ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Α. ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΕΙΔΙΚΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΕΓΑΛΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

<u>Στην οικογένειά μου:</u>

τους γονείς μου,
την Άννη

το Βασίλη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά τη χρονική περίοδο 2001-2004 υπό την αιγίδα του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα καθηγητή τον Καθηγητή Β. Γεωργούλια, σε συνεργασία με το εργαστήριο Ανοσολογίας-Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του Περιφερειακού Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας» με υπεύθυνο τον Δρ. Μ. Παπαμιχαήλ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, καθηγητή Β. Γεωργούλια για την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, καθώς και κατά τη συγγραφή της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής Καθηγητές Γ. Σαμώνη και Γ. Ηλιόπουλο για το ευγενικό ενδιαφέρον τους και τη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Θερμά ευχαριστώ το διευθυντή του τμήματος Ανοσολογίας-Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» Δρ. Μ. Παπαμιχαήλ για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στον κόσμο της έρευνας και κυρίως για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε από τα πρώτα βήματα και συνεχίζει να μου δείχνει μέχρι σήμερα.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον αναπληρωτή διευθυντή του τμήματος Ανοσολογίας-Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» Δρ. Κ. Μπαξεβάνη για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την εποικοδομητική κριτική του τόσο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ θερμά την υπεύθυνη της ερευνητικής μου ομάδας Δρ. Σ. Περέζ για την ανιδιοτελή μετάδοση των γνώσεών της και πάνω απ' όλα για το ανεκτίμητο ενδιαφέρον, την καθοδήγηση, την κατανόηση και τη διαρκή ενθάρρυνση που μου παρείχε όλα τα χρόνια της εργασίας μου στην παρούσα διατριβή.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους συναδέλφους, διδάκτορες και υποψήφιους διδάκτορες Ρ. Σωτηριάδου, Α. Γκριτζάπη, Ν. Δελλαπόρτα, Ε. Ηλιοπούλου, Δ. Νιάρχο, Τ. Παπαλέξη, Λ. Μαχαίρα και Φ. Δερμιτζόγλου για τη φιλία, την άψογη συνεργασία, την πρακτική και ηθική υποστήριξη και πάνω απ' όλα για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον ιατρό του νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» Δρ. Ι. Μισιτζή, τον ιατρό του «Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών» Επίκουρο Καθηγητή Ν. Τσαβαρή, καθώς και τους εργαζόμενους στο τμήμα Αιμοδοσίας του νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» για την ευγενική βοήθεια και προθυμία τους στην παροχή των απαραίτητων δειγμάτων χωρίς τα οποία δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Πολύτιμη ήταν η συμβολή των Δρ. V. Voelter και Δρ. H. Echner του τμήματος Φυσικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Tubingen της Γερμανίας για την ευγενική παροχή των πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου για τις θυσίες και την ακούραστη στήριξή τους σε όλη την πορεία μου μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……...……I
ABSTRACT……...….III
Εργασίες που δημοσιεύθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής……..……..V

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενική εισαγωγή: Το ανοσοποιητικό σύστημα
   1.1. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος……..1
   1.2. Τα κύρια κύτταρα που συμμετέχουν στον κυτταρικό κλάδο της επίκτητης ανοσίας: Τ λεμφοκύτταρα και κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων……2
      1.2.1. Επιφανειακά μόρια (δείκτες) Τ λεμφοκυττάρων……...4
      1.2.2. Παραγωγή ώριμων Τ λεμφοκυττάρων……...7
   1.3. Αναγνώριση αντιγόνων από τα Τ λεμφοκύτταρα……..…9
      1.3.1. Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας……..9
      1.3.2. Επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων…….…….11
      1.3.3. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στα μόρια MHC και τον TCR……15
   1.4. Κυτταρική συνεργασία για την ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης…...15
      1.4.1. Έναρξη ανοσολογικής απόκρισης……15
      1.4.2. Συνδιεγερτικά μόρια…….16
      1.4.3. TH1, TH2 τύπος ανοσοαπόκρισης……...18
      1.4.4. Δραστικά (effector) Τ λεμφοκύτταρα…….……...……..20
      1.4.5. Κυτταροτοξικότητα με τη μεσολάβηση Τ κυττάρων……...21
      1.4.6. Κύτταρα μνήμης……...24
      1.4.7. Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα……26
   1.5. Κυτταροκίνες……..28
   1.6. Μοντέλα ενεργοποίησης των κυττάρων του ειδικού κλάδου του ανοσοποιητικού συστήματος……..31
      1.6.1. Κλασικό μοντέλο διάκρισης εαυτού από μη εαυτό……..31
      1.6.2. Μοντέλο «εντόπισης-δόσης-χρόνου» ……32
      1.6.3. Μοντέλο «αναγνώρισης δομής από υποδοχείς» ……...……..32
      1.6.4. Μοντέλο «κινδύνου» ……...33
2. Ειδική εισαγωγή: Ανοσοθεραπεία του καρκίνου
   2.1. Τα βήματα που οδήγησαν στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου…..……34

2.2. Καρκινικά αντιγόνα αναγνωριζόμενα από τα Τ λεμφοκύτταρα…….36
2.2.1. Μέθοδοι ταυτοποίησης καρκινικών αντιγόνων……...37
2.2.2. Κατηγορίες καρκινικών αντιγόνων……..39
2.3. Ιδιότητες που καθιστούν ένα καρκινικό αντιγόνο υποψήφιο για χρήση σε εμβόλια κατά του καρκίνου……41
2.4. Σύνδεση των καρκινικών αντιγόνων στα μόρια MHC……...41
2.5. Ανοσοενισχυτικά……42
2.6. Σύγχρονες μέθοδοι ανοσοθεραπείας του καρκίνου που βασίζονται στη χρήση καρκινικών αντιγόνων…..……...…43
2.6.1. Ενεργητική ανοσοθεραπεία……...……...44
2.6.2. Παθητική ανοσοθεραπεία……47
2.7. Χρήση αντισωμάτων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου……..48
2.8. Παρακολούθηση των ασθενών μετά την ανοσοθεραπεία……...49
2.9. Μηχανισμοί διαφυγής των όγκων από την ανοσολογική επιτήρηση……..50
2.10.Ο ρόλος των Th και των CTL στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου……...53
2.11.Πιθανές βελτιώσεις των εμβολίων κατά του καρκίνου…….54
2.12.Εμβόλια προφύλαξης κατά του καρκίνου……..56
3. Ειδική εισαγωγή: Η ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu
3.1. Δομή των υποδοχέων της οικογένειας HER……...59
3.2. Μεταγωγή σήματος (signaling) από τους υποδοχείς HER…….60
3.3. Υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu σε μορφές καρκίνου…….62
3.4. Χρήση της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu ως καρκινικό δείκτη……63
3.5. Προϋπάρχουσα ανοσία ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu σε ασθενείς με καρκίνο……...64
3.5.1. Χυμική ανοσία……..64
3.5.2. Κυτταρική ανοσία……64
3.6. Ανοσογονικά πεπτίδια προερχόμενα από την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu…..65
3.7. Ανοσοθεραπεία του καρκίνου βασιζόμενη στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu.67
3.7.1. Αντισώματα ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu…….68
3.7.2. Εμβόλια βασισμένα σε πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu……68
3.7.3. Έγχυση κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων γενετικά τροποποιημένων ώστε να εκφράζουν χιμαιρικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη HER-2/neu……...69

ΣΚΟΠΟΣ

4. Σκοπός ……...……..71

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5. Υλικά

5.1. Καλλιεργητικά υλικά και αντιδραστήρια……73

5.2. Εργαστηριακά όργανα……74

6. Μέθοδοι

6.1. Κατάψυξη κυττάρων……...……76

6.2. Απόψυξη κυττάρων……..…76

6.3. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα……...……76

6.4. Απομόνωση καρκινικών κυττάρων ασθενών από ασκιτικό ή πλευριτικό υγρό……77

6.5. Απομόνωση καρκινικών κυττάρων ασθενών από τμήμα όγκου…….77

6.6. Μέτρηση βιωσιμότητας……..…78

6.7. Δημιουργία υποστηρικτικού πληθυσμού κυττάρων…….……..78

6.8. Απομόνωση κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια……..….78

6.9. Δημιουργία δενδριτικών κυττάρων……..…..79

6.10. Μη ειδική για αντιγόνο διέγερση λεμφοκυττάρων…….….80

6.11. Κυτταρικές σειρές……81

6.12. Μετασχηματισμός Β λεμφοκυττάρων με ιό Epstein-Barr……..…82

6.13. Μελέτη κυτταροτοξικότητας…….…..82

6.14. Μελέτη πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων……..…..83

6.15. Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISPOT……..84

6.15.1. Τεχνική ELISPOT που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας……..……84

6.15.2. Τεχνική ELISPOT της εταιρίας Biosource…….…….85

6.16. Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA……..86

6.16.1. Μέθοδος ELISA που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας…….86

