές και με μη ειδικό MHC-πολυμερές, με τη διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω (Εικόνα 21, Γ). Εφόσον επαληθεύονταν η ειδικότητα του πληθυσμού τα κύτταρα συλλέγονταν, μετρούνταν στην πλάκα Neubauer και παγώνονταν ως κυτταρικές γραμμές ( $2-6 \times 10^6$  κύτταρα/φιαλίδιο).

#### Δ) Υπολογισμός της συχνότητας

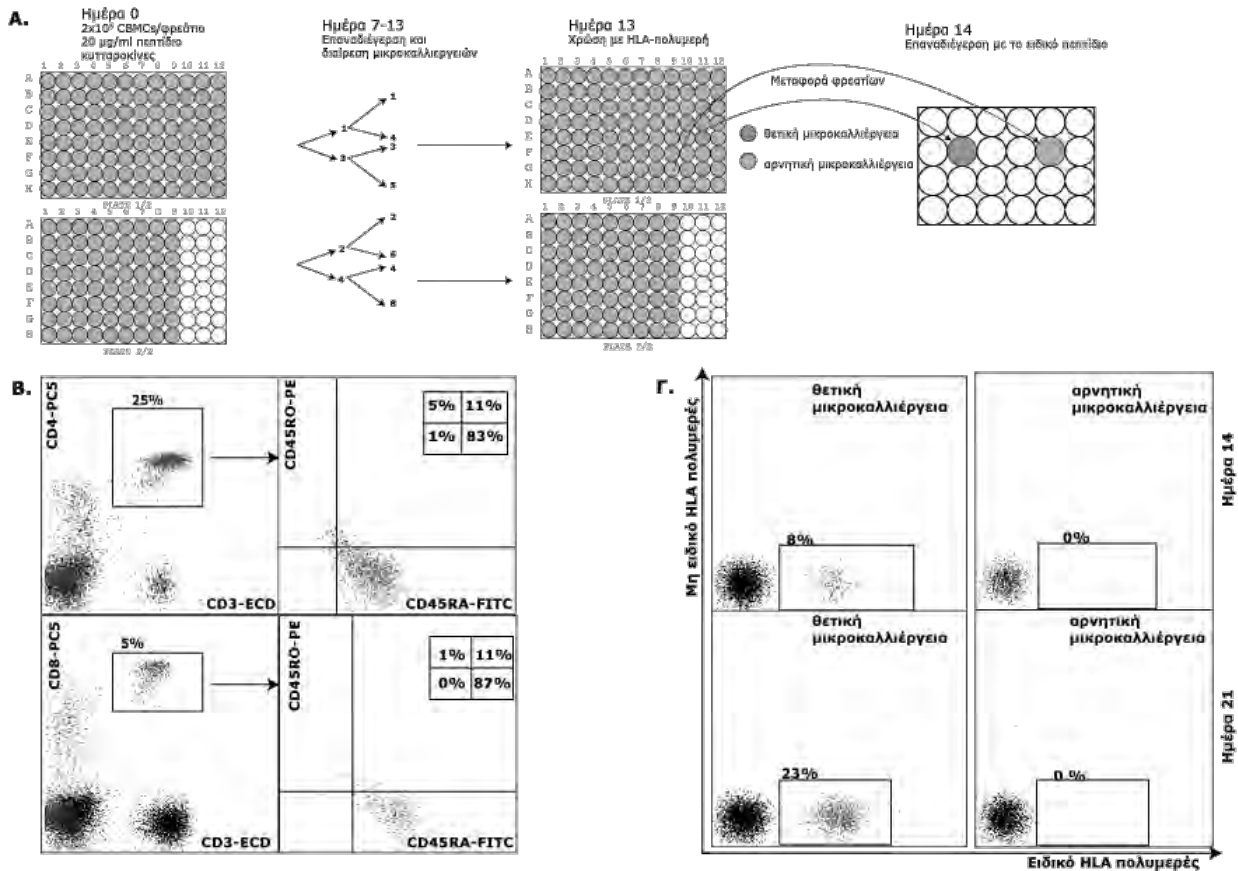
Με βάση τον αριθμό των θετικών μικροκαλλιιεργειών στο σύνολο της πλάκας, υπολογίζονταν η συχνότητα της ειδικής T κυτταρικής απάντησης έναντι των αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν, με βάση την κατανομή Poisson διορθωμένη για σπάνια φαινόμενα κατά Bernoulli:<sup>66</sup>

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

Όπου  $e$  είναι η βάση των φυσικών λογάριθμων ( $\sim 2.71828$ ),  $m$  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  $m$ .

#### Ε) Χρήση δενδριτικών κυττάρων ως αντιγονοπαρουσιαστικά

Σε ορισμένα δείγματα, πέραν του βασικού πρωτοκόλλου, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον παραλλαγές της μεθόδου, χρησιμοποιώντας δενδριτικά κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά, είτε αντί των EBV B κυττάρων την ημέρα 7 της καλλιέργειας, είτε τις ημέρες 0 και 7 της καλλιέργειας. Δενδριτικά κύτταρα δημιουργήθηκαν από μονοκύτταρα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.12 και χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση  $5-10 \times 10^3$  κύτταρα/U96 φρεάτιο. Τα κύτταρα αποψύχονται και επωάζονται με μιτομυκίνη (παρ. 3.5) για να επιτευχθεί η αναστολή του πολλαπλασιασμού άλλων πληθυσμών που τυχόν παρέμειναν στην καλλιέργεια και ακολουθεί επώαση με τα υπό μελέτη πεπτίδια, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.



**Εικόνα 21.** Α) Σχηματική απεικόνιση της Μικτής Λεμφοκυτταρικής Καλλιέργειας. Β) Κυτταρομετρική ανάλυση των πληθυσμών των CBMCs που χρησιμοποιήθηκαν. Γ) Χρώση με ειδικό πολυμερές και πολυμερές ελέγχου μιας θετικής και αρνητικής μικροκαλλιέργειας την 14<sup>η</sup> και 21<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας.

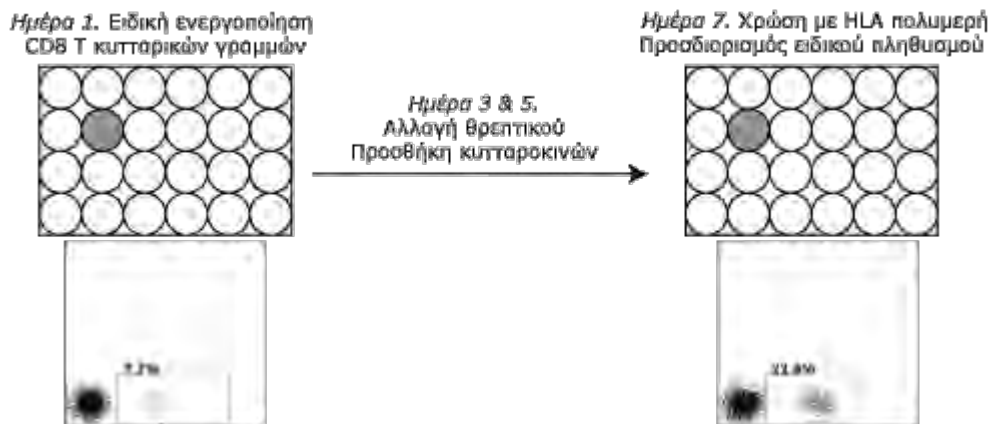
### 3.7 Καλλιέργεια T Γραμμών

Ως κυτταρική γραμμή αναφέρεται ένας μικτός πληθυσμός κυττάρων που περιλαμβάνει τον ειδικό για το πεπτιδίδο που εξετάζεται πληθυσμό μαζί με άλλους κυτταρικού πληθυσμούς, όπως CD4 T λεμφοκύτταρα, CD8 T κύτταρα άλλης ειδικότητας, NK κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα κ.α. Σκοπός της καλλιέργειας αυτής ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός του ειδικού μόνο CD8 T κυτταρικού πληθυσμού. Για τον σκοπό αυτό οι κυτταρικές γραμμές που προέκυπταν από την διαδικασία του MLPC επαναδιδεγείρονταν με το ειδικό πεπτιδίδο 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 ( $4-6 \times 10^5$  κύτταρα/M24 φρεάτιο). Στη συνέχεια αποψύχθηκαν τα ακτινοβολημένα EBV B μετασχηματισμένα κύτταρα κατάλληλου HLA. Τα APCs μετρήθηκαν και

τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια 15 mL σε 1% HS-IDc με μέγιστη συγκέντρωση  $6 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Ακολούθησε η προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20 µg/mL και επώαση για 60 min σε RT. Τα κύτταρα αναδεύονται κάθε 15 min. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα διεγέρτες ξαναμετρήθηκαν και επιλέχθηκε ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την καλλιέργεια ( $10\text{-}20 \times 10^4$  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% CO<sub>2</sub>).

Την 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διέγερση γίνονταν αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 20 U/mL IL-2 και 100 µM 1MW) ή και διαιρέση των μικροκαλλιιεργειών ανάλογα με την ανάπτυξη των κυττάρων. Την 7<sup>η</sup> ημέρα συλλέγονταν μία μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιούνταν χρώση με το ειδικό και με το μη ειδικό MHC-πολυμερές, για να διαπιστωθεί το ποσοστό του ειδικού πληθυσμού στην καλλιέργεια. Στη συνέχεια οι κυτταρικές γραμμές συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και είτε παγώθηκαν ( $2\text{-}6 \times 10^6$  κύτταρα/φιαλίδιο) είτε χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω εφαρμογές, όπως η ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και η απομόνωση των CD8 T κυτταρικών κλώνων (Εικόνα 22).



**Εικόνα 22.** Σχηματική απεικόνιση της καλλιέργειας των T κυτταρικών γραμμών και κυτταρομετρική ανάλυση του ειδικού για το πολυμερές πληθυσμού τις ημέρες 0 και 7 της καλλιέργειας. Στο πλαίσιο διακρίνεται το ποσοστό του αντιγονοειδικού πληθυσμού στο σύνολο των CD8 T κυττάρων της καλλιέργειας.

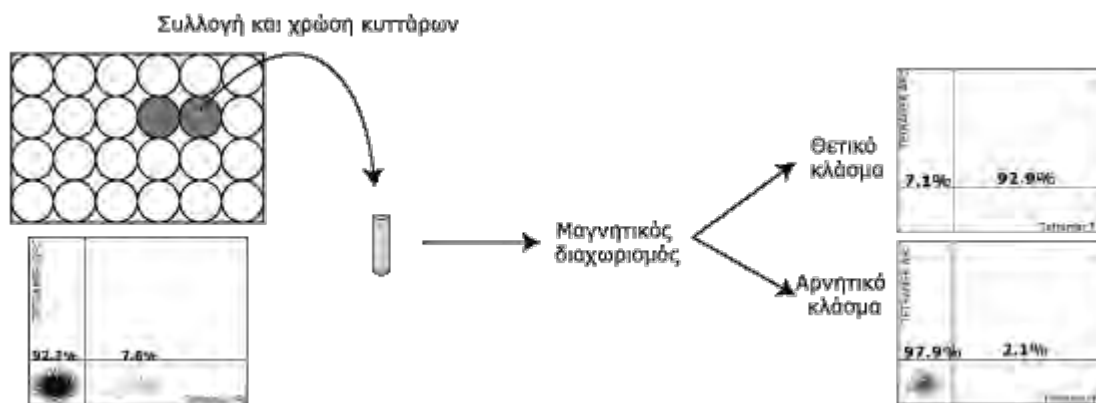
### 3.8 Απομόνωση CD8 T κυτταρικών κλώνων

Για την ανάπτυξη CTL κλώνων, αρχικά τα ειδικά για το αντιγόνο CD8 T κύτταρα απομονώθηκαν από το γενικότερο πληθυσμό της καλλιέργειας με μαγνητικό διαχωρισμό και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης. Με τον μαγνητικό



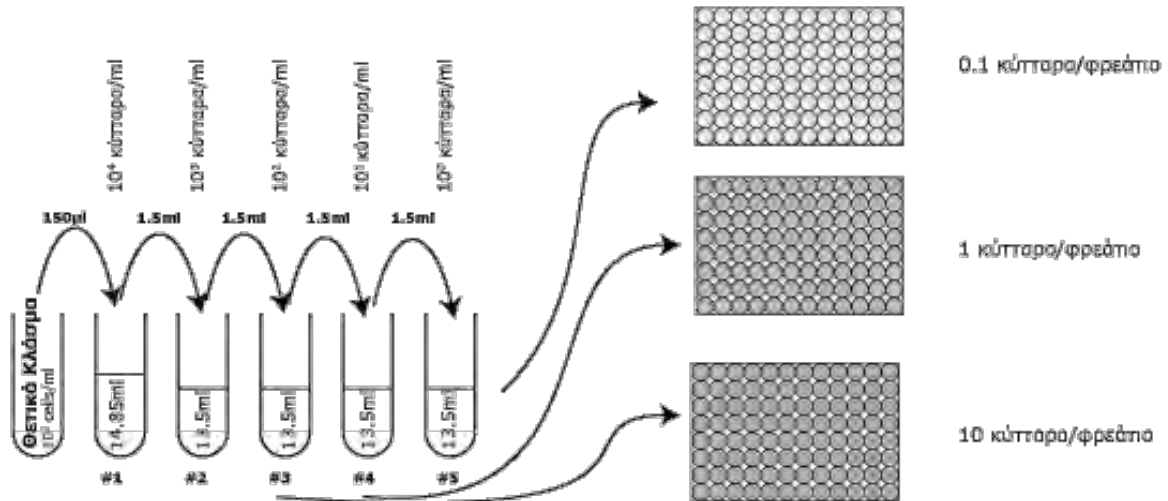
διαχωρισμό επιτυγχάνεται αύξηση της καθαρότητας του πληθυσμού επιλέγοντας αντισώματα έναντι ειδικών, για τον συγκεκριμένο πληθυσμό, επιφανειακών μορίων. Τα επιλεγμένα αντισώματα βρίσκονται συνδεδεμένα με μαγνητικά μικροσωματίδια και με αυτόν τον τρόπο μπορούν να διαχωρίσουν τα κύτταρα σε δύο πληθυσμούς: 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 του 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 (παράγραφος 3.7). Την 7<sup>η</sup> ημέρα γίνονταν χρώση με MHC-πολυμερές και όταν επιβεβαιώνονταν η παρουσία του θετικού πληθυσμού ακολουθούσε μαγνητικός διαχωρισμός. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε σωληνάριο 15 mL και φυγοκεντρήθηκαν (400 g; 6 min). Επαναδιαλύθηκαν 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 ROBOSEPTM 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 μια 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 (Εικόνα 23). Το αρνητικό κλάσμα παγώθηκε, ενώ το θετικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια υπό συνθήκες φθίνουσας συγκέντρωσης.



**Εικόνα 23.** Απομόνωση CD8 T κυττάρων με μαγνητικό διαχωρισμό. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρικής ανάλυσης πριν και μετά τον μαγνητικό διαχωρισμό των κυττάρων. Το ποσοστό υποδηλώνει το ποσοστό του αντιγονοειδικού πληθυσμού στο κάθε κλάσμα.

Ο θετικός πληθυσμός φυγοκεντρήθηκε (400 g; 6 min) και επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο 10% HS-IDc ώστε να βρεθεί σε συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και οι αραιώσεις 10-0.1 κύτταρα/φρεάτιο τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας U96 (Εικόνα 24). Στις πλάκες αυτές προστέθηκαν  $20 \times 10^3$  EBV-B κύτταρα/φρεάτιο σαν APC μετά από επώαση με το ειδικό πεπτίδιο και  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ M 1MW. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν για μια εβδομάδα σε θάλαμο επώασης (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) και επαναδιεγέρθηκαν την 7<sup>η</sup> ημέρα με τις ίδιες αναλογίες κυττάρων και κυτταροκινών. Από την 9<sup>η</sup> μέχρι και την 14<sup>η</sup> ημέρα ελέγχονταν καθημερινά το χρώμα του θρεπτικού μέσου και το μέγεθος του ιζήματος στις πλάκες μικροκαλλιέργειας. Όταν παρατηρούνταν ανάπτυξη κυττάρων τα κύτταρα μεταφέρονταν σε μεγαλύτερα φρεάτια (M48 well, Corning) με 100 U/mL IL-2 και 100  $\mu$ M 1MW. Ακολούθησε χρώση με MHC-πολυμερή και εφόσον ανιχνεύονταν θετικός για το MHC-πολυμερές πληθυσμό >90% τα κύτταρα επαναδιεγέρθηκαν για μια 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  $\mu$ M 1MW. Την 3<sup>η</sup> μέχρι και την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διέγερση πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου ή/και διαίρεση των κυττάρων σε νέα φρεάτια. Την 7<sup>η</sup> 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.



**Εικόνα 24.** Για την απομόνωση των CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων εφαρμόστηκε η μέθοδος των διαδοχικών διαιρέσεων. Καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων CTLs καλλιεργήθηκαν για δύο εβδομάδες και ελέχθησαν για την ανάπτυξη κυττάρων.

### 3.9 Καλλιέργεια CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων

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 καλλιέργεια αυτής ήταν η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των CTL, ώστε να χρησιμοποιηθούν για την προτυποποίηση του πρωτοκόλλου καλλιέργειας των δενδριτικών κυττάρων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.12.

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 ασχέτου 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 συγκέντρωση  $6 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Ακολούθησε η προσθήκη του ειδικού πεπτιδίου με συγκέντρωση 20 µg/mL και επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναδεύονται 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  $0.5\text{-}10^6$  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  $\mu$ M 1MW). Τέλος, τα κύτταρα διεγέρτες προστέθηκαν στα φρεάτια και τα πιάτα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (37 °C, 8% CO<sub>2</sub>).

Την 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διέγερση πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του 50% του θρεπτικού μέσου με νέο (10% HS-IDc με 50 U/mL IL-2 και 100  $\mu$ M 1MW) ή και διαίρεση των κυττάρων σε νέα φρεάτια ανάλογα με την ανάπτυξή τους. Την 7<sup>η</sup> ημέρα συλλέχθηκε μια μικρή ποσότητα κυττάρων και πραγματοποιήθηκε χρώση με το ειδικό και με το μη ειδικό MHC-πολυμερές για να επαληθευθεί η παρουσία του κλώνου. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και είτε παγώθηκαν (2-6x10<sup>6</sup> κύτταρα/φιαλίδιο) είτε χρησιμοποιήθηκαν για το λειτουργικό και φαινοτυπικό χαρακτηρισμό.

### 3.10 Προσδιορισμός κυτταροκινών - Ενδοκυττάρια χρώση

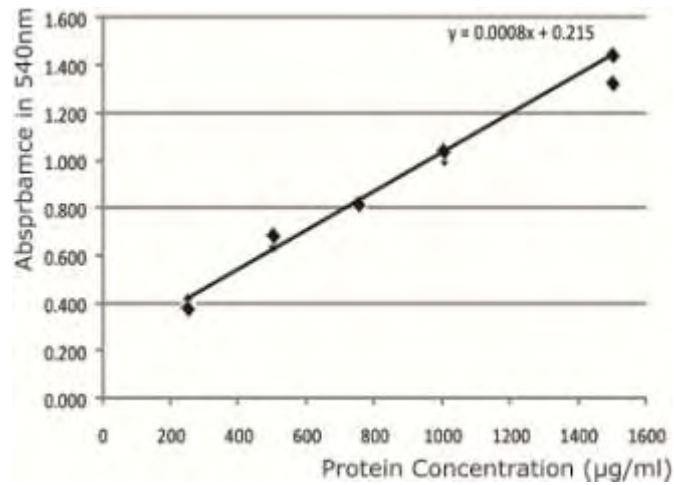
Η ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων να ενεργοποιούν ειδικά CD8 T κυτταρικού κλώνους, μελετήθηκε πραγματοποιώντας ενδοκυττάρια χρώση για την παραγωγή IFN- $\gamma$  και κυτταρομετρική ανάλυση των κυττάρων. Η διαδικασία ξεκινούσε την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά την τελευταία ενεργοποίηση του κλώνου. Τα κύτταρα (~1x10<sup>6</sup> κύτταρα) διατηρήθηκαν σε κατάσταση ηρεμία 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<sup>η</sup>-11<sup>η</sup> 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 έξι M48 φρεάτια, ένα για την ειδική και ένα για τη μη ειδική ενεργοποίηση για την κάθε συνθήκη και τοποθετήθηκαν στους 37 °C, έως ότου ετοιμαστούν τα κύτταρα διεγέρτες (Εικόνα 31, A).

Σαν APC χρησιμοποιήθηκαν δενδριτικά κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε ωρίμανση με τρεις διαφορετικούς τρόπους, χρησιμοποιώντας LPS, D-(+)-mannose ή διάλυμα λυμένων καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά, ξεπαγώθηκαν και επώασθηκαν με το ειδικό και με ένα μη ειδικό πεπτίδιο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε πλύση των δενδριτικών κυττάρων, επαναδιάλυση σε θρεπτικό διάλυμα 10% HS-IDc, προσθήκη IL-2 10U/mL και μεταφορά στα αντίστοιχα φρεάτια όπου η αναλογία των δενδριτικών/CTLs ήταν 1/3. Κύτταρα διεγέρτες τοποθετήθηκαν επίσης σε ξεχωριστά φρεάτια για να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Μετά την προσθήκη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για 60 min στους 37°C, 8% CO<sub>2</sub>. Μετά την επώαση προστέθηκε μπρεφελντίνη (BFA) σε αραιώση 1/500 και τα κύτταρα παρέμειναν στο θάλαμο επώασης για άλλες 18h. Η μπρεφελντίνη μπλοκάρει την μεταφορά των πρωτεϊνών που συντίθενται στην συσκευή Golgi με αποτέλεσμα αυτές να συσσωρεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα 31, B).<sup>68</sup>

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. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα πλύσης και ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 rpm; 4 min). Τα κύτταρα διαλύθηκαν και προστέθηκε ο συνδυασμός των αντισωμάτων αντι-CD69-PC5 (1/10), αντι-CD8-PC7 (1/10), αντι-CD45-ECD (1/10), αντι-IFN-γ-FITC (1/5). Ακολούθησε 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 και αναλύθηκαν κυτταρομετρικά (Εικόνα 31, Γ).

### 3.11 Παραγωγή εναιωρήματος λυμένων καρκινικών κυττάρων

Κατά την προτυποποίηση των συνθηκών για την παραγωγή και ωρίμανση DCs, χρησιμοποιήθηκαν και λυμένα καρκινικά κύτταρα μελανώματος (Tumor lysates). Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και στην βιβλιογραφία για την ανάπτυξη ειδικών πληθυσμών CD8 Τ κυττάρων από ομφαλικό αίμα.<sup>55</sup> Μετά την καλλιέργεια των κυττάρων, αυτά συλλέχθηκαν σε συγκέντρωση  $25 \times 10^6$  κύτταρα/mL. Ακολούθησε λύση των κυττάρων πραγματοποιώντας διαδοχικούς κύκλους παγώματος ξεπαγώματος [μεταφορά σε LiqN<sub>2</sub> για 1 λεπτό και στη συνέχεια σε υδατόλουτρο (37°C) για 5 λεπτά]. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 διαδοχικοί κύκλοι παγώματος-ξεπαγώματος των κυττάρων και ακολούθησε φυγοκέντρηση (1500g, 10min). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και παγώθηκε, ενώ μια ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συνολικής πρωτεΐνης. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το Pierce BCA Protein Assay Kit, το οποίο βασίζεται στην αντίδραση της διουρίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540nm του δείγματος και των πρότυπων διαλυμάτων, ενώ με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται ο υπολογισμός της ολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του δείγματος. Δύο αραιώσεις του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν (1/5 και 1/25). Με βάση την απορρόφηση των πρότυπων δειγμάτων στα 540nm (Πίνακας 6), σχεδιάσθηκε η πρότυπη καμπύλη. Η γραμμική περιοχή βρίσκεται στο διάστημα 250-1500μg/mL (Εικόνα 25), γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε η αραιώση 1:5 για τον υπολογισμό της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.



**Εικόνα 25.** Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης πρωτεΐνης και απορρόφησης στα 540nm.

**Πίνακας 6.** Συγκέντρωση πρωτεΐνης και απορρόφηση πρότυπων και άγνωστου δείγματος. Η αραιώση 1/5 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης του δείγματος.

Δείγμα	[Πρωτεΐνη] (µg/mL)	Ab (540nm)	[Συνολική Πρωτεΐνη] (µg/mL)
I	0	0.100	0.129
H	25	0.125	0.134
G	125	0.268	0.237
F	250	0.407	0.383
E	500	0.655	0.685
D	750	0.815	0.816
C	1000	1.014	1.044
B	1500	1.447	1.327
A	2000	1.583	1.735
δείγμα 1:5	432.5	0.580	0.542
δείγμα 1:25	-9.375	0.213	0.202
			2162
			-234

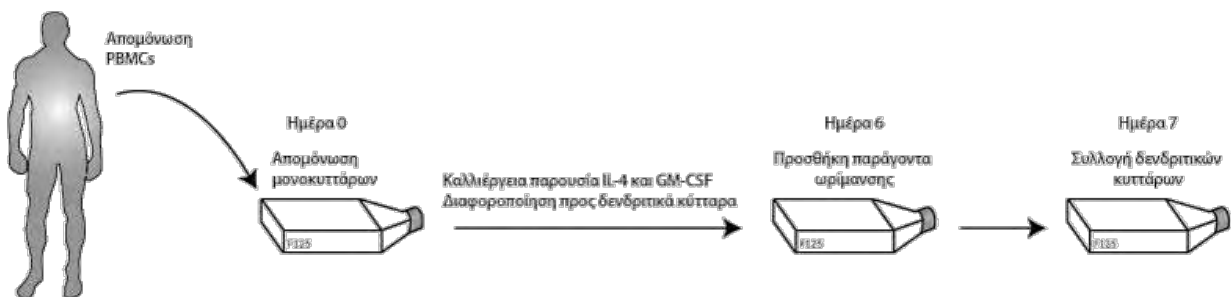
### 3.12 Παραγωγή δενδριτικών κυττάρων

Για την δημιουργία των DCs, απομονώθηκαν μονοκύτταρα από υγιή νεαρό δότη, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν σε DCs, έπειτα από καλλιέργεια παρουσία GM-CSF και IL-4, όπως έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία.<sup>69</sup> Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα προτυποποίησης των συνθηκών στο οποίο, από περιφερικό αίμα απομονώθηκαν PBMC έπειτα από φυγοκέντρηση του περιφερικού αίματος σε στοιβάδα φικόλης. Στη συνέχεια, στα κύτταρα προστέθηκε θρεπτικό υλικό 1%FBS-IDc και μεταφέρθηκαν σε φλάσκες 25cm<sup>2</sup> σε συγκέντρωση 1x10<sup>6</sup> κύτταρα/cm<sup>2</sup> όπου επώασθηκαν για 2 ώρες σε επωαστήρα 37°C, 8% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα τα οποία δεν προσκολλήθηκαν αφαιρέθηκαν με διαδοχικά πλυσίματα. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας στην απομόνωση των μονοκυττάρων, επαναλήφθηκε φαινότυπος για τους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς του περιφερικού αίματος, ο οποίος συγκρίθηκε με τον αρχικό φαινότυπο. Μετά την απομόνωση των μονοκυττάρων, προστέθηκε θρεπτικό υλικό και κυτταροκίνες. Κατά την προτυποποίηση των συνθηκών παραγωγής των δενδριτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις

ορού 1% και 5%-FBS-IDc και κυτταροκίνες GM-CSF 800U/mL και IL-4 500U/mL. Τις ημέρες 2 και 4 αφαιρέθηκε το 25% του θρεπτικού και προστέθηκε θρεπτικό υλικό με τελική συγκέντρωση κυτταροκινών όπως την ημέρα 0. Την ημέρα 6, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του παράγοντα ωρίμανσης. Κατά την προτυποποίηση του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες ωρίμανσης i) LPS 1μg/mL ii) D-(+)-mannose 10μg/mL iii) Υπερκείμενο λυμένων καρκινικών κυττάρων με συγκέντρωση πρωτεΐνης 50μg/mL. Την ημέρα 7, πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων. Για την αποκόλληση των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε 2mM PBS-EDTA και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο (Εικόνα 26). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός με κυτταρομετρία ροής για τους επιφανειακούς δείκτες CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR (Πίνακας 4). Η επιλογή των συνθηκών για την παραγωγή των DCs βασίσθηκε στον φαινότυπο των κυττάρων και στην παραγωγή IFN-γ από CD8<sup>+</sup> κύτταρα, έπειτα από ειδική ενεργοποίηση.

Μετά την προτυποποίηση των συνθηκών, για την παραγωγή των DCs, χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες 125cm<sup>2</sup>, το θρεπτικό μέσω περιλάμβανε 5%FBS-IDc με τις ίδιες συγκεντρώσεις κυτταροκινών. Για την ωρίμανση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε D-(+)-μαννόζη στην συγκέντρωση 10μg/mL, ενώ μετά την συλλογή των κυττάρων την ημέρα 7 πραγματοποιήθηκε ακτινοβόληση των κυττάρων. Στη συνέχεια τα κύτταρα παγώθηκαν σε ψυκτικό διάλυμα που περιέχει 50%FBS, 10%DMSO και 40%SF-IDc.

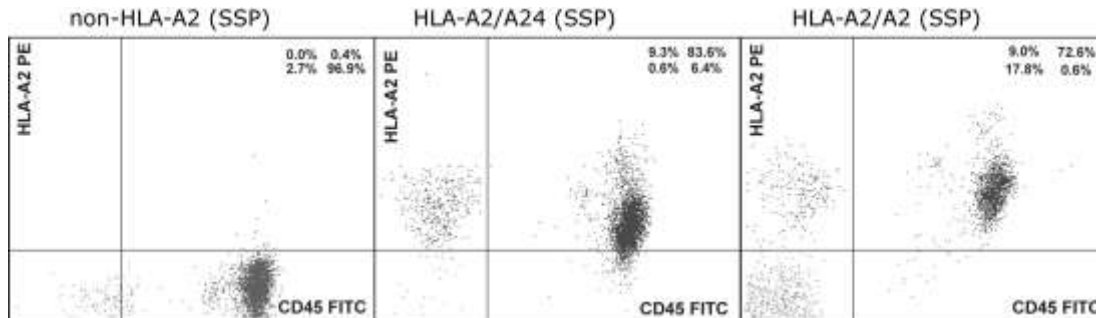
Λόγο της μειωμένης ανάπτυξης των ειδικών CD8 T κυττάρων για τα υπό μελέτη αντιγόνα, στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν δενδριτικά κύτταρα, επαναλήφθηκε η παραγωγή δενδριτικών κυττάρων, σε δύο διαφορετικά πειράματα, χρησιμοποιώντας ως παράγοντα ωρίμανσης λυμένα καρκινικά κύτταρα (50μg/mL) και LPS (1μg/mL).



**Εικόνα 26.** Παραγωγή δενδριτικών κυττάρων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των PBMCs ενήλικα ατόμου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μονοκυττάρων και διαφοροποίησή τους προς δενδριτικά χρησιμοποιώντας τις κυτταροκίνες IL-4 και GM-CSF. Την έκτη ημέρα της καλλιέργειας, έγινε η προσθήκη του παράγοντα ωρίμανσης και μετά από 24 ώρες πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυττάρων.

### 3.13 HLA-A2 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Για τον απευθείας χαρακτηρισμό των δειγμάτων του περιφερικού αίματος, ως προς την έκφραση του HLA-A2, χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής. Αρχικά πραγματοποιήθηκε χρώση 100μl δείγματος με τα αντισώματα CD45-FITC και HLA-A2-PE για 15λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιώντας το διάλυμα VersaLyse Lysing Solution. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων, μονιμοποίηση με 1%FA-PBS και ανάγνωση των αποτελεσμάτων με κυτταρομετρία ροής.



**Εικόνα 27.** Χρώση κυττάρων περιφερικού αίματος για τον δείκτη επιφανείας CD45 και το HLA-A2.

### 3.14 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός CD8 T κυττάρων

Για τον προσδιορισμό του σταδίου διαφοροποίησης των CD4 και CD8 T κυττάρων, την ημέρα 0 της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τα αντισώματα CD45RA-FITC, CD45RO-PE, CD3-ECD, CD4-PC5/CD8-PC5. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων με διάλυμα 1%HS-PBS και ακολούθησε χρώση χρησιμοποιώντας τα αντισώματα σε αραιώση 1/10 και επώαση (30min, 4°C). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε δεύτερη πλύση για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος, μονιμοποίηση με διάλυμα 1%FA-PBS και ανάγνωση με κυτταρομετρία ροής.

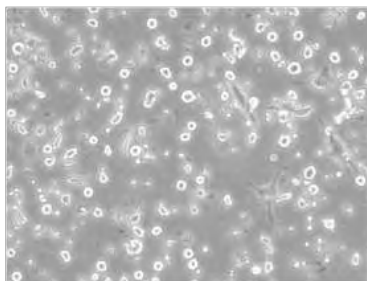
Το στάδιο διαφοροποίησης των αντιγονοειδικών πληθυσμών, έπειτα από καλλιέργεια προσδιορίστηκε, πραγματοποιώντας χρώση σε CD8 T κυτταρικές γραμμές οι οποίες είχαν δεχθεί 6 ενεργοποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD45RA-FITC, CCR7-APC σε αραιώση 1/10, CD8-PC7 σε αραιώση 1/100, tetramer-PE. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, για την χρώση των κυττάρων, είναι ίδια με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6, δηλαδή, πρώτα πραγματοποιείται χρώση με το HLA-πολυμερές και στη συνέχεια προστίθεται στο μείγμα των αντισωμάτων.



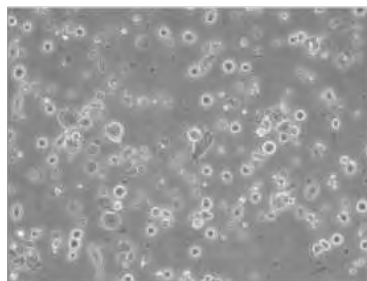
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Παραγωγή και ωρίμανση Δενδριτικών Κυττάρων

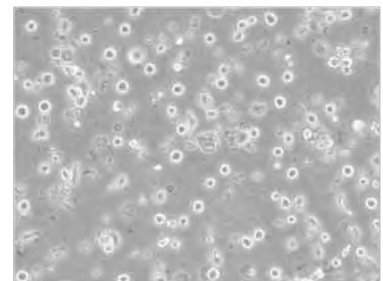
Καθώς στο ομφαλικό αίμα περιέχονται κατά κανόνα παρθένα T κύτταρα, δημιουργήσαμε δενδριτικά κύτταρα από μονοκύτταρα, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνοπαρουσιαστικά στη διάρκεια των πειραμάτων. Κατά την προτυποποίηση του πρωτοκόλλου, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί θρεπτικό διάλυμα 5%FBS-IDc, καθώς αυτή η συνθήκη παρουσίαζε μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης (Εικόνα 29) και καλύτερη μικροσκοπική εικόνα (Εικόνα 28), σε σχέση με τη συνθήκη που περιείχε 1%FBS-IDc. Για την ωρίμανση των δενδριτικών χρησιμοποιήθηκαν τρεις συνθήκες (LPS, D-(+)-mannose, Tumor Lysates). Σε όλες τις συνθήκες παρατηρήθηκε έκφραση των CD40, HLA-DR και CD1a, πτώση της έκφρασης του CD14, αυξημένη έκφραση του CD83 κυρίως στην συνθήκη με το LPS και υπερέκφραση των CD80 και CD86 επίσης κυρίως για την συνθήκη με το LPS (Εικόνα 30), αποτελέσματα τα οποία συμβαδίζουν με την βιβλιογραφία, κυρίως για την συνθήκη με το LPS.<sup>70</sup>



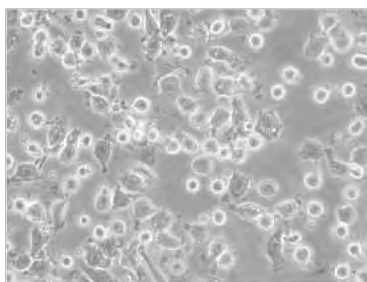
1% FBS-IDc (LPS)



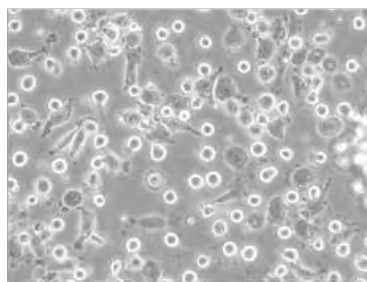
1% FBS-IDc (D-mannose)



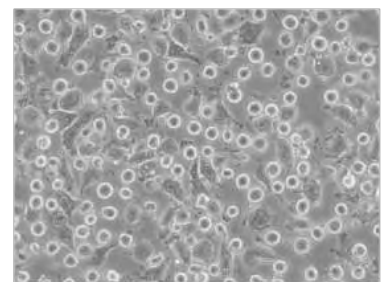
1% FBS-IDc (Tumor Lysates)



5% FBS-IDc (LPS)

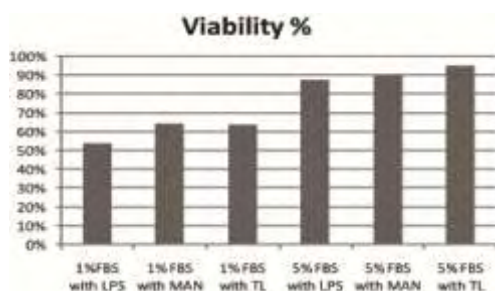


5% FBS-IDc (D-mannose)

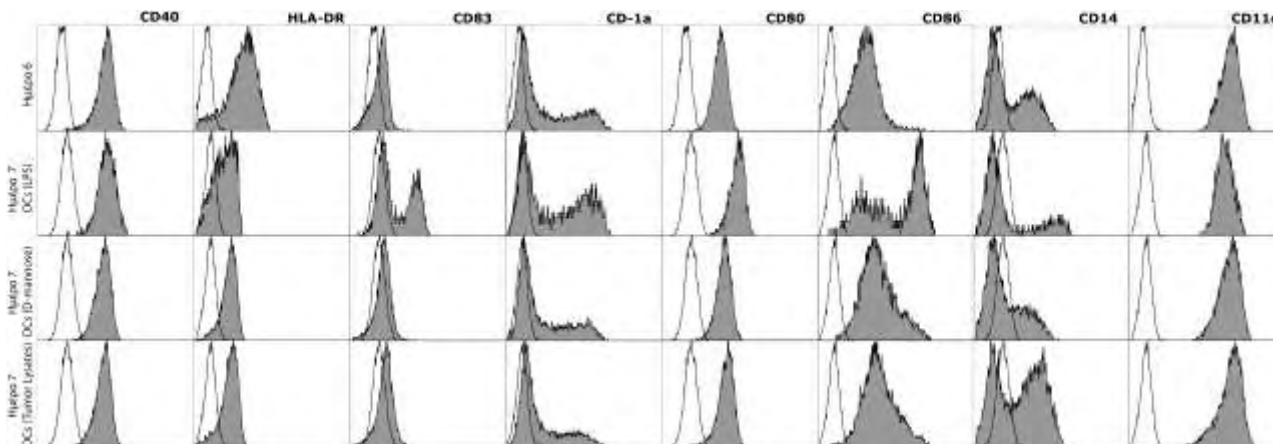


5% FBS-IDc (Tumor Lysates)

**Εικόνα 28.** Εικόνες από την ημέρα 7 της καλλιέργειας των δενδριτικών κυττάρων. Παρουσιάζονται οι διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και ωρίμανσης.