6.16.2. Μέθοδος ELISA της εταιρίας Diaclone…….…..87

6.16.3. Μέθοδος ELISA της εταιρίας R&D Systems……...…88

6.17. Κυτταρομετρία ροής……88

6.18. Απομόνωση RNA……....90

6.19. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων……90

6.20. Έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA……...…91

6.21. Αντίστροφη μεταγραφή-Σύνθεση συμπληρωματικού DNA……..…..91
6.22. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο της β-ακτίνης……..…91
6.23. Τυποποίηση αντιγόνων του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας….92
6.24. Ταυτοποίηση επιτόπων Τ κυττάρων από καρκινικά αντιγόνα με τη χρήση αλγόριθμων υπολογιστών……...……94
6.25. Εύρεση σημείων κατάτμησης πρωτεϊνών από τα πρωτεασώματα……..95
6.26. Αναζήτηση ομολογίας πεπτιδίων με την αλληλουχία γνωστών πρωτεϊνών96
6.27. Στατιστική ανάλυση……...…..97
6.28. Μετάφραση βιολογικών όρων……...…..97

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7. Ανάπτυξη καλά καθορισμένου συστήματος παραγωγής Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων με μακρά βιωσιμότητα και λειτουργικότητα
   7.1. Επαγωγή $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών σειρών ειδικών για ανοσογονικά πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu……99
   7.2. Αύξηση της αναλογίας των ειδικών για τα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια $CD4^+$ Τ κυττάρων στην καλλιέργεια μέσω επαναλαμβανόμενων ενεργοποιήσεων……104
   7.3. Επιλογή $CD4^+$ κυτταρικών σειρών ……..…….107
   7.4. Παραγωγή κλώνων ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (884-899)..……..……110
   7.5. Επιλογή $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων ……...112
   7.6. Φαινοτυπική μελέτη των $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων …….113
   7.7. Λειτουργική μελέτη των $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων …….118
   7.8. Λειτουργική μακροβιότητα των $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων……..122
8. Ταυτοποίηση συνθετικών πεπτιδίων με επιτόπους αναγνωριζόμενους από $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα
   8.1. Επιλογή νέων επιτόπων με βάση τη δυνατότητα σύνδεσης τους με αλλήλια MHC τάξης ΙΙ ……...……124
   8.2. Διερεύνηση των επιτόπων MHC τάξης ΙΙ με βάση τη δυνατότητα σύνδεσης των πεπτιδίων που προκύπτουν από αυτά με μόρια MHC τάξης Ι ……127
   8.3. Αναζήτηση των σημείων κατάτμησης της πρωτεΐνης HER-2/neu από τα πρωτεασώματα……..137
   8.4. Πεπτίδια με δυνατότητα ισχυρής σύνδεσης με τα αλλήλια HLA-DR4, HLA-DR11, HLA-A2 και HLA-A26 ……..……..141

8.5. Έλεγχος ομολογίας των πεπτιδίων HER-2 15_{80} και HER-2 15_{166} με τμήματα πρωτεϊνών παθογόνων παραγόντων……..141
9. Αναγνώριση των πεπτιδίων HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu από $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα
9.1. Δημιουργία Τ κυτταρικών σειρών ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) ……...……..144
9.2. Δημιουργία $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυτταρικών σειρών ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) και τους επιτόπους HER-2 (85-93) και HER-2 (171-179) που εμπεριέχονται σε αυτά ……..…….147
9.3. Δημιουργία κλώνων Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) και τους επιτόπους HER-2 (85-93) και HER-2 (171-179) που εμπεριέχονται σε αυτά …….……150
9.4. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων ……153
9.5. Λειτουργική ανάλυση των Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων ……....161
10. Έλεγχος της συνεργασίας $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων για την ενίσχυση της λειτουργικότητας των τελευταίων
10.1. Επαγωγή βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για το επιθυμητό πεπτίδιο…….163
10.2. Ευαισθητοποίηση κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων παρουσία και απουσία των βοηθητικών $CD4^+$ κυττάρων ……165
10.3. Ρυθμιστική δράση των $CD4^+$ κυττάρων κατά τον μη ειδικό πολλαπλασιασμό των ειδικών για τα πεπτίδια κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων…….…170
11. Υπολογισμός της συχνότητας $CD8^+$ Τ κυττάρων ειδικών για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu σε ασθενείς με επιθηλιακούς όγκους
11.1. Συλλογή και ταξινόμηση δειγμάτων από ασθενείς με επιθηλιακούς όγκους θετικούς και αρνητικούς για την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu……...….173
11.2. Υπολογισμός της συχνότητας CTL ειδικών για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu σε ασθενείς με επιθηλιακούς τύπους καρκίνου και υγιείς δότες……..177
11.3. Συσχέτιση των αυξημένων συχνοτήτων CTL ειδικών για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu με την ικανότητα κυτταροτοξικής δράσης ενάντια στον αυτόλογο όγκο ……185

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

12. Συζήτηση……189

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

13. Συντομογραφίες……205

14. Βιβλιογραφία……207

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu υπερεκφράζεται σε ποικίλους τύπους καρκίνου, αποτελώντας ιδανικό καρκινικό αντιγόνο για ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά πεπτίδια της πρωτεΐνης αυτής τα οποία δύνανται να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης I και II. Δεδομένου ότι οι απαντήσεις των Th κυττάρων ενάντια στα αντιγόνα των καρκινικών κυττάρων δεν έχουν μελετηθεί τόσο εκτεταμένα όσο οι απαντήσεις των CTL, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αναπτύξαμε ένα καλά καθορισμένο σύστημα που επιτρέπει την επαναλήψιμη παραγωγή κλώνων βοηθητικών Th1 λεμφοκυττάρων, ειδικών για την πρωτεΐνη HER-2/neu, το οποίο δύναται να εφαρμοσθεί με επιτυχία και για τη δημιουργία Th1 κλώνων με ειδικότητα ως προς άλλα καρκινικά αντιγόνα. Οι κλώνοι που παρήχθησαν μπορούσαν να αναπτυχθούν σε πολύ μεγάλους αριθμούς, ενώ παρέμειναν λειτουργικοί μετά από μακροχρόνια in vitro καλλιέργεια. Η παραγωγή μεγάλου αριθμού λειτουργικών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη χρήση τους σε πρωτόκολλα παθητικής μεταφοράς κυττάρων (adoptive immunotherapy).

Αρχικά έγινε in vitro ευαισθητοποίηση $CD4^+$ κυτταρικών σειρών ως προς το πεπτίδιο HER-2 (884-899), με περαιτέρω κλωνοποίηση των $CD4^+$ T κυττάρων. Οι $CD4^+$ T κλώνοι με ειδικότητα για το HER-2 (884-899) μπορούσαν να αναγνωρίσουν HER-2/neu^+ HLA-$DR4^+$ καρκινικές σειρές, καθώς και καρκινικά κύτταρα από μεταστατικούς όγκους του μαστού, των ωοθηκών, του παχέως εντέρου και του πνεύμονα, αποδεικνύοντας ότι το HER-2 (884-899) εκφράζεται στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων. Αυτό το εύρημα είναι το πλέον σημαντικό, διότι επιτρέπει τη χρησιμοποίηση του πεπτιδίου HER-2 (884-899) σε πρωτόκολλα εμβολιασμού.

Με στόχο το σχεδιασμό πεπτιδικών εμβολίων που μπορούν να επάγουν την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των Th και CTL, ώστε να καθίσταται δυνατή η ανάπτυξη αποτελεσματικής ανοσολογικής αντίδρασης ενάντια στο καρκινικό φορτίο, ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αντίστροφης ανοσολογίας δύο νέα πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu. Τα πεπτίδια αυτά συνδέονται με μόρια MHC τάξης II, αλλά εμπεριέχουν και επιτόπους που μπορούν να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης I και είναι τα HER-2 (80-96) και HER-2 (166-180), που εμπεριέχουν τους επιτόπους τάξης I HER-2 (85-93) και HER-2 (171-179) αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο παραγωγής κλώνων που αναπτύξαμε, απομονώσαμε από το περιφερικό αίμα υγιών ατόμων κλώνους $CD4^+$ Th1 κατεύθυνσης και κυτταροτοξικών $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων με πλήρη λειτουργική δράση.

Χρησιμοποιώντας τα πεπτίδια HER-2 (80-96) και HER-2 (166-180) δείξαμε ότι η συμμετοχή των Th κυττάρων είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση, αλλά και για τη διατήρηση της λειτουργικής δράσης των CTL. Η ενισχυτική δράση των Th αφορά τόσο στον αριθμό και τη βιωσιμότητα των παραγόμενων CTL, όσο και την ικανότητά τους να προκαλούν κυτταρική λύση.

Τέλος, χρησιμοποιώντας την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISPOT, προσδιορίσαμε τη συχνότητα CTL ειδικών για τα πεπτίδια HER-2(9_{369}), HER-2(9_{435}), HER-2(9_{665}), HER-2(9_{689}), HER-2(9_{777}) και HER-2(9_{952}) στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών, του παχέως εντέρου και του προστάτη, καθώς και σε αντίστοιχα υγιή άτομα. Για το πεπτίδιο HER-2(9_{369}), που αποτελεί και τον πιο εκτεταμένα μελετημένο επίτοπο της HER-2/neu, βρήκαμε αυξημένες συχνότητες στους HLA-$A2^+$ (25%) και τους HLA-$A26^+$ (30%) ασθενείς, αλλά οι συχνότητες αυτές ήταν σημαντικά μεγαλύτερες (60%) στους HLA-$A3^+$ ασθενείς. Η αναγνώριση του πεπτιδίου από ασθενείς HLA-$A3^+$ και HLA-$A26^+$ διευρύνει τον πληθυσμό των ασθενών που μπορούν να λάβουν μέρος σε εμβολιασμούς με το πεπτίδιο αυτό, από τους HLA-$A2^+$ που μετείχαν μέχρι σήμερα.