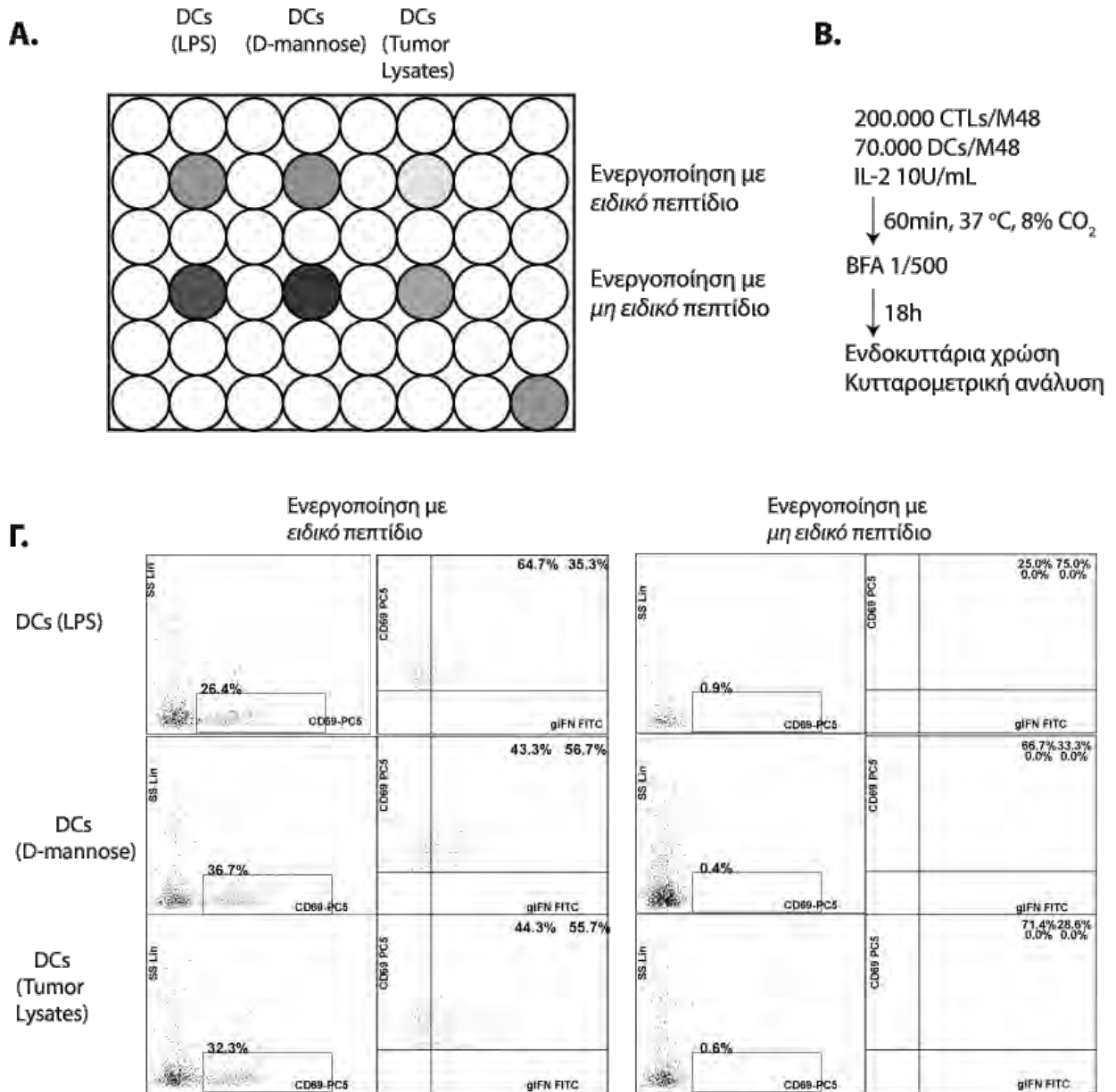
**Εικόνα 29.** Επίδραση της συγκέντρωσης του ορού στην βιωσιμότητα των δενδριτικών κυττάρων.



**Εικόνα 30.** Φαινότυπος δενδριτικών κυττάρων. Στην πρώτη σειρά παρουσιάζεται η έκφραση δεικτών επιφανείας στα κύτταρα την ημέρα 6 της καλλιέργειας, πριν την προσθήκη του παράγοντα ωρίμανσης. Στις σειρές 2-4 παρουσιάζεται η έκφραση δεικτών επιφανείας, την ημέρα 7 της καλλιέργειας, 24 ώρες μετά την προσθήκη του παράγοντα ωρίμανσης, για τους τρεις διαφορετικούς τρόπους ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων (LPS, D-mannose, Tumor Lysates).

## 4.2 Λειτουργικός χαρακτηρισμός Δενδριτικών κυττάρων

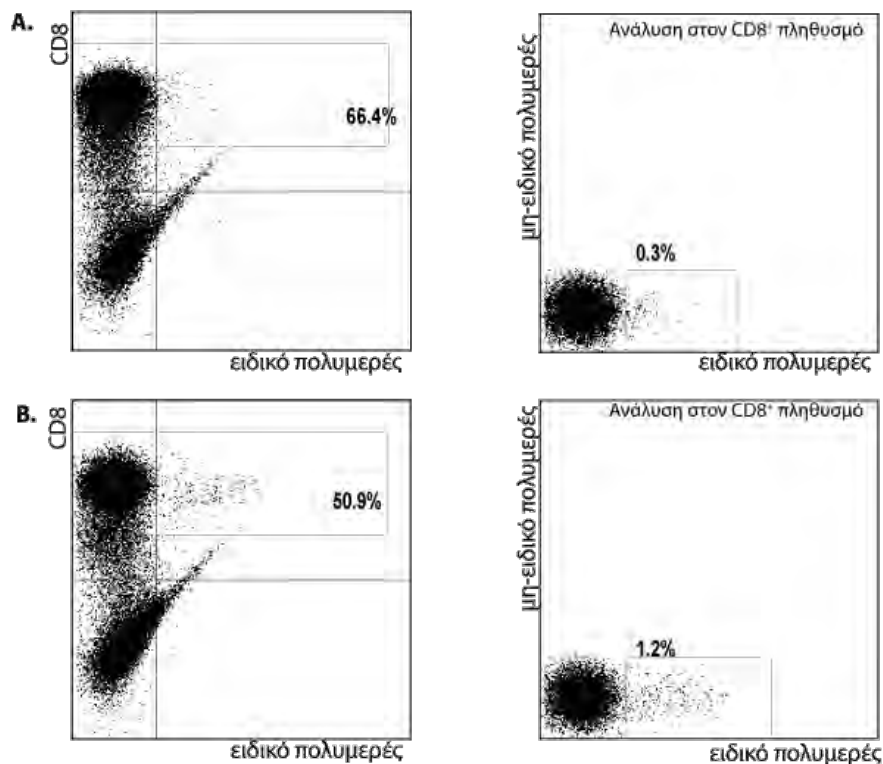
Για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των δενδριτικών κυττάρων, μελετήθηκε η ικανότητά τους να επάγουν την παραγωγή IFN- $\gamma$  σε CD8 T κύτταρα, έπειτα από ειδική ενεργοποίηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.10 (Εικόνα 31, A και B). Σε καμία συνθήκη δεν παρατηρήθηκε μη ειδική ενεργοποίηση και παραγωγή IFN- $\gamma$ , ενώ και με τις τρεις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ωρίμανση των δενδριτικών, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των κυττάρων και παραγωγή IFN- $\gamma$ , όταν τα αντιγеноπαρουσιαστικά επώασθηκαν με το ειδικό πεπτίδιο (Εικόνα 31, Γ).



**Εικόνα 31.** Ενδοκυττάρια χρώση CD8 T κυτταρολυτικών κλώνων, για παραγωγή IFN-γ, έπειτα από ειδική ενεργοποίηση από δενδρική κύτταρα. (Α) Τρεις διαφορετικές συνθήκες ωρίμανσης των δενδρικών κυττάρων δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν ειδικά CD8 T κύτταρα. (Β) Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των CD8 T κυττάρων και στη συνέχεια αναστολή των εκκρίσεων, χρησιμοποιώντας μπρεφελντίνη Α (BFA). (Γ) Με βάση την κυτταρομετρική ανάλυση και στις τρεις συνθήκες τα δενδρική μπορούσαν να ενεργοποιήσουν ειδικά τα CD8 T κύτταρα, οδηγώντας σε παραγωγή IFN-γ από τα κύτταρα αυτά.

### 4.3 Ανάπτυξη αντιγονοειδικών πληθυσμών CD8 T κυττάρων με εναιώρημα λυμένων καρκινικών κυττάρων ως μέσο ωρίμανσης των DCs

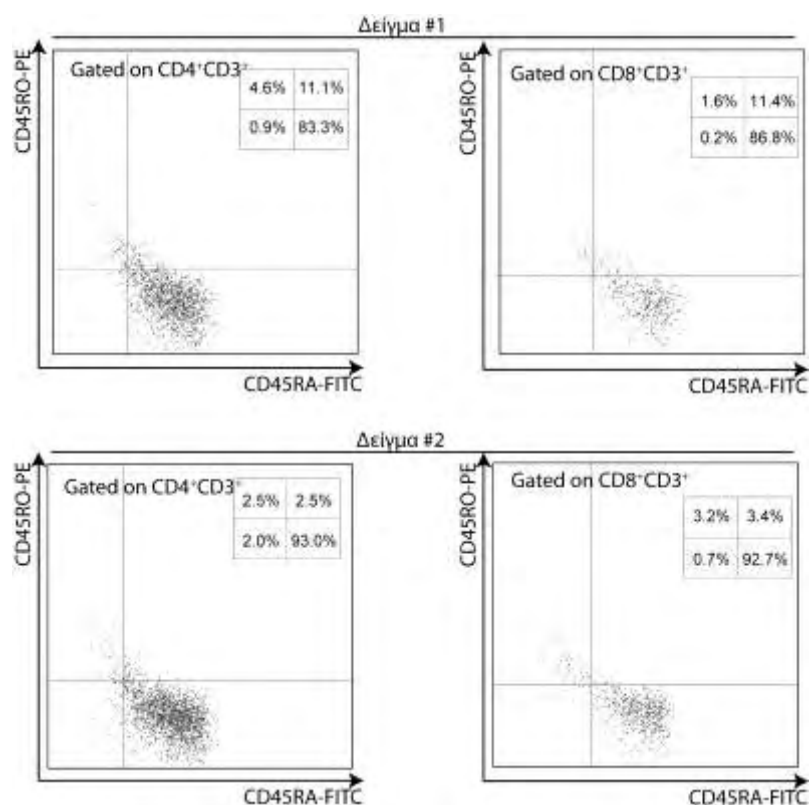
Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων χρησιμοποιώντας διάλυμα λυμένων καρκινικών κυττάρων, έχει χρησιμοποιηθεί στην βιβλιογραφία για την ανάπτυξη ειδικών για καρκινικά αντιγόνα CD8 T κυττάρων.<sup>55</sup> Χρησιμοποιώντας διάλυμα λυμένων καρκινικών κυττάρων μελανώματος, για την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, ήταν δυνατή η ανάπτυξη ειδικών πληθυσμών έναντι των αντιγόνων hTERT540 και MAGE-A3 που παρουσιάζονται από τα HLA A02 μόρια. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε μια μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.6, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγονοπαρουσιαστικά τις ημέρες 0 και 7 δενδριτικά κύτταρα όπως περιγράφηκε προηγουμένως, χωρίς να έχει προηγηθεί επώαση με τα επιθυμητά πεπτίδια. Αυτό το αποτέλεσμα, δείχνει ότι χρησιμοποιώντας λυμένα καρκινικά κύτταρα ως μέσο ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων, μπορούν να αναπτυχθούν CD8 T κυτταρικοί πληθυσμοί, με ειδικότητα έναντι των αντιγόνων του όγκου, σε ένα σύστημα *in vitro* καλλιέργειας.



**Εικόνα 32.** Ανάπτυξη CD8 T κυτταρικών γραμμών ειδικών για καρκινικά αντιγόνα, χρησιμοποιώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα τα οποία είχα υποστεί ωρίμανση με διάλυμα λυμένων καρκινικών κυττάρων. Παρουσιάζονται δύο CD8 T κυτταρικές γραμμές έναντι του αντιγόνου hTERT540 δύο διαφορετικών δειγμάτων, έπειτα από δύο ενεργοποιήσεις κατά τη διάρκεια της μεικτής λεμφοκυτταρικής καλλιέργειας.