Όσον αφορά στα υπόλοιπα πεπτίδια που εξετάσθηκαν, από τους HLA-$A2^+$ ασθενείς, το 31% παρουσίαζε αυξημένες συχνότητες CTL για το πεπτίδιο HER-2(9_{952}), το 19% για το HER-2(9_{665}), το 16% για το HER-2(9_{689}) και το 12.5% για το HER-2(9_{435}), ενώ μόνο το 6% απάντησε στο HER-2(9_{777}). Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας από τους HER-2/neu^- ασθενείς ή τους υγιείς δότες δεν παρουσίασε αυξημένη συχνότητα για κάποιο από τα πεπτίδια. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα των ασθενών με αυξημένες συχνότητες ήταν ικανά να καταστρέφουν αυτόλογα καρκινικά κύτταρα. Ο προσδιορισμός αυξημένων συχνοτήτων για τα πεπτίδια σε ασθενείς, βοηθάει στην καλύτερη επιλογή των ασθενών για τα τις κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας, αφού αυτοί έχουν αυξημένες πιθανότητες να ανταποκριθούν στον εμβολιασμό και έτσι να δώσουν βελτιωμένες κλινικές απαντήσεις.

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας διευρύνουν το πλαίσιο σχεδιασμού εμβολίων κατά του καρκίνου (i) χαρακτηρίζοντας νέα πεπτίδια ικανά να επάγουν πλήρεις και αποτελεσματικές ανοσολογικές αποκρίσεις σε ποικίλους τύπους καρκίνου (πεπτιδικά εμβόλια), (ii) εγκαθιδρύοντας μία μέθοδο παραγωγής μεγάλου αριθμού λειτουργικών κυττάρων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παθητική ανοσοθεραπεία και (iii) παρέχοντας ένα σύστημα επιλογής των κατάλληλων ασθενών και πεπτιδίων για συμμετοχή σε αυτά τα ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα.

ABSTRACT

HER-2/neu oncoprotein is overexpressed on several types of cancer, comprising an ideal tumor-associated antigen for immunotherapy protocols. Several HER-2/neu peptides recognized in the context of MHC class I and class II molecules have been identified. However, Th cell responses against tumor antigens are still ambiguous and therefore, the aim of this study is to establish a reliable and successful protocol for the efficient generation of helper Th1 clones, with specificity for HER-2/neu oncoprotein, with wide applications to other tumor antigens as well. Herein, we present the successful generation of $CD4^+$ T cell clones and their expansion in vitro in great numbers, whilst maintaining their function after long time in culture. The production of great numbers of functional cells is prerequisite for their use in adoptive immunotherapy.

Using repetitive in vitro stimulations of $CD4^+$ T cells with HER-2 (884-899) peptide, we generated Th cell lines, from which we isolated $CD4^+$ T cell clones. The specific for HER-2 (884-899) $CD4^+$ T cell clones could specifically recognize HER-2/neu^+ HLA-$DR4^+$ cancer cell lines, as well as tumor cells from breast, colorectal and pancreatic carcinomas, indicating that HER-2 (884-899) is naturally expressed on the surface of these cells. This finding suggests the potential usage of HER-2 (884-899) for the successful designing of peptide vaccines targeting breast, colorectal and pancreatic cancer.

In an attempt to design peptide cancer vaccines that could stimulate both Th and CTL responses, capable therefore of eliciting effective immune responses against tumor burden, we have identified two novel peptides derived from HER-2/neu oncoprotein, using reverse immunology. These peptides, namely HER-2 (80-96) and HER-2 (166-180) can be recognized in the context of MHC class II, while they encompass MHC class I epitopes, named HER-2 (85-93) and HER-2 (171-179) respectively. Applying the protocol of clone generation we established, we isolated from healthy donors' peripheral blood, $CD4^+$ Th1 cell clones, as well as functional $CD8^+$ T cell clones.

Using the peptides HER-2 (80-96) and HER-2 (166-180), we showed that Th cell help is indeed essential for CTL priming and maintenance of their effector function. The helper role of Th concerns the number and the viability of the generated CTL, as well as their cytotoxic potential.

Finally, using the ELISPOT-assay we determined the frequencies of pre-existing CTL specific for HER-2 (9_{369}), HER-2 (9_{435}), HER-2 (9_{665}), HER-2 (9_{689}), HER-2 (9_{777}) and HER-2

(9_{952}) peptides in the peripheral blood of patients with breast, ovarian, lung, colorectal and prostate cancers, as well as in healthy individuals. For HER-2 (9_{369}), which is the most extensively studied epitope of HER-2/neu oncoprotein, we found increased percentages of CTL in HLA-$A2^+$ (25%) and HLA-$A26^+$ (30%) patients, which were significantly higher (60%) in HLA-$A3^+$ patients. The recognition of this peptide in the context of HLA-A3 and HLA-A26 alleles, besides HLA-A2, increases the applicability of HER-2 (9_{369})-based vaccinations in a considerably broader patients' population.

Regarding the rest of the peptides we studied, from the HLA-$A2^+$ patients examined, 31% had increased CTL frequencies to HER-2 (9_{952}), 19% to HER-2 (9_{665}), 16% to HER-2 (9_{689}) and 12.5% HER-2 (9_{435}), whereas only the 6% responded to HER-2 (9_{777}). None of the HER-2/neu^- patients or healthy donors exhibited increased CTL frequencies to any of these peptides. Besides IFN-γ production, assessed with ELISPOT-assay, pre-existing CTL immunity to all six HER-2/neu peptides was also confirmed in cytotoxicity assays where patients' PBMC with increased CTL frequencies specifically lysed autologous tumor targets and autologous peptide-pulsed DC. The estimation of increased frequencies of CTL specific for HER-2/neu-derived peptides in the peripheral blood of patients with HER-2/neu^+ tumors, could be proven useful for a better evaluation of patients to be included in HER-2/neu-based immunotherapeutical protocols, due to the increases possibility that these patients could react to the vaccination and give better clinical responses.

The findings of the present study contribute successfully to the design of cancer vaccines (i) identifying novel peptides capable of stimulating complete immune reactions against several types of cancer (peptide vaccines), (ii) establishing a novel protocol for the generation of great numbers of functional cells, which can be crucial for adoptive immunotherapeutical treatments and lastly, (iii) establishing a system for the evaluation of the appropriate patients and peptides that could be included in those immunotherapeutical protocols.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. Sotiriadou R, Perez SA, Gritzapis AD, Sotiropoulou PA, Echner H, Heinzel S, Mamalaki A, Pawelec G, Voelter W, Baxevanis CN and Papamichail M: Peptide HER-2 (776-788) represents a naturally processed broad MHC class II-restricted T cell epitope. Brit J Cancer 2001; 85: 1527-1534

2. Perez SA, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NM, Mamalaki A, Gritzapis AD, Echner H, Voelter W, Pawelec G, Papamichail M and Baxevanis CN: HER-2/neu-derived peptide 884-899 is expressed by human breast, colorectal and pancreatic adenocarcinomas and is recognized by in-vitro-induced specific $CD4^+$ T cell clones. Cancer Immunol Immunother 2002; 50: 615-624

3. Sotiropoulou PA, Perez SA, Iliopoulou EG, Missitzis I, Voelter W, Echner H, Baxevanis CN and Papamichail M: Cytotoxic T cell precursor frequencies to HER-2 (369-377) in patients with HER-2/neu positive epithelial tumors. Brit J Cancer 2003; 89: 1055-1061

4. Sotiropoulou PA, Perez SA, Voelter W, Echner H, Missitzis I, Tsavaris NB, Papamichail M and Baxevanis CN: Natural $CD8^+$ T cell responses against MHC class I epitopes of the HER-2/neu oncoprotein in patients with epithelial tumors. Cancer Immunol Immunother 2003; 52: 771-779

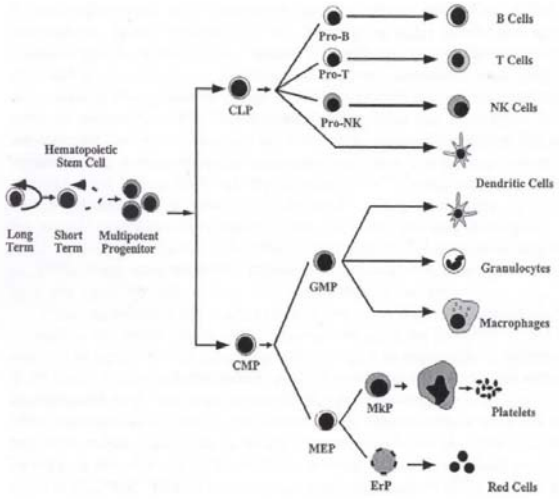
5. Baxevanis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN and Papamichail M: Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 2004; 53: 166-175

1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η άμυνα του οργανισμού ενάντια σε βακτήρια, ιούς, τοξίνες και αλλογενή ή καρκινικά κύτταρα που πραγματοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα, ονομάζεται *ανοσία*. Η απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην εισβολή των ξένων παραγόντων έχει δύο βασικούς άξονες, τη *φυσική* και την *επίκτητη* ανοσία. Η φυσική ανοσία, η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, εστιάζεται στην αντίσταση στην είσοδο των παθογόνων στον εσωτερικό του οργανισμού και στη μη ειδική καταστροφή αυτών από χημικές ουσίες (όπως λυσοζύμη και πεπτικά ένζυμα) ή συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (φυσικά φονικά κύτταρα, ουδετερόφιλα λευκά αιμοσφαίρια). Στην επίκτητη ανοσία, αντιγονικοί επίτοποι (πρωτεΐνες ή μεγάλα πολυσακχαριδικά ή λιποπρωτεϊνικά συμπλέγματα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 8 kDa) των παθογόνων παραγόντων αναγνωρίζονται ειδικά από συγκεκριμένα είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία ενεργοποιούνται και τα καταστρέφουν. Υπάρχουν δύο είδη επίκτητης ανοσίας, η *χυμική* που επιτελείται με την παραγωγή αντισωμάτων και η *κυτταρική*, στην οποία παράγονται κυτταροτοξικά κύτταρα ειδικά προς το εισβάλλον παθογόνο.

1.1 Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσολογικό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από ένα σύνολο οργάνων και κυττάρων με ρόλο την ακριβή και ειδική αναγνώριση μη εαυτών (non-self) αντιγόνων και την καταστροφή των κυττάρων που τα φέρουν. Τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος προέρχονται από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία, κάτω από την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος υφίστανται διαφοροποίηση προς τη λεμφοειδή κατεύθυνση, παράγοντας *Τ και Β λεμφοκύτταρα* και *φυσικά φονικά κύτταρα* ή προς τη μυελογενή κατεύθυνση, παράγοντας *μονοκύτταρα*, ουδετερόφιλα, ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Στο κλασικό αυτό μοντέλο πρόσφατα δεδομένα από αρκετές ερευνητικές ομάδες προτείνουν εναλλακτικές οδούς διαφοροποίησης.



Εικόνα 1.1 Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο προέλευσης από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα [Reya et al, 2003].

Τα λεμφοκύτταρα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος από τα κεντρικά λεμφοειδή όργανα, το μυελό των οστών και το θύμο αδένα, με ρυθμό 10^9/μέρα και αποτελούν το 20% των ολικών λευκών αιμοσφαιρίων. Διακρίνονται σε Β λεμφοκύτταρα, τα οποία ωριμάζουν στο μυελό των οστών και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων, Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία ωριμάζουν στον θύμο αδένα και ρόλος τους είναι ο συντονισμός της ανοσολογικής απάντησης και η καταστροφή των κυττάρων-στόχων και τέλος φυσικά φονικά κύτταρα, τα οποία καταστρέφουν μη ειδικά τα μολυσμένα και τα καρκινικά κύτταρα και παράγουν ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Εκτός από τα λεμφοκύτταρα, στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος ανήκουν τα φαγοκύτταρα (μονοπύρηνα ή πολυμορφοπύρηνα), με ρόλο αφενός την καταστροφή των παθογόνων παραγόντων και αφετέρου την ενεργοποίηση των υπόλοιπων κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος είτε με την παραγωγή κυτταροκινών είτε με απ' ευθείας κυτταρική επαφή.

1.2. Τα κύρια κύτταρα που συμμετέχουν στον κυτταρικό κλάδο της επίκτητης ανοσίας: Τ λεμφοκύτταρα και κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων

Ο όρος Τ λεμφοκύτταρα προέρχεται από το όργανο στο οποίο ωριμάζουν τα συγκεκριμένα κύτταρα, το θύμο αδένα (thymus). Τα Τ λεμφοκύτταρα διακρίνονται στους ακόλουθους τύπους:

Βοηθητικά ή ανοσορυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (T-helper, Th ή $CD4^+$) με κύριες λειτουργίες την ενεργοποίηση ή καταστολή άλλων κυτταρικών πληθυσμών. Μεταξύ των λειτουργιών αυτών είναι η ενεργοποίηση μακροφάγων (εξέλιξη σε δενδριτικά, θανάτωση ορισμένων κυττάρων όγκων), η έκλυση ειδικών αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα, η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και η καταστολή της ανοσοαπόκρισης μετά την ολοκλήρωση καταστροφής του παθογόνου, ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα *κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα* (cytotoxic T lymphocytes, CTL ή $CD8^+$), τα οποία αναγνωρίζουν αντιγονικούς επιτόπους σε κύτταρα στόχους και, με ποικίλους μηχανισμούς, προκαλούν κυτταρικό θάνατο κυρίως μέσω απόπτωσης, αλλά και μέσω άλλων οδών που θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Τα *αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα* (antigen presenting cells, APC) αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων με ανοσοδιεγερτική ικανότητα, τα οποία διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην επαγωγή των λειτουργικών δραστηριοτήτων των Τ λεμφοκυττάρων. Δεδομένου ότι τα Τ λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να αναγνωρίσουν το ειδικό για αυτά αντιγόνο σε ελεύθερη μορφή, αλλά μόνο σε μορφή συμπλόκου με το κατάλληλο για αυτά μόριο του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (βλέπε συνέχεια), ο ρόλος των APC είναι η πρόσληψη, επεξεργασία και στη συνέχεια κατάλληλη παρουσίαση του αντιγόνου στην επιφάνεια τους, ώστε να ευαισθητοποιήσουν τα ειδικά για αυτό Τ λεμφοκύτταρα. Ως APC μπορούν να δράσουν διάφοροι τύποι κυττάρων, με κύρια τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DC), που προέρχονται από τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Άλλοι τύποι APC είναι τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα κύτταρα Kupffer, τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα Langerhans, τα αστροκύτταρα και οι ινοβλάστες. Τα DC συνιστούν έναν ετερογενή πληθυσμό, που μπορεί να διακριθεί με βάση την προέλευση σε δύο ομάδες, τα μυελοειδή (myeloid) και τα λεμφοειδή (lymphoid) DC, τα οποία επάγουν διαφορετική κατεύθυνση στην ανοσολογική αντίδραση. Τα πρώτα δεν παρουσιάζουν το μόριο CD8α στην επιφάνειά τους και επάγουν απόκριση που καταλήγει σε παραγωγή αντισωμάτων, ενώ τα δεύτερα εμφανίζουν επιφανειακή έκφραση CD8α και επάγουν ανοσολογική απόκριση που βασίζεται στη δράση των CTL.

1.2.1. Επιφανειακά μόρια (δείκτες) Τ λεμφοκυττάρων

Τα μόρια της εξωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης των λεμφοκυττάρων έχουν πολλαπλές χρήσεις, όπως την αναγνώριση του αντιγόνου και ορισμένων μορίων-συνδετών στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου. Το είδος των μορίων αυτών, καθώς και η πυκνότητά τους στην κυτταρική μεμβράνη ποικίλει ανάλογα με το αναπτυξιακό τους στάδιο και το στάδιο ενεργοποίησης.

Το πιο σημαντικό μόριο της επιφάνειας των Τ λεμφοκυττάρων είναι οι υπερμεταβλητοί υποδοχείς μέσω των οποίων αναγνωρίζουν τα αντιγόνα, οι «υποδοχείς Τ κυττάρων» (T-cell receptors, TCR). Οι TCR αναγνωρίζουν τα ξένα προς τον οργανισμό αντιγόνα με εξαιρετική εξειδίκευση, διεργασία όμως που δεν μπορούν να επιτελέσουν όταν τα αντιγόνα είναι ελεύθερα, αλλά μόνο όταν αυτά είναι συνδεδεμένα με αντίστοιχα μόρια του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας (MHC, βλέπε στη συνέχεια). Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον TCR και το σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC είναι το κύριο στοιχείο αναγνώρισης σε μία ποικιλία κυτταρικών επαφών, οι οποίες καταλήγουν στην ανάπτυξη του ρεπερτορίου (repertoire) των Τ κυττάρων (θετική και αρνητική επιλογή στο θύμο αδένα και επιβίωση στην περιφέρεια) και στην ανάπτυξη της ανοσολογικής απάντησης (ενεργοποίηση Th και CTL).

Ο TCR αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, τις α και β ή γ και δ, κάθε μια από τις οποίες περιέχει μια σταθερή (C) και μία μεταβλητή (V) περιοχή. Η μεταβλητή περιοχή κωδικοποιείται από ανασυνδυαζόμενα τμήματα γονιδίων. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται οι περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (complementary determining regions, CDR), οι οποίες βρίσκονται στο ένα άκρο του TCR και αναγνωρίζουν το ειδικό για τον συγκεκριμένο TCR σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC. Από τις θηλιές που σχηματίζουν οι CDR, η CDR2 αλληλεπιδρά μόνο με το μόριο MHC, ενώ οι CDR1 και CDR3 αλληλεπιδρούν τόσο με το μόριο MHC όσο και με το πεπτίδιο.