#### 4.4 Στο ομφαλικό αίμα περιέχονται κυρίως παρθένοι πληθυσμοί T κυττάρων

Με βάση τη βιβλιογραφία στο ομφαλικό αίμα περιέχονται κυρίως παρθένα T κύτταρα.<sup>37</sup> Πραγματοποιώντας κυτταρομετρική φαινοτυπική ανάλυση στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την βιβλιογραφία (Εικόνα 33). Τόσο στον CD4 όσο και στον CD8 T κυτταρικό πληθυσμό, τα κύτταρα εκφράζουν κυρίως την ισομορφή CD45RA, δείχνοντας ότι αποτελούν παρθένα T κύτταρα τα οποία δεν έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο. Παρόλα αυτά, με την μέθοδο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι δυνατός ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αντιγονοειδικών κυττάρων που αναπτύχθηκαν στη συνέχεια. Σε μία μελέτη στην οποία πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός αντιγονοειδικών T κυττάρων ομφαλικού αίματος, τα κύτταρα αυτά παρουσίαζαν φαινότυπο παρθένων T κυττάρων (CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>).<sup>56</sup>



**Εικόνα 33.** Έκφραση των ισομορφών CD45RA/RO στους πληθυσμούς των CD4 και CD8 T κυττάρων του ομφαλικού αίματος.

#### 4.5 Συχνότητα των κυκλοφορούντων CD8 T κυττάρων έναντι αντιγόνων του όγκου στο ομφαλικό αίμα

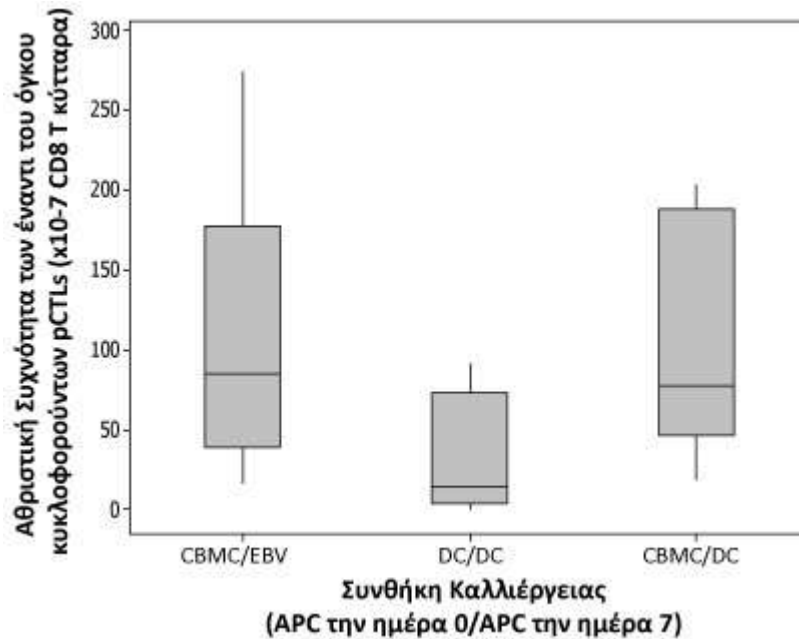
Για τον υπολογισμό της συχνότητας των κυκλοφορούντων CD8 T κυττάρων, με ειδικότητα έναντι αντιγόνων του όγκου, στο ομφαλικό αίμα, χρησιμοποιήθηκαν 9 διαφορετικά δείγματα ομφαλικού αίματος. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε απομόνωση μονοπύρηνων, ενώ

για τον υπολογισμό της συχνότητας πραγματοποιήθηκε μικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (παρ. 3.6). Πέραν του βασικού πρωτοκόλλου (CBMC/EBV), σε ορισμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν επιπλέον συνθήκες, αλλάζοντας τον σύστημα αντιγονοπαρουσίασης. Έτσι, σε ορισμένα δείγματα η αντιγονοπαρουσίαση πραγματοποιήθηκε από CBMC την ημέρα 0 και από DCs την ημέρα 7 (συνθήκη CBMC/DCs) και σε άλλα, από DCs τόσο την ημέρα 0 όσο και την ημέρα 7 (DCs/DCs).

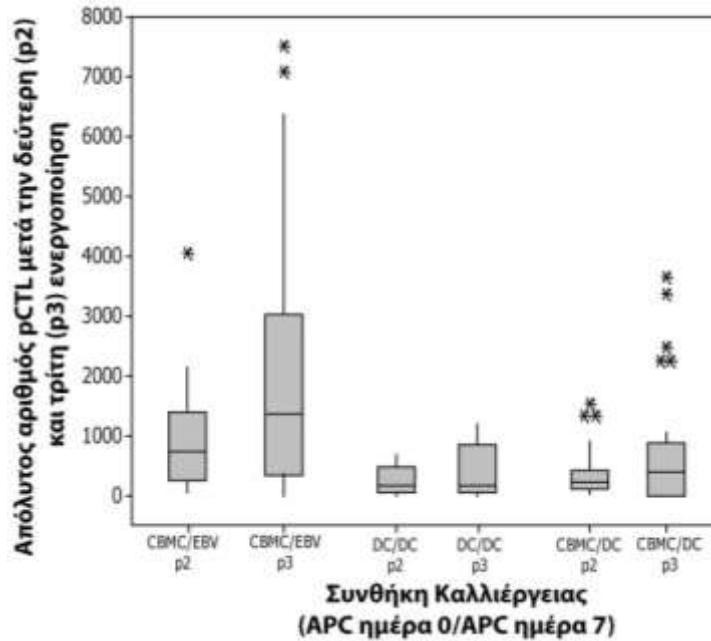
**Πίνακας 7.** Συχνότητα κυκλοφορούντων CD8 T κυττάρων, έναντι των αντιγόνων που μελετήθηκαν, στο ομφαλικό αίμα. Η συχνότητα εκφράζεται ως ο αριθμός των CD8 T κυττάρων/ $10^7$  CD8 T κύτταρα.

Δείγμα	Συνθήκη	HLA	% CD8 την ημέρα 0	Αρ. Φρεστίων	$\times 10^6$ CD8 που μελετήθηκαν	f hTERT(1LA).A2	f MAGE3.A2	f Sarvinin.A2	f MAGE1.B35	f MAGE3.B35
#1	CBMC/EBV	A02 Bxx	7,5	40	0,6	<16.6	<b>16,6</b>	<16.6		
#2	CBMC/EBV	A01 A02 B18 B27	3,6	132	1,0	<10.5	<b>21,0</b>	<10.5		
#3	CBMC/EBV	A02 A32 B35 B35	6,0	57	0,7	<b>29,2</b>	<b>29,2</b>		<b>14,6</b>	<14.6
#4	CBMC/EBV	A02	4,5	119	1,1	<b>108,0</b>	<b>129,0</b>	<b>19,0</b>		
#4	CBMC/DCs	A02	4,5	168	1,5	<b>61,0</b>	<b>13,0</b>	<7		
#4	DCs/DCs	A02	4,5	188	1,7	<b>18,0</b>	<6	<6		
#5	CBMC/EBV	A02	4,5	119	1,1	<b>28,0</b>	<b>57,0</b>	<9		
#5	CBMC/DCs	A02	4,5	174	1,6	<b>6,0</b>	<b>13,0</b>	<6		
#5	DCs/DCs	A02	4,5	184	1,7	<b>6,0</b>	<b>6,0</b>	<6		
#6	CBMC/EBV	A02	2,2	159	0,7	<14	<b>273,0</b>			
#6	CBMC/DCs	A02	2,2	152	0,7	<b>61,0</b>	<b>123,0</b>			
#6	DCs/DCs	A02	2,2	128	0,6	<18	<b>91,0</b>			
#7	CBMC/EBV	A02	5,2	136	1,4	<b>7,0</b>	<b>66,0</b>			
#7	CBMC/DCs	A02	5,2	143	1,5	<b>7,0</b>	<b>48,0</b>			
#8	CBMC/EBV	A02	2,0	152	0,6	<b>17,0</b>	<b>101,0</b>			
#8	CBMC/DCs	A02	2,0	152	0,6	<b>33,0</b>	<b>170,0</b>			
#8	DCs/DCs	A02	2,0	128	0,5	<20	<20			
#9	CBMC/EBV	A02	3,7	168	1,2	<b>41,0</b>	<b>66,0</b>			
#9	CBMC/DCs	A02	3,7	168	1,2	<b>24,0</b>	<b>56,0</b>			

Η συχνότητα των ειδικών έναντι των αντιγόνων που μελετήθηκαν CD8 T κυττάρων στο ομφαλικό αίμα, αλλά και το ποσοστό του ειδικού πληθυσμού της καλλιέργειας, διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 7). Μετά την δεύτερη εβδομάδα της καλλιέργειας, όπου πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των θετικών μικρο-καλλιέργειών, η συχνότητα των ειδικών για τα αντιγόνα MAGE-A3.A2 και hTERT540.A2 ήταν μικρότερη στη συνθήκη που χρησιμοποιήθηκαν δένδριτικά κύτταρα τις ημέρες 0 και 7 (DC/DC) της καλλιέργειας (Εικόνα 34). Ανάμεσα στις υπόλοιπες δύο συνθήκες, CBMC/EBV και CBMC/DC, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά όσον αφορά την συχνότητα στις δύο αυτές συνθήκες, ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στην συνθήκη CBMC/EBV (Εικόνα 35). Επιπλέον, μετά και την τρίτη ενεργοποίηση των κυττάρων, η ανάπτυξη του ειδικού πληθυσμού, περιορίστηκε περισσότερο στις δύο συνθήκες όπου χρησιμοποιήθηκαν δένδριτικά κύτταρα, με αποτέλεσμα ο ειδικός πληθυσμός σχεδόν να εξαλειφτεί.



**Εικόνα 34.** Σύγκριση της συχνότητας των έναντι του όγκου κυκλοφορούντων pCTLs στο ομφαλικό αίμα. Τρεις διαφορετικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό σύστημα αντιγονοπαρουσίασης τις ημέρες 0 και 7 της καλλιέργειας.

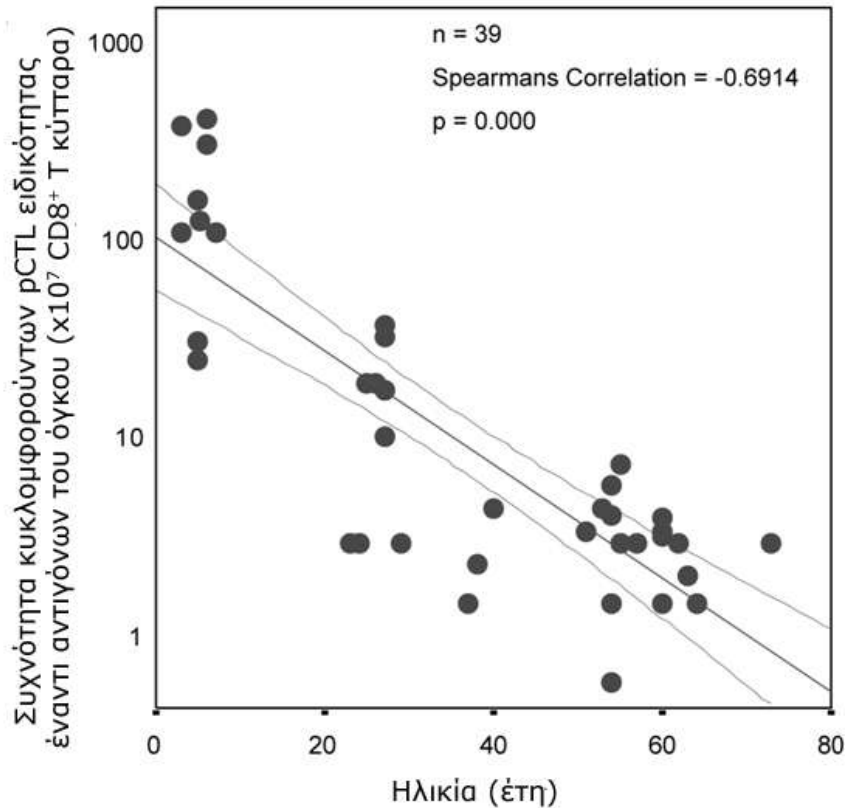


**Εικόνα 35.** Απόλυτοι αριθμοί CD8 T κυττάρων ειδικών έναντι των αντιγόνων MAGE-A3.A2 και hTERT540.A2, μετά την δεύτερη και τρίτη ενεργοποίηση.

#### 4.6 Συχνότητα ειδικών έναντι καρκινικών αντιγόνων CD8 T κυττάρων ομφαλικού αίματος

Η συχνότητα των ειδικών έναντι του όγκου CD8 T κυττάρων του ομφαλικού αίματος, συγκρίθηκε με την συχνότητα των αντίστοιχων κυττάρων, σε διάφορες ηλικιακές ομάδες, όπως προέκυψε από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου.<sup>65,71</sup> Για τον υπολογισμό της συχνότητας των κυττάρων αυτών στο ομφαλικό αίμα, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα του βασικού πρωτοκόλλου, όπου χρησιμοποιήθηκαν CBMCs/EBV μετασχηματισμένα B κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς αυτό ήταν και το πρωτόκολλο ανάπτυξης των αντιγονοειδικών πληθυσμών από περιφερικό αίμα ενηλίκων. Για να εξετάσουμε τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται η συχνότητα των κυκλοφορούντων pCTLs, πραγματοποιήσαμε ανάλυση κατά Spearman σε συνολικά 39 δείγματα. Με βάση την ανάλυση προκύπτει ότι η αθροιστική συχνότητα των κυκλοφορούντων pCTLs για τα αντιγόνα MAGE-A3.A2 και hTERT540.A2 μειώνεται με την πρόοδο της ηλικίας (-0.6914) (Εικόνα 36).