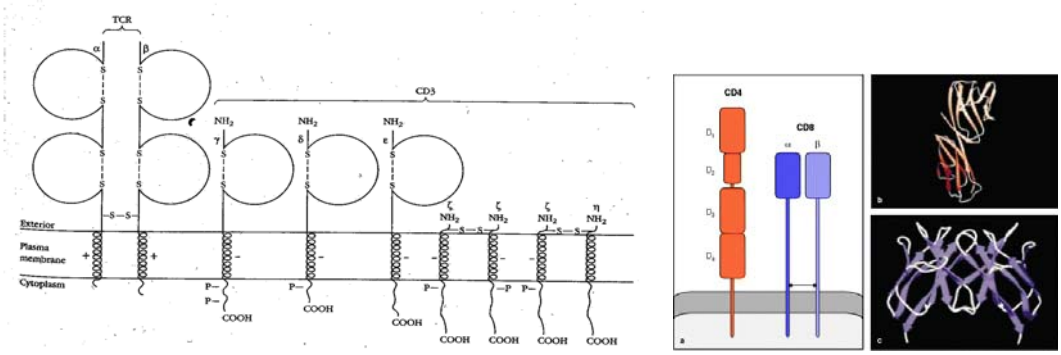
Παρότι η αναγνώριση του συμπλόκου αντιγόνο/μόριο MHC γίνεται αποκλειστικά μέσω του TCR, πολλά άλλα μόρια διαδραματίζουν σημαντικό συμπληρωματικό ρόλο στην ενεργοποίηση του Τ κυττάρου. Πολλά από αυτά δρουν ως μόρια προσκόλλησης, ώστε να σταθεροποιηθεί η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο Τ κύτταρο και το APC ή το κύτταρο-στόχο ή μεταδίδουν σήματα από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια στο πυρήνα του κυττάρου. Από τα μόρια αυτά, τα

πιο σημαντικά είναι τα CD3, CD4 και CD8, τα οποία ανήκουν επίσης στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών.

Το CD3 αποτελείται από 5 πολυπεπτίδια, τα *γ, δ, ε* και ένα ομοδιμερές από δύο *ζ* αλυσίδες (90%) ή ένα ετεροδιμερές *ζη* (10%). Οι διαμεμβρανικές περιοχές των αλυσίδων *γ, δ, ε* και *ζ* περιέχουν αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα διαμεμβρανικά τμήματα του TCR. Δεδομένου ότι το μόριο CD3 βρίσκεται σε απόσταση μόλις 12 Å από τον TCR είναι εφικτή αυτή τη αλληλεπίδραση. Η έκφρασή του CD3 προαπαιτείται για την έκφραση των *αβ*TCR και *γδ*TCR. Το αποτέλεσμα είναι ο TCR να απαντά στην κυτταρική μεμβράνη ως μοριακό σύμπλοκο με το CD3, του οποίου ο ρόλος είναι η μετάδοση σήματος ενεργοποίησης στο εσωτερικό του κυττάρου μετά την αναγνώριση του αντιγόνου από τον TCR.

Όπως προαναφέρθηκε, τα Τ κύτταρα διακρίνονται στα Th και τα CTL, τα οποία χαρακτηρίζονται από την επιφανειακή παρουσία των μορίων CD4 και CD8 αντίστοιχα. Το CD4 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 55kDa, που αποτελείται από τέσσερις εξωκυτταρικές περιοχές ανοσοσφαιρινικού τύπου, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και ένα μακρύ κυτταροπλασματικό άκρο που φέρει τρία κατάλοιπα σερίνης με δυνατότητα φωσφορυλίωσης. Απαντά αποκλειστικά σε μονομερή μορφή. Το CD8 είναι μικρότερο σε μέγεθος (32-34 kDa) και αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή ανοσοσφαιρινικού τύπου, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και ένα κυτταροπλασματικό άκρο 25-27 καταλοίπων που επίσης δύναται να φωσφορυλιωθεί. Αντίθετα με το CD4, απαντά ως ομοδιμερές ή πολυμερές αποτελούμενο από μόρια CD8α ή ετεροδιμερές (CD8α/CD8β). Τα μόρια CD4 και CD8 βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη σχετιζόμενα με το σύμπλοκο CD3/TCR και δρουν κύρια ως μόρια σύνδεσης, αλληλεπιδρώντας με τα μόρια του MHC (τα CD4 με τα τάξης ΙΙ και τα CD8 με τα τάξης Ι), αυξάνοντας την ισχύ σύνδεσης TCR-συμπλόκου αντιγόνου/MHC τουλάχιστον 100 φορές. Επίσης διαδραματίζουν συμπληρωματικό ρόλο στη μετάδοση σήματος ενεργοποίησης, επάγοντας τη φωσφορυλίωση των *γ, δ, ε,* και *ζ* αλυσίδων του CD3 μέσω των $p56^{lck}$ και scr-σχετιζόμενης πρωτεϊνικής κινάσης.

Η δομή των επιφανειακών μορίων που προαναφέρθηκαν απεικονίζεται στην εικόνα 1.2.



Εικόνα 1.2 Δομή των επιφανειακών μορίων TCR, CD3, CD4 και CD8 των Τ λεμφοκυττάρων [Janeway et al, 2001].

Δεδομένης της ποικιλίας των επιφανειακών μορίων που παρουσιάζουν τα Τ λεμφοκύτταρα, στις εργασίες του συνεδρίου «First International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens» το 1982 αναπτύχθηκε σχετική ονοματολογία (nomenclature). Το αποτέλεσμα ήταν η ομαδοποίηση όλων των μονοκλωνικών αντισωμάτων που αντιδρούν με ορισμένο μεμβρανικό μόριο σε μία ομάδα διαφοροποίησης (cluster of differentiation, CD).

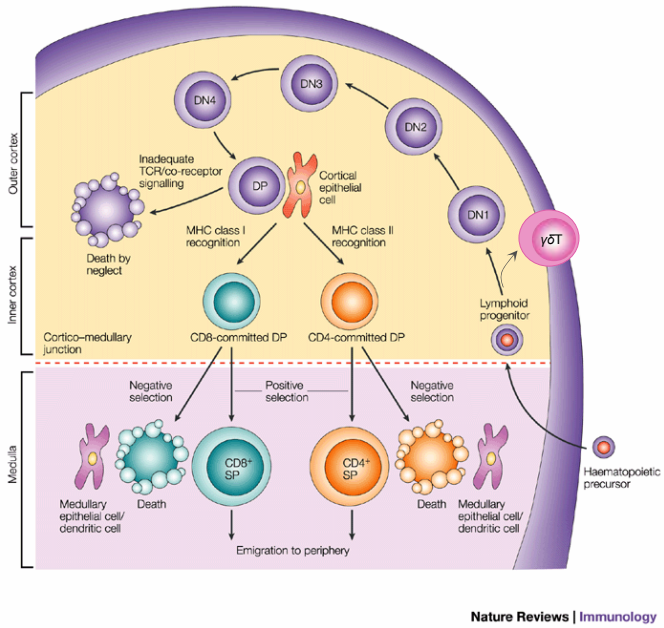
Τα σημαντικότερα CD που σχετίζονται με το αντικείμενο της εργασίας αυτής παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

CD	Κύτταρα όπου εκφράζεται	Λειτουργία
CD2	Τ κύτταρα Φυσικά φονικά κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης Υποδοχέας του LFA-3
CD3	Τ κύτταρα	Μεταγωγή σήματος από τον TCR
CD4	Βοηθητικά Τ κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης σε MHC τάξης II
CD8	Κυτταροτοξικά Τ κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης σε MHC τάξης I
CD11α (LFA-1)	Λεμφοκύτταρα, μυελοειδή κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης και συνδιέγερσης
CD25	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα	*β* αλυσίδα υποδοχέα IL-2
CD27	Ώριμα Τ και ορισμένα Β κύτταρα Φυσικά φονικά κύτταρα	Ενεργοποίηση και πολ/μός Τ και Β κυττάρων
CD28	Τ κύτταρα	Υποδοχέας συνδιεγερτικών μορίων
CD30	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα Μονοκύτταρα, ΝΚ	Ενεργοποίηση Τ κυττάρων
CD40	Β κύτταρα, DC, μακροφάγα	Ρόλος στη δημιουργία κυττάρων μνήμης
CD44	Ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια	Υποδοχέας κατεύθυνσης (homing)
CD45	Λευκά αιμοσφαίρια	Ρόλος στη μεταγωγή σήματος
CD45R RO	Κύτταρα μνήμης	Ρόλος στη μεταγωγή σήματος
RA	Αθώα Τ κύτταρα	
RB	Β κύτταρα	
CD49d (VLA-4)	Σχεδόν όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα	Μόριο προσκόλλησης
CD54 (ICAM-1)	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα Μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα	Συνδιεγερτικό μόριο
CD56	Φυσικά φονικά κύτταρα, NKT	Μόριο προσκόλλησης
CD68	Μονοκύτταρα, μακροφάγα	Φαγοκυττάρωση
CD70	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα	Συνδιεγερτικό μόριο Τ και Β κυττάρων
CD80	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα DC, ενεργοποιημένα μακροφάγα	Συνδιεγερτικό και ανοσορυθμιστικό μόριο
CD83	Ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα DC	Συνδιεγερτικό μόριο
CD86	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα DC, ενεργοποιημένα μακροφάγα	Συνδιεγερτικό και ανοσορυθμιστικό μόριο
CD94	Φυσικά φονικά κύτταρα Ορισμένα Τ και Β κύτταρα	Ανασταλτικός υποδοχέας
CD95 (Fas)	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα και άλλα κύτταρα	Επαγωγή σήματος απόπτωσης
CD134 (OX40)	Ενεργοποιημένα Τ κύτταρα	Προσκόλληση Τ κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα
CD137 (4-1BB)	Τ κύτταρα	Συνδιεγερτικό μόριο πολ/μού Τ κυττάρων
CD152 (CTLA-4)	Ενεργοποιημένα Τ και Β κύτταρα	Μείωση ενεργοποίησης Τ κυττάρων
CD154 (CD40L)	Ενεργοποιημένα $CD4^+$ Τ κύτταρα	Συνδέτης του CD40 Επαγωγή ενεργοποίησης και πολ/μού
CD158a	ΝΚ κύτταρα, μειονότητα Τ κυττάρων	Κατασταλτικός υποδοχέας
CD158b	ΝΚ κύτταρα, μειονότητα Τ κυττάρων	Κατασταλτικός υποδοχέας
CD178 (FasL)	Λεμφοκύτταρα	Συνδέτης του CD95 Επαγωγή σήματος απόπτωσης
CD197 (CCR7)	Περιφερικά Τ και Β κύτταρα, DC, $CD34^+$ κύτταρα	Υποδοχέας κατεύθυνσης (homing)