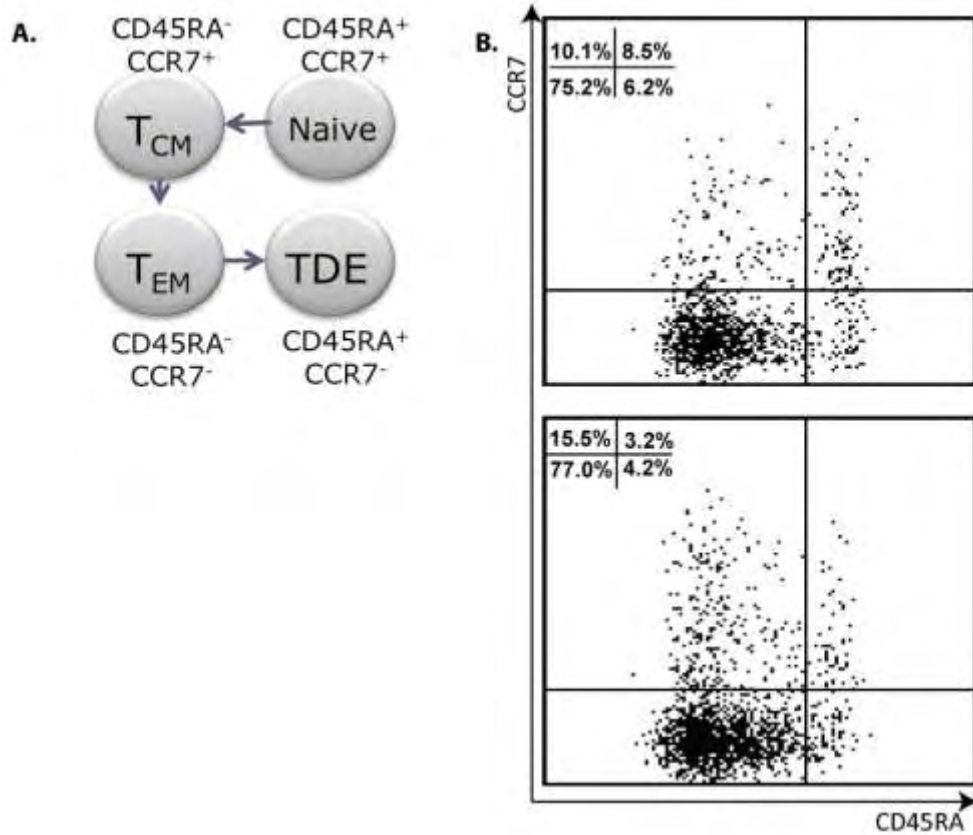




**Εικόνα 36.** Η αθροιστική συχνότητα των ειδικών έναντι του όγκου CD8 T κυττάρων είναι μεγαλύτερη στο ομφαλικό αίμα, ενώ μειώνεται σημαντικά προϋούσης της ηλικίας.

#### 4.7 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Με βάση την έκφραση ορισμένων δεικτών επιφανείας είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός του σταδίου διαφοροποίησης των T κυττάρων. Τέσσερα είναι τα βασικά στάδια διαφοροποίησης των T κυττάρων με βάση την έκφραση των ισομορφών CD45RA/RO και την έκφραση του υποδοχέα CCR7 (Εικόνα 37, A).<sup>72</sup> Η πρώτη κατηγορία αποτελείται από τα παρθένα T κύτταρα τα οποία δεν έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο και παρουσιάζουν φαινότυπο CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. Μνημονικούς πληθυσμούς αποτελούν η ομάδα των CM κυττάρων (Central Memory: CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>) και η ομάδα των EM κυττάρων (Effector Memory: CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>) και η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει τα τελικώς διαφοροποιημένα T κύτταρα (Terminally Differentiated: CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>). Σε ορισμένες κυτταρικές γραμμές επιχειρήθηκε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αντιγονοειδικών πληθυσμών. Η επιλογή των γραμμών έγινε με βάση το ποσοστό του ειδικού για το πολυμερές πληθυσμού. Έτσι, έπειτα από έξι ενεργοποιήσεις, ο αντιγονοειδικός πληθυσμός των CD8 T κυττάρων παρουσίαζε φαινότυπο μνημονικών κυττάρων (T<sub>EM</sub>) (Εικόνα 37, B).



**Εικόνα 37.** Α) Στάδια διαφοροποίησης Τ κυττάρων με βάση την έκφραση των CD45RA/RO και CCR7. Β) Ο αντιγονοειδικός πληθυσμός CD8 Τ κυττάρων, έπειτα από έξι ενεργοποιήσεις, παρουσιάζει κυρίως φαινότυπο μνημονικών κυττάρων.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης, το ανοσιακό σύστημα αναγνωρίζει και καταστρέφει τα εξαλλαγμένα κύτταρα, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εμφάνιση κάποιου όγκου. Παρόλα αυτά, τα καρκινικά κύτταρα, μέσω διαφόρων μηχανισμών μπορούν να διαφύγουν από την επιτήρηση του ανοσιακού συστήματος. Για να γίνει η μετάβαση από το στάδιο της ανοσο-επιτήρησης σε αυτό της ανοσιακής διαφυγής, έχει προηγηθεί ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο, τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Με βάση τη θεωρία της ανοσο-διαμόρφωσης, τα καρκινικά κύτταρα, επιδρούν είτε άμεσα είτε έμμεσα στα T κύτταρα, καθιστώντας τα ανενεργά.<sup>1,73</sup> Συνεπώς, η χρήση αυτόλογων T κυττάρων σε πρωτόκολλα παθητικής ανοσοθεραπείας παρουσιάζει περιορισμένες δυνατότητες.

Σκοπός της ανοσοθεραπείας του καρκίνου είναι η επαγωγή και η ενίσχυση μιας προϋπάρχουσας ανοσιακής απάντησης, έναντι του όγκου. Στην περίπτωση της παθητικής ανοσοθεραπείας, σκοπός είναι ο *ex vivo* πολλαπλασιασμός των ειδικών έναντι του όγκου CD8 T κυττάρων και στη συνέχεια η χορήγηση μεγάλων αριθμών ενεργοποιημένων CD8 T κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια θα αναγνωρίσουν και θα καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Οπότε, βασική προϋπόθεση, για την επιτυχία της μεθόδου είναι η ύπαρξη αυτών των κυττάρων στην κυκλοφορία. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά θα πρέπει να είναι ικανά να πραγματοποιήσουν έναν μεγάλο αριθμό διαιρέσεων, *in vitro*, διατηρώντας τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται ώστε να αναγνωρίσουν και να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα *in vivo*.

Για την ανάπτυξη των CD8 T κυτταρικών κλώνων, ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου, αρχικά θα πρέπει να απαντηθούν ορισμένα ερωτήματα. Το πρώτο ερώτημα αναφέρεται στο ποιος θα πρέπει να είναι ο φαινότυπος των T κυττάρων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα παθητικής ανοσοθεραπείας. Με βάση αποτελέσματα που προκύπτουν κυρίως από πειραματόζωα, το στάδιο διαφοροποίησης των T κυττάρων, που χρησιμοποιήθηκαν σε πρωτόκολλα παθητικής ανοσοθεραπείας, σχετιζόνταν με προστασία που παρείχε ο εμβολιασμός. Τελικώς διαφοροποιημένα T κύτταρα δεν παρείχαν προστασία στον οργανισμό, αντίθετα με τους διαφορετικούς τύπους μνημονικών κυττάρων.<sup>74</sup> Από τους μνημονικούς πληθυσμούς, τα κεντρικά μνημονικά (T<sub>CM</sub>) κύτταρα παρείχαν μεγαλύτερη προστασία σε βάθος χρόνου σε σχέση με τα δραστικά μνημονικά (T<sub>EM</sub>) κύτταρα, ενώ τα T<sub>EM</sub> κύτταρα παρουσίαζαν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα μετά τον εμβολιασμό, σε σχέση με τα T<sub>CM</sub>. Συνολικά, η άποψη που επικρατεί είναι ότι η ταυτόχρονη χορήγηση T<sub>CM</sub> και T<sub>EM</sub>, μπορεί να προσφέρει δραστική και μακροχρόνια προστασία έναντι του καρκίνου.<sup>74</sup>

Συνέχεια του πρώτου ερωτήματος αποτελεί το δεύτερο ερώτημα που θέλει να απαντήσει το ποιες είναι οι συνθήκες για την ανάπτυξη CD8 T κυτταρικών κλώνων, *in vitro*, με τον επιθυμητό φαινότυπο. Μια σειρά από κυτταρόκινες όπως η IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 και IL-21, αλλά και συνδυασμοί αυτών, έχουν χρησιμοποιηθεί σε κύτταρα ενηλίκων αλλά και σε κύτταρα ομφαλικού αίματος για την ανάπτυξη αντιγονοειδικών CD8 T κυττάρων.<sup>54,55,56,75</sup> Ανάλογα με τον συνδυασμό των κυτταροκινών και τον τρόπο ενεργοποίησης των κυττάρων, παρατηρούνταν διαφορετικός φαινότυπος του αντιγονοειδικού πληθυσμού, μετά το τέλος της καλλιέργειας. Ενδιαφέρον παρουσίασε η χρήση της IL-21 η οποία παρουσίαζε ανταγωνιστική δράση ως προς την έκφραση του CD28 μορίου, σε σχέση με την IL-15, διατηρώντας την έκφραση του CD28. Ακόμη, σε συνδυασμό με την IL-15 και την IL-7, οδηγούσε στην ανάπτυξη κυρίως κεντρικών μνημονικών T πληθυσμών, από κύτταρα ενηλίκων, ενώ δεν έχει δοκιμασθεί κάτι αντίστοιχο και κύτταρα ομφαλικού αίματος.<sup>75,76</sup> Επίσης, υπήρχαν μελέτες σε πειραματόζωα, όπου CD8 T κυτταρικοί πληθυσμοί με μεγάλη *in vitro* κυτταροτοξικότητα παρουσίαζαν, μειωμένη προστασία *in vivo* και αντίστροφα, δείχνοντας ότι μπορεί να προκύψουν παραπλανητικά αποτελέσματα λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα *in vitro* δεδομένα.<sup>74</sup>

Παρά τις εκτενείς μελέτες γύρω από τις διάφορες προσεγγίσεις της ανοσοθεραπείας του καρκίνου, τα κλινικά αποτελέσματα παραμένουν χαμηλά, κάτω από το 3%.<sup>4</sup> Αυτό το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου, ενδέχεται να οφείλεται σε παράγοντες όπως η ανοσογήρανση, αλλά και επίδραση που ασκούν τα καρκινικά κύτταρα σε αυτά του ανοσιακού συστήματος.

Σύμφωνα με το φαινόμενο της γήρανσης του ανοσιακού συστήματος και γενικότερα γύρω από την βιολογία των T κυττάρων, έχει παρατηρηθεί ότι προϊούσης της ηλικίας πραγματοποιούνται τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές μεταβολές. Ειδικότερα, βασικό χαρακτηριστικό των ηλικιωμένων αποτελεί η υποστρόφη του θύμου αδένα η οποία ακολουθείται από περιορισμένη παραγωγή παρθένων T κυττάρων, μείωση της ποικιλομορφίας των TCR υποδοχέων και συσσώρευση μνημονικών πληθυσμών ειδικών για συχνά, συνήθως ιικά, αντιγόνα.<sup>6</sup> Επιπλέον, οι ειδικοί έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυτταρικοί πληθυσμοί, λόγω των συνεχών διαιρέσεων και ενεργοποιήσεων, μπορούν να υποστούν αντιγραφική γήρανση, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού όπως και μειωμένη λυτική ικανότητα.<sup>10</sup> Κατά συνέπεια, οι μεταβολές που περιγράφονται στο φαινόμενο της ανοσογήρανσης, αλλά και της αντιγραφικής γήρανσης των T κυττάρων, ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν βασικό παράγοντα αποτυχίας της ανοσοθεραπείας του καρκίνου.<sup>77,78</sup>

Σε μια προσπάθεια να παρακάμψουμε τις επιπτώσεις της ανοσογήρανσης στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των T κυττάρων, που χρησιμοποιούνται σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας, θελήσαμε να μελετήσουμε τα κύτταρα αυτά στο ομφαλικό αίμα. Ο λόγος για τον οποίο, στην

παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα του ομφαλικού αίματος είναι ότι τα κύτταρα αυτά, έχουν υποστεί στο ελάχιστο της επιπτώσεις της ηλικιακής και της αντιγραφικής γήρανσης, ενώ ακόμη αναμένεται να αναγνωρίζουν καλύτερα τα καρκινικά κύτταρα, καθώς δεν έχουν έρθει ξανά σε επαφή με αυτά. Έτσι, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο υπολογισμός της συχνότητας των ειδικών για τα αντιγόνα του όγκου CD8 T κυττάρων, στο ομφαλικό αίμα και στη συνέχεια ο φαινοτυπικός τους χαρακτηρισμός.

Επίσης, για την ανάπτυξη των παρθένων T κυττάρων του ομφαλικού αίματος, περιγράφεται στη βιβλιογραφία η χρήση δενδριτικών κυττάρων ως αντιγονοπαρουσιαστικών. Στην παρούσα εργασία ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα κατά τη μεικτή λεμφοκυτταρική καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν είτε EBV μετασχηματισμένα B κύτταρα είτε δενδριτικά κύτταρα. Ωστόσο, η χρήση δενδριτικών κυττάρων ως αντιγονοπαρουσιαστικών δεν βοήθησε ιδιαίτερα την ανάπτυξη των CD8 T κυττάρων του ομφαλικού αίματος. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν EBV μετασχηματισμένα B κύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά, η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν μεγαλύτερη, ενώ μετά από συνεχείς ενεργοποιήσεις, τα κύτταρα αυτά παρουσίαζαν έναν φαινότυπο δραστικών μνημονικών κυττάρων ( $T_{EM}$ ).