1.2.2. Παραγωγή ώριμων Τ λεμφοκυττάρων

Προγονικά των λεμφοκυττάρων κύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο θύμο αδένα. Τα πρώιμα Τ κύτταρα δεν εκφράζουν TCR, CD4 και CD8 και

χαρακτηρίζονται ως διπλά αρνητικά κύτταρα (double negative, DN) θυμοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, ανάλογα με το φαινότυπό τους διακρίνονται σε τέσσερις τύπους (DN1: $CD44^{+}CD25^{-}$, DN2: $CD44^{+}CD25^{+}$, DN3: $CD44^{-}CD25^{+}$ και DN4: $CD44^{-}CD25^{-}$). Όπως περνούν από το στάδιο DN2, μπορούν να ακολουθήσουν δύο κατευθύνσεις. Από τις τέσσερις γενετικές θέσεις του TCR (*α, β, γ,* και *δ*) να ανασυνδυάσουν τις *γδ* και να προκύψουν τα κύτταρα με *γδ*TCR ή να ανασυνδυάσουν μόνο τη *β* αλυσίδα, εκφράζοντας προ-TCR. Η ορθή έκφραση του προ-TCR οδηγεί σε σημαντικό πολλαπλασιασμό κατά το στάδιο DN4 και ακολουθεί η ταυτόχρονη έκφραση CD4 και CD8 (διπλά θετικά κύτταρα, double positive, DP), ενώ το TCR αποτελείται πλέον από τις ανασυνδυασμένες αλυσίδες *α* και *β*. Ο ανασυνδυασμός των γονιδιακών τόπων που κωδικοποιούν τις αλυσίδες *αβ* και *γδ*, σε συνδυασμό με την ποικιλία σύνδεσης των τμημάτων τους και τις νουκλεοτιδικές προσθήκες στα σημεία ένωσης, δημιουργούν έναν υπέρογκο αριθμό διαφορετικών TCR, που ξεπερνά τα 10^{13} (δημιουργία της ποικιλίας). Τα *αβ*$TCR^{+}CD4^{+}CD8^{+}$ θυμοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα επιθηλιακά κύτταρα, με συνέπεια την επιλογή των κατάλληλων για να επιβιώσουν σύμφωνα με την αρνητική και τη θετική επιλογή (βλέπε στη συνέχεια). Στην αρχή της οντογένεσης υπερισχύουν αριθμητικά τα *γδ*TCR, αλλά από τη γέννηση και μετά το 90% των Τ κυττάρων εκφράζουν *αβ*TCR. Η ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Εικόνα 1.3 Ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα [Kaech et al, 2002]

1.3. Αναγνώριση αντιγόνων από τα Τ λεμφοκύτταρα

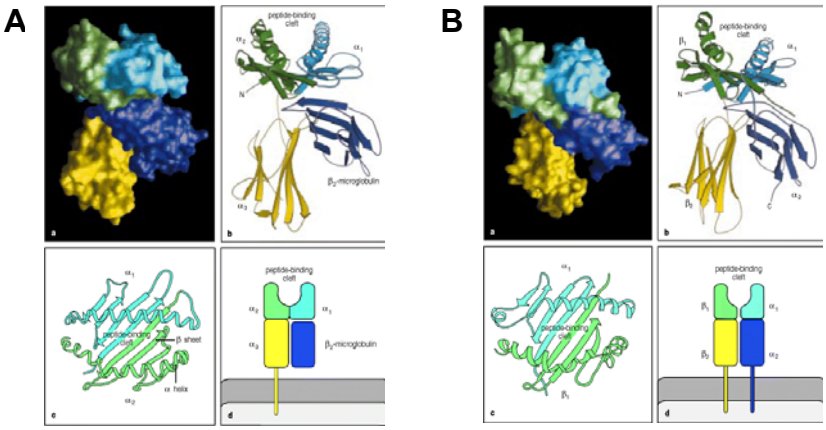
1.3.1. Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας

Το Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (MHC: Major Histocompatibility Complex, MHC) είναι ένα πολύμορφο ανοσογενετικό σύστημα, αποτελούμενο από γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες δρουν ως υποδοχείς πεπτιδίων. Εναλλακτική και εξίσου συχνά χρησιμοποιούμενη ονομασία για τα αντιγόνα αυτά είναι τα "Ανθρώπινα Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα" (Human Leukocyte Antigens, HLA). Τα γονίδια του MHC, τουλάχιστον 200 σε αριθμό, βρίσκονται στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6, όπου καταλαμβάνουν μήκος περίπου 4 μεγαβάσεις συνολικά. Το MHC χωρίζεται σε τρεις τάξεις, την τάξη Ι που περιλαμβάνει τα γονίδια HLA-A, -B, -C, -E, -H, -G και -F, την τάξη ΙΙ με τα γονίδια HLA-DR, -DP και -DQ και την τάξη ΙΙΙ, η οποία περιλαμβάνει γονίδια του συμπληρώματος και το γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF). Τα γονίδια αυτά ελέγχουν τις ανοσολογικές απαντήσεις ενάντια σε παθογόνα, στην αποδοχή ή απόρριψη μοσχεύματος και την επιτήρηση των όγκων.

Τα μόρια MHC τάξης Ι είναι διμερή, αποτελούμενα από μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και μια σφαιρίνη, τη β_2-μικροσφαιρίνη (εικόνα 1.4). Το μόριο παρουσιάζει τέσσερις περιοχές, οι πιο σημαντικές από τις οποίες είναι οι α_1 και α_2. Ανάμεσα στις περιοχές αυτές σχηματίζεται μια σχισμοειδής αύλακα. Πρόκειται για περιοχή με εκτεταμένο πολυμορφισμό, όπου συνδέεται το αντίστοιχο για το συγκεκριμένο μόριο πεπτίδιο.

Τα μόρια MHC τάξης ΙΙ είναι ετεροδιμερή και αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, τις α και β (εικόνα 1.4). Η αύλακα σύνδεσης των πεπτιδίων σχηματίζεται ανάμεσα στις περιοχές α_1 και β_1, περιοχές όπου εντοπίζεται και ο μεγαλύτερος πολυμορφισμός.

Ο εκτεταμένος πολυμορφισμός των μορίων του MHC, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παρουσία εκατοντάδων διαφορετικών αλληλίων, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι κάθε άτομο φέρει μικρό αριθμό, έχει ως αποτέλεσμα να είναι αδύνατο δύο άτομα να φέρουν απόλυτα όμοιο συνδυασμό γονιδίων του MHC, εκτός από την περίπτωση των ομοζυγωτικών διδύμων.



Εικόνα 1.4 Η δομή των μορίων του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας τάξης I (A) και II (B), όπως αποκαλύπτεται με κρυσταλλογραφία ακτίνων X {Janeway et al, 2001]

Η σύνδεση των μορίων MHC τάξης I με τα αντίστοιχα πεπτίδια σταθεροποιείται στα δύο άκρα του πεπτιδίου, με αποτέλεσμα στην αύλακα αυτών να προσδένονται πεπτίδια μήκους 8-10 αμινοξέων. Αντίθετα, η αύλακά των μορίων MHC τάξης II έχει ανοικτά άκρα και δύναται να συνδέσει πεπτίδια μήκους 12-25 αμινοξέων. Η ισχύς σύνδεσης των πεπτιδίων με τα μόρια MHC εξαρτάται από την αλληλεπίδραση υδρόφοβων αμινοξέων της αμινοξικής αλληλουχίας των δύο μερών. Οι υδρόφοβες αμινοξικές περιοχές των μορίων MHC είναι εξελικτικά συντηρημένες και ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης (anchor residues).

Τα μόρια του MHC τάξης I και II δρουν ως κατευθυντήρια συστήματα για την αναγνώριση των αντιγόνων από τα Τ λεμφοκύτταρα. Έχουν διαφορετική κατανομή στην επιφάνεια των διαφόρων ειδών APC, γεγονός που αντικατοπτρίζει τις διαφορετικές λειτουργίες των Τ λεμφοκυττάρων στων οποίων την ενεργοποίηση συνεισφέρουν. Τα μόρια τάξης I συνδέονται με ενδοκυττάρια κυρίως αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στα CTL, ενώ τα μόρια τάξης II συνδέονται κύρια με εξωγενή αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στα Th. Η διεργασία κατά την οποία τα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο σε συνδυασμό με το αντίστοιχο μόριο MHC ονομάζεται περιορισμός MHC. Ο περιορισμός MHC οφείλεται στο γεγονός ότι η αμινοξική αλληλουχία της αύλακας διαφέρει ανάμεσα στους απλοτύπους του MHC, με αποτέλεσμα η σύνδεση ενός πεπτιδίου με ένα συγκεκριμένο μόριο MHC να εξαρτάται από τη φύση των πλευρικών αλυσίδων του πεπτιδίου και τη συμπληρωματικότητά τους με την αύλακα σύνδεσης του μορίου MHC. Συνέπεια του εκτεταμένου πολυμορφισμού είναι η διαφορετική ανάπτυξη ανοσολογικών απαντήσεων των διαφορετικών ατόμων ενάντια στα ίδια αντιγόνα.