Αναφορικά με την συχνότητα των κυττάρων αυτών, αρχικά πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της συχνότητάς τους στο ομφαλικό αίμα και στη συνέχεια συσχέτιση της συχνότητας αυτής με την αντίστοιχη συχνότητα άλλων ηλικιακών ομάδων. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η αθροιστική συχνότητα των έναντι του όγκου pCTLs είναι μεγαλύτερη στο ομφαλικό αίμα σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες, ενώ η συχνότητα αυτή μειώνεται προοίως της ηλικίας, σε υγιείς ηλικιωμένους ( $r=-0.6914$ ,  $n=39$ ,  $p<0.001$ ) (Εικόνα 36). Επίσης, η συχνότητα αυτή είναι μεγαλύτερη από την συχνότητα που εντοπίσαμε σε προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου, σε ασθενείς με καρκίνο. Παρατηρώντας αυτήν την μείωση στη συχνότητα με την πρόοδο της ηλικίας, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι «γεννιόμαστε έτοιμοι» για να αντιμετωπίσουμε την εμφάνιση νεοπλασματικών κυττάρων, σε κάποια χρονική στιγμή στην ενήλικη ζωή. Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, καθώς ο οργανισμός διατηρεί σημαντική συχνότητα ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων, μέχρι την αναπαραγωγική ηλικία, ίσως θα πρέπει να αλλάξουμε οπτική γωνία αναφορικά με τις παραμέτρους οι οποίες επηρεάζουν την έκβαση της ανοσοθεραπείας του καρκίνου και λάβουμε περισσότερο υπόψη τις επιπτώσεις της αντιγραφικής και ηλικιακής γήρανσης των T κυττάρων των ασθενών. Επίσης, καθώς η συχνότητα των ειδικών έναντι αντιγόνων του όγκου CD8 T κυττάρων είναι αυξημένη στο ομφαλικό αίμα και τον πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει το ομφαλικό αίμα, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η προτυποποίηση των συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων αυτών, όπως και ο εκτενής *in vitro* και *in vivo* χαρακτηρισμός τους.

---

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1 KIM R, EMI M, TANABE K. CANCER IMMUNOEDITING FROM IMMUNE SURVEILLANCE TO IMMUNE ESCAPE. IMMUNOLOGY 2007, 121: 1-14
- 2 GERMENIS AE, KARANIKAS V. IMMUNOEPIGENETICS: THE UNSEEN SIDE OF CANCER IMMUNEDITING. IMMUNOL CELL BIOL 2007 85: 55-9
- 3 ROSENBERG SA, RESTIFO NP, YANG JC, MORGAN RA, DUDLEY ME. ADOPTIVE CELL THERAPY: A CLINICAL PATH TO EFFECTIVE CANCER IMMUNOTHERAPY. NAT REV CANCER 2008, 8: 299-308
- 4 ROSENBERG SA, YANG JC, RESTIFON NP. CANCER IMMUNOTHERAPY: MOVING BEYOND CURRENT VACCINES. NAT MED 2004, 10: 909-15
- 5 PAWELEC G, LARBI A, DERHOVANESSIAN E. SENESCENCE OF THE HUMAN IMMUNE SYSTEM. J COMP PATHOL 2010, 1: S39-44
- 6 NIKOLICH-ZUGICH J, AGEING AND LIFE-LONG MAINTENANCE OF T-CELL SUBSETS IN THE FACE OF LATENT PERSISTENT INFECTIONS, NAT REV IMMUNOL 2008 8: 512-22
- 7 PAWELEC G, DERHOVANESSIAN E, LARBI A. IMMUNOSENESCENCE AND CANCER. CRIT REV ONCOL HEMATOL, 2010 75: 165-72
- 8 MALAGUARNERA L, CRISTALDI E, MALAGUARNENA M. THE ROLE OF IMMUNITY IN ELDERLY CANCER. CRIT REV ONCOL HEMATOL 2010, 74: 40-60
- 9 MILLER RA, BERGER SB, BURKE DT, GALECKI A, GARCIA GG, HARPER JM, SADIGHI AKHA AA. T CELLS IN AGING MICE: GENETIC, DEVELOPMENTAL, AND BIOCHEMICAL ANALYSIS. IMMUNOL REV 2005, 205: 94-103
- 10 EFFROS RB, REPLICATIVE SENESCENCE IN THE IMMUNE SYSTEM: IMPACT OF THE HAYFLICK LIMIT ON T-CELL FUNCTION IN THE ELDERLY, AM J HUM GENET 1998 62: 1003-7
- 11 ADIBZADEH M, POHLA H, REHBEIN A, PAWELEC G, LONG-TERM CULTURE OF MONOCLONAL HUMAN T LYMPHOCYTES: MODELS FOR IMMUNOSENESCENCE?, MECH AGEING DEV 1995 83: 171-83
- 12 SPAULDING C, GUO W, EFFROS RB, RESISTANCE TO APOPTOSIS IN HUMAN CD8+ T CELLS THAT REACH REPLICATIVE SENESCENCE AFTER MULTIPLE ROUNDS OF ANTIGEN-SPECIFIC PROLIFERATION, EXP GERONTOL 1999 34: 633-44
- 13 EFFROS RB, BOUCHER N, PORTER V, ZHU X, SPAULDING C, WALFORD RL, KRONENBERG M, COHEN D, SCHACHTER F, DECLINE IN CD28+ T CELLS IN CENTENARIANS AND IN LONG-TERM T CELL CULTURES: A POSSIBLE CAUSE FOR BOTH IN VIVO AND IN VITRO IMMUNOSENESCENCE, EXP GERONTOL 1994B 29: 601-9
- 14 LENSCHOW DJ, WALUNAS TL, BLUESTONE JA., CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION., ANNU REV IMMUNOL 1996 14: 233-58
- 15 VALLEJO AN, CD28 EXTRACTIN IN HUMAN T CELLS: ALTERED FUNCTIONS AND THE PROGRAM OF T-CELL SENESCENCE., IMMUNOL REV 2005 205: 158-69
- 16 DAGARAG M, EVAZYAN T, RAO N, EFFROS RB, GENETIC MANIPULATION OF TELOMERASE IN HIV-SPECIFIC CD8+ T CELLS: ENHANCED ANTIVIRAL FUNCTIONS ACCOMPANY THE INCREASED PROLIFERATIVE POTENTIAL AND TELOMERE LENGTH STABILIZATION, J IMMUNOL 2004 173: 6303-11

- 17 YANG OO, LIN H, DAGARAG M, NG HL, EFFROS RB, UITTENBOGAART CH, DECREASED PERFORIN AND GRANZYME B EXPRESSION IN SENESCENT HIV-1-SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES, *VIROLOGY* 2005 332: 16-9
- 18 LYNCH HE, GOLDBERG GL, CHIDGEY A, VAN DEN BRINK MR, BOYD R, SEMPOWSKI GD, THYMIC INVOLUTION AND IMMUNE RECONSTITUTION, *TRENDS IMMUNOL* 2009 30: 366-73
- 19 STEINMANN GG< KLAUS B, MULLER-HERMELING HK, THE INVOLUTION OF THE AGEING HUMAN THYMIC EPITHELIUM IS INDEPENDENT OF PUBERTY. A MORPHOMETRIC STUDY, *SCAND J IMMUNOL* 1995 22: 563-75
- 20 PFISTER G, WISKOPF D, LAZUARDI L, KOVAINOU RD, CIOCA DP, KELLER M, LORBEG B, PARSON W, GRUBECK-LOEBENSTEIN B. *NAÏVE* T CELLS IN THE ELDERLY: ARE THEY STILL THERE?. *ANN N Y ACAD SCI* 2006, 1067: 152-7
- 21 MESSAOUDI I, LEMAULT J, GUEVARA-PATINO JA, METZNER BM, NIKOLICH-ZUGICH J, AGE-RELATED CD8 T CELL CLONAL EXPANSIONS CONSTRICT CD8 T CELL REPERTOIRE AND HAVE THE POTENTIAL TO IMPAIR IMMUNE DEFENCE, *J EXP MED* 2004 200: 1347-58
- 22 KHAN N, HISLOP A, GUDGEON N, COBBOLD M, KHANNA R, NAYAK L, RICHINSON AB, MOSS PA, HERPERSVIRUS-SPECIFIC CD8 T CELL IMMUNITY IN OLD AGE: CYTOMEGALOVIRUS IMPAIRS THE RESPONSE TO A CONSIDENT EBV INFECTION, *J IMMUNOL* 2004 173: 7481-9
- 23 TRZONKOWSKI P, MYSLIWSKA J, SZMIT E, WIECHIEWICZ J, LUKASZUK K, BRYDAK LB, MACHALA M, MYSLIWSKI A, ASSOCIATION BETWEEN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION, ENHANCED PROINFLAMMATORY RESPONSE AND LOW LEVEL OF ANTI-HAMAGGLUTININS DURING THE ANTI-INFLUENZA VACCINATION-AN IMPACT OF IMMUNOSENESCENCE, *VACCINE* 2003 21: 3826-36
- 24 OLSSON J, WIKBY A, JOHANSSON B, LOFGREN B, NILSSON BO, FERGUSON FG, AGE-RELATED CHANGE IN PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN THE VERY OLD: THE SWEDISH LONGITUDINAL OCTO IMMUNE STUDY, *MECH AGEING DEV* 2000 121: 187-201
- 25 OUYANG Q, WAGNER WM, WALTER S, MULLER CA, WIKBY A, AUBERT G, KLATT T, STEVANOVIC S, DODI T, PAWELEC G, AN AGE-RELATED INCREASE IN THE NUMBER OF CD8+ T CELLS CARRYING RECEPTORS FOR AN IMMUNODOMINANT EPSTAIN-BARR VIRUS (EBV) EPIOTOPE IS COUNTERACTED BY A DECREASED FREQUENCY OF THEIR ANTIGEN-SPECIFIC RESPONSIVENESS, *MECH AGEING DEV* 2003 124: 477-85
- 26 HADRUP SR, STRINDHALL J, KOLLGAARD T, SEREMET T, JOHANSSON B, PAWELEC G, THOR STRATEN P, WIKBY A, LONGITUDINAL STUDIES OF CLONALLY EXPANDED CD8 T CELLS REVEAL A REPERTOIRE SHRINKAGE PREDICTING MORTALITY AND AN INCREASED NUMBER OF DYSFUNCTIONAL CYTOMEGALOVIRUS-SPECIFIC T CELLS IN THE VERY ELDERLY, *J IMMUNOL* 2006 176: 2645-53
- 27 SCOTT BJ, POWERS DC, JOHNSON JE, MORLEY JE, SEROEPIDEMIOLOGIC EVIDENCE OF EPSTEIN-BARR VIRUS REACTIVATION IN VETENARIANS' NURSING HOME, *SERODIAGN IMMUNOTHER INFECT DIS* 1994 6: 87-92
- 28 APPAY V, DUNBAR PR, CALLAN M, KLENERMAN P, GILLESPIE GM, PAPAGNO L, OGG GS, KING A, LECHNER F, SPINA CA, LITTLE S, HAVLIR DV, RICHMAN DD, GRUENER N, PAPE G, WATERS A, EASTERBROOK P, SALIO M, CERUNDOLO V, McMICHAEL AJ, ROWLAND-JONES SL, MEMORY CD8+ T CELLS VARY IN DIFFERENTIATION PHENOTYPE IN DIFFERENT PERSISTENT VIRUS INFECTIONS, *NAT MED* 2002 8: 379; 85
- 29 AKBAR AN, BEVERLEY PC, SALMON M, WILL TELOMERE EROSION LEAD TO LOSS OF T-CELL MOMORY?, *NAT REV IMMUNOL* 2004 4: 737-43

- 
- 30 PAWELEC G, DERHOVANESSIAN E, LARBI A. IMMUNOSENESCENCE AND CANCER. *CRIT REV ONCOL HEMATOL* 2010, 75:165-72
- 31 MALAGUARNERA L, CRISTALDI E, MALAGUARNERA M. THE ROLE OF IMMUNITY IN ELDERLY CANCER. *CRIT REV ONCOL HEMATOL* 2010, 74:40-60
- 32 GERMENIS AE, KARANIKAS V. CORD BLOOD AS A SOURCE OF NON-SENESCENT LYMPHOCYTES FOR TUMOR IMMUNOTHERAPY. *J REPROD IMMUNOL* 2010, EPUB AHEAD OF PRINT
- 33 CHARRON D. AUTOLOGOUS WHITE BLOOD CELL TRANSFUSION: TOWARD A YOUNGER IMMUNITY. *HUM IMMUNOL* 2007, 68:805-12
- 34 BROWN JA, BOUSSIOTIS VA. UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTATION: BASIC BIOLOGY AND CLINICAL CHALLENGES TO IMMUNE RECONSTITUTION. *CLIN IMMUNOL* 2008, 127:286-97
- 35 ROCHA V, WAGNER JE JR, SOBOCINSKI KA, KLEIN JP, ZHANG MJ, HOROWITZ MM, GLUCKMAN E. GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE IN CHILDREN WHO HAVE RECEIVED A CORD-BLOOD OR BONE MARROW TRANSPLANT FROM AN HLA-IDENTICAL SIBLING. EUROCORD AND INTERNATIONAL BONE MARROW TRANSPLANT REGISTRY WORKING COMMITTEE ON ALTERNATIVE DONOR AND STEM CELL SOURCES. *N ENGL J MED* 2000, 342:1846-54
- 36 HARRIS DT. NON-HAEMATOLOGICAL USES OF CORD BLOOD STEM CELLS. *BR J HAEMATOL* 2009, 147:177-84
- 37 D'ARENA G, MUSTO P, CASCAVILLA N, DI GIORGIO G, FUSILLI S, ZENDOLI F, CAROTENUTO M. FLOW CYTOMETRIC CHARACTERIZATION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD LYMPHOCYTES: IMMUNOPHENOTYPIC FEATURES. *HAEMATOLOGICA* 1998, 83:197-203
- 38 RISDON G, GADDY J, STEHMANN FB, BROXMEYER HE. PROLIFERATIVE AND CYTOTOXIC RESPONSES OF HUMAN CORD BLOOD T LYMPHOCYTES FOLLOWING ALLOGENEIC STIMULATION. *CELL IMMUNOL* 1994, 154:14-24
- 39 HAGIHARA M, CHARGUI J, GANSUVD B, TSUCHIDA F, SATO T, HOTTA T, KATO S. UMBILICAL CORD BLOOD T LYMPHOCYTES ARE INDEED TO APOPTOSIS AFTER BEING ALLO-PRIMED IN VITRO. *BONE MARROW TRANSPLANT* 1999, 24:1229-33
- 40 PORCU P, GADDY J, BROXMEYER HE. ALLOANTIGEN-INDUCED UNRESPONSIVENESS IN CORD BLOOD T LYMPHOCYTES IS ASSOCIATED WITH DEFECTIVE ACTIVATION OF RAS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 1998, 95:4538-43
- 41 KADEREIT S, MOHAMMAD SF, MILLER RE, WOODS KD, LISTROM CD, MCKINNON K, ALALI A, BOS LS, IACOBUCCI ML, SRAMKOSKI MR, JACOBBERGER JW, LAUGHLIN MJ. REDUCED NFAT1 PROTEIN EXPRESSION IN HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD T LYMPHOCYTES. *BLOOD* 1999 94:3101-7
- 42 WEITZEL RP, LESNIWSKI ML, HAVIERNIK P, KADEREIT S, LEAHY P, GRECO NJ, LAUGHLIN MJ. MICRORNA 184 REGULATES EXPRESSION OF NFAT1 IN UMBILICAL CORD BLOOD CD4+ T CELLS. *BLOOD* 2009, 113:6648-57
- 43 RAO A, LUO C, HOGAN PG. TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: REGULATION AND FUNCTION. *ANNU REV IMMUNOL* 1997, 15:707-47
- 44 KAMINSKI BA, KADEREIT S, MILLER RE, LEAHY P, STEIN KR, TOPA DA, RADIOVOYEVITCH T, VEIGL ML, LAUGHLIN MJ. REDUCED EXPRESSION OF NFAT-ASSOCIATED GENES IN UCB VERSUS ADULT CD4+ T LYMPHOCYTES DURING PRIMARY STIMULATION. *BLOOD* 2003, 102:4608-17
-



- 
- 45 LESNIEWSKI ML, HAVIERNIK P, WEITZEL RP, KADEREIT S, KOZIK MM, FANNING LR, YANG YC, HEGERFELDT Y, FINNEY MR, RATAJCZAK MZ, GRECO N, PAUL P, MACIEJEWSKI J, LAUGHLIN MJ. REGULATION OF IL-2 EXPRESSION BY TRANSCRIPTION FACTOR BACH2 IN UMBILICAL CORD BLOOD CD4+ T CELLS. LEUKEMIA 2008, 22: 2201-7
- 46 AZUMA H ET AL., FUNCTIONAL EVALUATION OF EX VIVO EXPANDED CORD BLOOD LYMPHOCYTES: POSSIBLE USE FOR ADOPTIVE CELLULAR IMMUNOTHERAPY. EXP HEMATOL 2002, 30: 346-51
- 47 PARMAR S, ROBINSON SN, KOMANDURI K, ST JOHN L, DECKER W, XING D, YANG H, McMANNIS J, CHAMPLIN R, DE LIMA M, MOLLDREM J, RIEBER A, BONYHADI M, BERENSON R, SHPALL EJ. EX VIVO EXPANDED UMBILICAL CORD BLOOD T CELLS MAINTAIN NAIVE PHENOTYPE AND TCR DIVERSITY. CYTOTHERAPY 2006, 8: 149-57
- 48 ROBINSON KL, AYELLO J, HUGHES R, VAN DE VEN C, ISSITT L, KURTZBERG J, CAIRO MS. EX VIVO EXPANSION, MATURATION, AND ACTIVATION OF UMBILICAL CORD BLOOD-DERIVED T LYMPHOCYTES WITH IL-2, IL-12, ANTI-CD3, AND IL-7. POTENTIAL FOR ADOPTIVE CELLULAR IMMUNOTHERAPY POST-UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTATION. EXP HEMATOL. 2002, 30: 245-51
- 49 DAVIS CC, MARTI LC, SEMPOWSKI GD, JEYARAJ DA, SZABOLCS P. INTERLEUKIN-7 PERMITS TH1/TC1 MATURATION AND PROMOTES EX VIVO EXPANSION OF CORD BLOOD T CELLS: A CRITICAL STEP TOWARD ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY AFTER CORD BLOOD TRANSPLANTATION. CANCER RES 2010, 70: 5249-58
- 50 GRINHGUIS SI, DE LEIJ LF, VARSCHUREN EW, BORGER P, VELLENGA E. INTERLEUKIN-7 UPREGULATES-2-GENE EXPRESSION IN ACTIVATED HUMAN T LYMPHOCYTES AT THE TRANSCRIPTIONAL LEVEL BY ENHANCING THE DNA BINDING ACTIVITIES OF BOTH NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS AND ACTIVATOR PROTEIN-1. BLOOD 1997, 90: 2690-700
- 51 KRUMBIEGEL D, ZEPP F, MEYER CU. COMBINED TOLL-LIKE RECEPTOR AGONISTS SYNERGISTICALLY INCREASE PRODUCTION OF INFLAMMATORY CYTOKINES IN HUMAN NEONATAL DENDRITIC CELLS. HUM IMMUNOL 2007, 68: 813-22
- 52 ATHIE.MORALES V, SMITS HH, CANTRELL DA, HILKENS CM. SUSTAINED IL-12 SIGNALING IS REQUIRED FOR TH1 DEVELOPMENT. J IMMUNOL 2004, 172: 61-9
- 53 HANLEY PJ, CRUZ CR, SAVOLDO B, LEEN AM, STANOJEVIC M, KHALIL M, DECKER W, MOLLDREM JJ, LIU H, GEE AP, ROONEY CM, HESLOP HE, DOTTI G, BRENNER MK, SHPALL EJ BOLLARD CM. FUNCTIONALLY ACTIVE VIRUS-SPECIFIC T CELLS THAT TARGET CMV, ADENOVIRUS, AND EBV CAN BE EXPANDED FROM NAÏVE T-CELL POPULATIONS IN CORD BLOOD AND WILL TARGET A RANGE OF VIRAL EPITOPES. BLOOD 2009 114: 1958-67
- 54 WANG P, MUNGER CM, JOSHI AD, PIRRUCCELLO SJ, JOSHI SS. CYTOTOXICITY OF CORD BLOOD DERIVED HER2/NEU-SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES AGAINST HUMAN BREAST CANCER IN VITRO AND IN VIVO. BREAST CANCER RES TREAT, 2004 83: 15-23
- 55 JOSHI AD, CLARK EM, WANG P, MUNGER CM, HEGDE GV, SANDERSON S, DAVE HP, JOSHI SS. IMMUNOTHERAPY OF HUMAN NEUROBLASTOMA USING UMBILICAL CORD BLOOD-DERIVED EFFECTOR CELLS. J NEUROIMMUNE PHARMACOL 2007 2: 202-12
- 56 MERINDOL N, GRENIER AJ, CATY M, CHARRIER E, DUVAL A, DUVAL M, CHAMPAGNE MA, SOUDEYNS H. UMBILICAL CORD BLOOD T CELLS RESPOND AGAINST THE MELAN-A/MART-1 TUMOR ANTIGEN AND EXHIBIT REDUCED ALLOREACTIVITY AS COMPARED WITH ADULT BLOOD-DERIVED T CELLS. J IMMUNOL 2010, 185: 856-66
- 57 [HTTP://WWW.CANCERIMMUNITY.ORG/PEPTIDEDATABASE/TCELLEPITOPES.HTM](http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm)
-

- 
- 58 VAN DER BRUGGEN P, BASTIN J, GALEWSKI T, COULIE PG, BOEL 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 WENANDY L, SORENSEN RB, SENGELOV L, SVANE IM, THOR STRATEN P, ANDERSEN MH. THE IMMUNOGENICITY OF THE hTERT540-548 PEPTIDE IN CANCER. *CLIN CANCER RES*, 2008 14: 4-7
- 60 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
- 61 SCHMITT A, BECHTER C, YAO J, GOETZ M, MACCARI B, SCHAUWECKER P, WIESNETH M, SCHMITT M. CYTOMEGALOVIRUS VACCINATION OF LEUKEMIA AND LYMPHOMA PATIENTS AFTER ALLOGENIC STEM CELL TRANSPLANTATION – VALIDATION OF A PEPTIDE VACCINE. *J IMMUNOL METHODS* 2009, 343: 140-7
- 62 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. *INT IMMUNOPHARMACOL* 2001, 1: 1235-47
- 63 IYER VN, SZYBALSKI W. A MOLECULAR MECHANISM OF MITOMYCIN ACTION: LINKING OF COMPLEMENTARY DNA STRANDS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 1963, 50: 355-62
- 64 WU KY, WANG HZ, HONG SJ. MECHANISM OF MITOMYCIN-INDUCED APOPTOSIS IN CULTURED CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS. *MOL VIS* 2008, 14: 1705-12
- 65 KARANIKAS V, SOUKOU F, KALALA F, KERENIDI T, GRAMMOUSTIANOU ES, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. BASELINE LEVELS OF CD8+ T CELLS AGAINST SURVIVING AND SURVIVING-2B IN THE BLOOD OF LUNG CANCER PATIENTS AND CANCER-FREE INDIVIDUALS. *CLIN IMMUNOL* 2008, 129: 230-240
- 66 CHAUX P, VANTOMME V, COULIE P, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. ESTIMATION OF THE FREQUENCIES OF ANTI-MAGE-3 CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE PRECURSORS IN BLOOD FROM INDIVIDUALS WITHOUT CANCER. *INT J CANCER* 1998, 12: 538-42
- 67 KARANIKAS V, LURQUIN C, COLAU D, VAN BEREN N, DE SMET C, LETHE B, CONNEROTTE T, CORBIERE V, DEMOTTE MA, LIENARD D, DRENO B, VELU T, BOON T, COULIE PG. MONOCLONAL ANTI-MAGE-3 CTL RESPONSES IN MELANOMA PATIENTS DISPLAYING TUMOR REGRESSION AFTER VACCINATION WITH A RECOMBINANT CANARYPOX VIRUS. *J IMMUNOL* 2003, 171: 4898-904
- 68 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
- 69 BERGER TG, FEUERSTEIN B, STRASSER E, HIRCSCH U, SCHREINER D, SCHULER G, SCHULER-THURNER B. LARGE-SCALE GENERATION OF MATURE MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS FOR CLINICAL APPLICATION IN CELL FACTORIES. *J IMMUNOL METHODS* 2002, 268: 131-40
- 70 XIA H, LIU H, ZHANG G, ZHENG Y. PHENOTYPE AND FUNCTION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS FROM CHINESE RHESUS MACAQUES. *CELL MOL IMMUNOL* 2009, 6: 159-65
-

- 71 KARANIKAS V, ZAMANAKOU M, SOUKOU F, KERENIDI T, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. NATURALLY OCCURRING TUMOR-SPECIFIC CD8+ T CELL PRECURSORS IN INDIVIDUALS WITH AND WITHOUT CANCER. IMMUNOL CELL BIOL 2010 88: 575-85
- 72 SALLUSTO F, LENIG D, FORSTER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A. TWO SUBSETS OF MEMORY T LYMPHOCYTES WITH DISTINCT HOMING POTENTIALS AND EFFECTOR FUNCTIONS. NATURE 1999, 401: 708-12
- 73 BRENNER MK, HESLOP HE. ADOPTIVE T CELL THERAPY OF CANCER. CURR OPIN IMMUNOL 2010, 22: 251-7
- 74 PERRET R, RONCHESI F. MEMORY T CELLS IN CANCER IMMUNOTHERAPY: WHICH CD8 T-CELL POPULATION PROVIDES THE BEST PROTECTION AGAINST TUMOURS? TISSUE ANTIGENS 2008, 72: 187-94
- 75 WOLFL M, MERKER K, MORBACH H, VAN GOOL SW, EYRICH M, GREENBERG PD, SCHLEGEL PG. PRIMED TUMOR-REACTIVE MULTIFUNCTIONAL CD62L(+) HUMAN CD8(+) T CELLS FOR IMMUNOTHERAPY. CANCER IMMUNOL IMMUNOTHER 2010, EPUB AHEAD OF PRINT
- 76 ALVES NL, AROSA FA, VAN LIER RA. IL-21 SUSTAINS CD28 EXPRESSION ON IL-15-ACTIVATED HUMAN NAÏVE CD8+ T CELLS. J IMMUNOL 2005, 175: 755-62
- 77 PAWELEC G, DERHOVANESSIA E, LARBI A. IMMUNOSENESCENCE AND CANCER. CRIT REV ONCOL HEMATOL 2010 75: 165-72
- 78 MALAGUARNERA L, CRISTALDI E, MALAGUARNERA M. THE ROLE OF IMMUNITY IN ELDERLY CANCER. CRIT REV ONCOL HEMATOL 2010, 74: 40-60