Χρησιμοποιώντας μεθόδους ανάλυσης των φυσικών συνδετών των μορίων MHC, δοκιμασίες δέσμευσης πεπτιδίων, καθώς και τεχνικές καθορισμού της τρισδιάστατης δομής μορίων με κρυσταλλογραφία, δημιουργήθηκαν βάσεις δεδομένων, όπου για κάθε απλότυπο MHC παρουσιάζονται οι θέσεις σύνδεσης (1-9 για τα μόρια τάξης I και 1-14 για τα μόρια τάξης II) και σημειώνονται σε αυτές τα αμινοξέα που δύνανται να τις καταλάβουν. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατό σε μία πρωτεΐνη να εντοπιστούν οι αλληλουχίες που δύνανται να ενεργοποιήσουν τα T λεμφοκύτταρα οργανισμού με συγκεκριμένο συνδυασμό αλληλίων για τα μόρια του MHC.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται ένα παράδειγμα προτύπου σύνδεσης πεπτιδίων σε δύο συχνά απαντούμενα αλλήλια MHC:

HLA-A*0201	Θέση									Προέλευση πεπτιδίου
	1	**2**	3	4	5	6	7	8	**9**	
Επικρατούντα κατάλοιπα		**L**				V			**V**	
Ισχυρά κατάλοιπα				E				K		
				K						
Άλλα κατάλοιπα	I		A	G	I	I	A	E		
	L		Y	P	K	L	Y	S		
	F		F	D	Y	T	H			
Παραδείγματα πεπτιδίων	W	**L**	S	L	L	V	P	F	**V**	sAg ηπατίτιδας B 335-343
με δυνατότητα πρόσδεσης	I	**L**	K	E	P	V	H	G	**V**	HIV-1 RT 476-484

HLA-DRB1*1101	Σχετική θέση														Προέλευση πεπτιδίου
	-3	-2	-1	**1**	2	3	**4**	5	**6**	7	8	9	+1	+2	
Επικρατούντα κατάλοιπα				W,Y			M,L		R,K						
				F			V,I								
Παραδείγματα πεπτιδίων	I	D	F	**Y**	T	S	**I**	T	**R**	A	R	F	E	E	HSC70 291-305
με δυνατότητα πρόσδεσης	P	A	G	**Y**	T	C	N	V	**K**	A	R	S	C	E	Granulin D 42-55

1.3.2. Επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων

Οι αντιδράσεις της κυτταρικής ανοσίας, όπως και οι αντισωματικές απαντήσεις, κατευθύνονται ενάντια σε διαφορετικούς καθοριστές (χαρακτηριστικές ομάδες) του αντιγόνου, οι οποίες ονομάζονται επίτοποι και προέρχονται από την

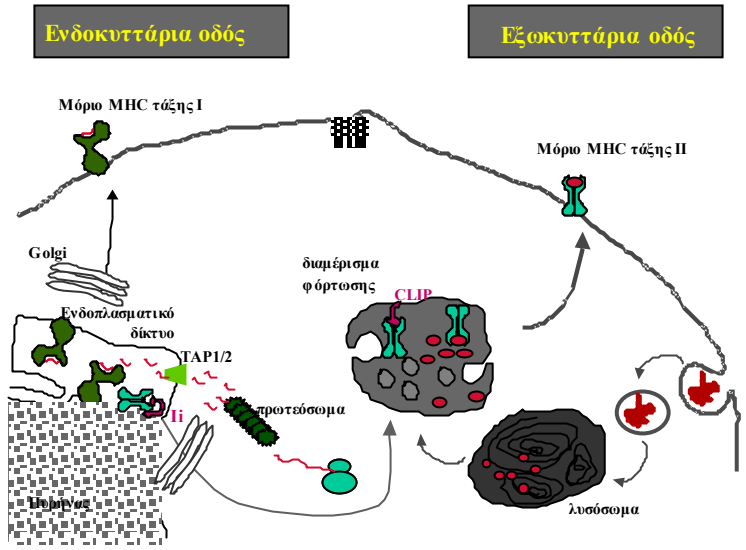
αρχική πρωτεΐνη με διάσπαση σε πεπτιδικά τμήματα. Τα πεπτιδικά τμήματα συνήθως δεν εντοπίζονται στερεοχημικά στην άθικτη πρωτεΐνη, παράγονται στα APC και παρουσιάζονται στην επιφάνειά τους σε συνδυασμό με το αντίστοιχο μόριο MHC. Ο τρόπος επεξεργασίας είναι διαφορετικός για τα μόρια MHC τάξης I και II.

Τα μόρια τάξης I του MHC παρουσιάζουν κυρίως πεπτίδια προερχόμενα από ενδογενή αντιγόνα, που συντίθενται μέσα στο κύτταρο και συνεπώς ακολουθείται η ενδοκυτταρική οδός επεξεργασίας και παρουσίασης. Τόσο η βαριά αλυσίδα, όσο και η σφαιρίνη του μορίου τάξης I, συντίθενται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Το αντιγόνο-πρωτεΐνη, εισέρχεται στο πρωτεόσωμα, ένα πολυκαταλυτικό σύστημα πρωτεϊνάσης, και υφίσταται επεξεργασία που καταλήγει στη δημιουργία πεπτιδίων. Δεν είναι γνωστό αν το πρωτεόσωμα παράγει απ' ευθείας τα σωστά πεπτίδια ή αν αυτά υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία. Η δραστικότητα ενδοπεπτιδάσης του πρωτεασώματος είναι τέτοια, ώστε η πρωτεΐνη τέμνεται κυρίως μετά από υδρόφοβα ή φορτισμένα κατάλοιπα. Η δραστικότητα πρωτεάσης οφείλεται στις υπομονάδες LMP2 και LMP7 (low molecular weight proteins 2 και 7) και τους ενεργοποιητές πρωτεασώματος PA28α και β. Όλα αυτά τα μόρια επηρεάζονται από την παρουσία κυτταροκινών, κύρια της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ), αλλά και των TNF-α και IFN-α. Τα πεπτίδια μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο από το ATP-εξαρτώμενο μόριο TAP (Transporter Associated with Processing), με κύριο κριτήριο επιλογής το μέγεθος (εύρος 7-23 αμινοξέα, με προτιμότερο μέγεθος 10-15 αμινοξέα). Τα μόρια TAP, που αποτελούνται από τις υπομονάδες TAP1 και TAP2, έρχονται σε απ' ευθείας επαφή με τα συντιθέμενα μόρια τάξης I και επιτελείται η μεταφορά των πεπτιδίων με αποφόρτιση των πρώτων και τοποθέτηση στην αύλακα των δεύτερων. Ένα άλλο τσαπερώνιο, η καλνεξίνη, συνδέεται στα άδεια σύμπλοκα βαριάς αλυσίδας και β_2-μικροσφαιρίνης και τα επιστρέφει στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Με τον τρόπο αυτό, τα άδεια μόρια τάξης I δεν φτάνουν στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ τα σύμπλοκα μόριο MHC/πεπτίδιο, μέσω του συμπλέγματος Golgi, παρουσιάζονται στην επιφάνεια του κυττάρου.

Τα μόρια τάξης II του MHC προσδένουν πεπτίδια που προέρχονται από εξωγενή αντιγόνα, ακολουθώντας το εξωκυττάριο μονοπάτι επεξεργασίας και παρουσίασης. Συγκεκριμένα, οι αλυσίδες α και β των μορίων τάξης II του MHC συντίθενται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου συνδέονται με ένα πρωτεϊνικό μόριο, την αμετάβλητη αλυσίδα (Invariant chain, Ii), η οποία κωδικοποιείται από γονίδιο που βρίσκεται εκτός του γονιδιακού τόπου του MHC. Η Ii έχει διπλό ρόλο, τη

μεταφορά του συμπλέγματος στο «διαμέρισμα φόρτωσης», ένα όξινο ενδοσωματικό ή λυσοσωματικό διαμέρισμα και την αποτροπή πρόωρης σύνδεσης πεπτιδίων. Κατά τη μεταφορά στο διαμέρισμα φόρτωσης, η Ii υφίσταται αποδόμηση και διατηρείται μόνο το τμήμα που καταλαμβάνει την αύλακα και ονομάζεται CLIP (Class I-associated Ii-chain Peptides). Το CLIP απομακρύνεται από το σύμπλοκο α/β και αντικαθίσταται από το κατάλληλο πεπτίδιο, που προέρχεται από ενδοκυτταρομένες πρωτεΐνες ή από ενδογενείς πρωτεΐνες, κυρίως μεμβρανικής πρόσδεσης, μετά από επεξεργασία με πρωτεάσες μέσα στο όξινο περιβάλλον του διαμερίσματος φόρτωσης. Η ανταλλαγή αυτή διευκολύνεται από τα μόρια HLA-DM που καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την επιλογή των προς πρόσδεση πεπτιδίων. Τα σύμπλοκα των δύο αλυσίδων με το πεπτίδιο είναι σταθερά και μεταφέρονται στην επιφάνεια του APC, ενώ αυτά που δεν έχουν συνδεδεμένο πεπτίδιο είναι ασταθή και επιστρέφουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο

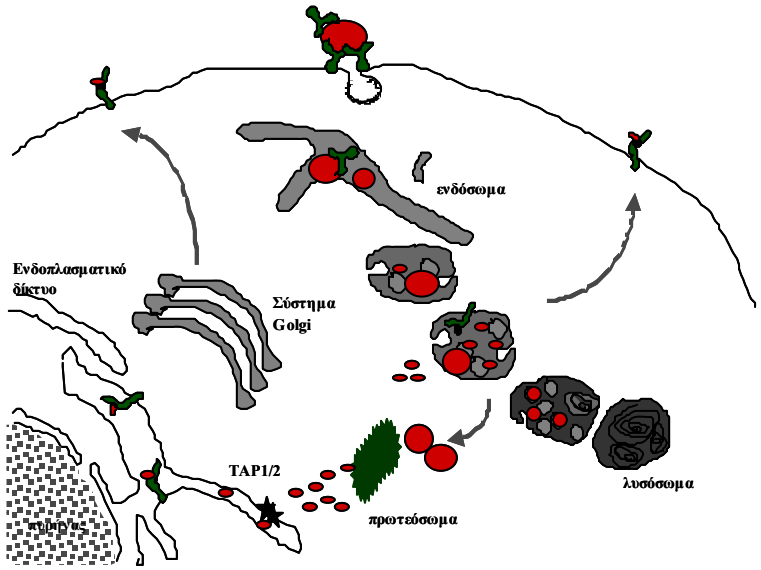
Ο σχηματισμός των μορίων MHC και η έκφρασή τους στην επιφάνεια των APC σε συνδυασμό με το αντίστοιχο πεπτίδιο παρουσιάζονται στην εικόνα 1.5.



Εικόνα 1.5 Ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια οδός παρουσίασης αντιγόνων [Σωτηροπούλου, για την παρούσα διατριβή].

Παρότι οι οδοί επεξεργασίας και παρουσίασης των αντιγόνων την πλειονότητα των περιπτώσεων ακολουθούν τις προαναφερθείσες κατευθύνσεις, υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο οδούς επεξεργασίας. Πεπτίδια προερχόμενα από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες δύνανται να συνδυαστούν με μόρια τάξης II του MHC και αντίστροφα πεπτίδια εξωγενών αντιγόνων με μόρια τάξης I.

Εξωγενή αντιγόνα, όπως προϊόντα αποπτωτικών ή νεκρωτικών κυττάρων, ελάσσονα αντιγόνα μεταμοσχεύσεων και ποικιλία καρκινικών αντιγόνων, μπορούν να ακολουθήσουν το εναλλακτικό μονοπάτι παρουσίασης πεπτιδίων για τα μόρια τάξης I του MHC. Η οδός αυτή δύναται να είναι ανεξάρτητη του πρωτεασώματος και των TAP, κατά την οποία τα πεπτίδια συνδέονται με το μόριο τάξης I στα ενδοσώματα ή να περιλαμβάνει όλους του μηχανισμούς της κλασικής ενδογενούς οδού επεξεργασίας, οπότε τα πεπτίδια μεταφέρονται πρώτα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο εγγύς κυστίδιο του συμπλέγματος Golgi. Τα πεπτίδια εισέρχονται στο κύτταρο κυρίως με φαγοκύττωση ή μακροπινοκύττωση, ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η πρωτεΐνη θερμικού σοκ (heat shock protein) gp96, που διευκολύνει τη μεταφορά εξωγενών αντιγόνων στην ενδοκυτταρική οδό παρουσίασης. Σχηματικά, η εναλλακτική αυτή οδός παρουσιάζεται στη συνέχεια:



Εικόνα 1.6
Εναλλακτική οδός παρουσίασης εξωγενών αντιγόνων σε μόρια MHC τάξης I [Σωτηροπούλου, για την παρούσα διατριβή].

Παρότι τα κυτταροπλασματικά αντιγόνα παρουσιάζονται κύρια από τα μόρια τάξης I του MHC, είναι δυνατό να παρουσιαστούν και από μόρια τάξης II, ως αποτέλεσμα της προ-ενδοσωμικής δέσμευσης των πεπτιδίων, ορισμένες φορές εξαρτώμενης από τις TAP. Η παρουσίαση πεπτιδίων προερχόμενων από ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες από τα μόρια τάξης II σχετίζεται με αλλαγές στις αναλογίες των αλυσίδων α και β του μορίου MHC τάξης II, της αμετάβλητης αλυσίδας και των μορίων HLA-DM στα APC. Η διεργασία αυτή οδηγεί στην παρουσίαση εαυτών πεπτιδίων και την κατάργηση της αυτοανοχής. Η εναλλακτική αυτή οδός ενεργοποιείται σε κατάσταση φλεγμονής και εξαρτάται από την παρουσία κυτταροκινών, όπως η IFN-γ.

1.3.3. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στα μόρια MHC και τον TCR

Οι δύο κατηγορίες των Τ λεμφοκυττάρων έχουν διαφορετικές λειτουργίες και αυτό αντικατοπτρίζεται στη χρήση διαφορετικών μορίων MHC για την ενεργοποίησή τους. Ο TCR των κυτταροτοξικών CD8 λεμφοκυττάρων αλληλεπιδρά με τα μόρια τάξης Ι, ενώ των βοηθητικών CD4 λεμφοκυττάρων με τα μόρια τάξης ΙΙ. Στα CTL ο TCR έρχεται σε επαφή με 5 έως 7 από τα 8 ή 9 κατάλοιπα του πεπτιδίου, ενώ των Th με 6 έως 9 αμινοξέα. Ως συν-υποδοχείς δρουν τα χαρακτηριστικά μόρια των δύο κατηγοριών λεμφοκυττάρων, τα CD4 και CD8, τα οποία συνδέονται με μη μεταβλητές περιοχές των αντίστοιχων μορίων MHC. Η περιοχές του μορίου MHC όπου προσδένονται ο TCR και τα CD4 ή CD8 βρίσκονται σε απόσταση ώστε να είναι δυνατή η αλληλεπίδραση των τριών μορίων ταυτόχρονα.

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο μόριο MHC και τον TCR είναι παροδική και κρατά 2-30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια ο TCR ενδοκυτταρώνεται και ανακυκλώνεται μετά από λυσοσωματική αποδιάταξη. Συνεπώς, το σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC μένει ελεύθερο για να ενεργοποιήσει άλλους TCR, με αποτέλεσμα το ίδιο σύμπλοκο να ενεργοποιεί ακόμα και 200 TCR, επεκτείνοντας και συντηρώντας την ανοσολογική απάντηση. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει πως ακόμα και 100 σύμπλοκα ειδικού πεπτιδίου/μορίου MHC ανάμεσα σε ένα σύνολο 50.000 μη σχετικών συμπλόκων, μπορούν να επάγουν επιτυχώς ανοσολογική απόκριση.

1.4. Κυτταρική συνεργασία για την ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης

1.4.1. Έναρξη ανοσολογικής απόκρισης

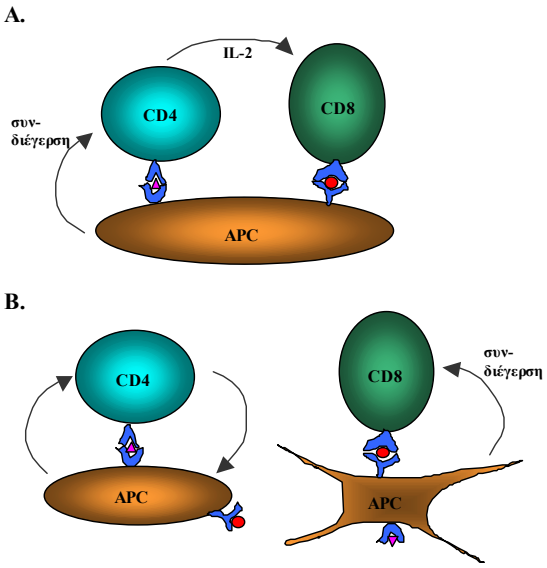
Όταν ένα παθογόνο εισέλθει στον οργανισμό, τα ανώριμα DC που εντοπίζονται στους ιστούς προσλαμβάνουν τα αντιγόνα αυτού και μεταναστεύουν στους λεμφαδένες, υποκινούμενα από τη φλεγμονώδη αντίδραση που έχει προηγηθεί, Τα αντιγόνα που εισέρχονται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος προσλαμβάνονται από τα APC του σπλήνα. Η δέσμευση του αντιγόνου από τα APC, τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν στους λεμφικούς ιστούς, καθώς και η συνεχής επανακυκλοφόρηση των αθώων Τ λεμφοκυττάρων επιβεβαιώνουν ότι τα σπάνια, ειδικά για το εκάστοτε αντιγόνο Τ κύτταρα, θα έρθουν σε επαφή με αυτό στην επιφάνεια ενός APC.

Τα Τ κύτταρα εισέρχονται στα λεμφικά όργανα με τη βοήθεια της L-σελεκτίνης και κάτω από την επίδραση χημειοκινών που εκκρίνονται από τα κύτταρα

των λεμφαδένων. Στο περιβάλλον των λεμφικών οργάνων εξετάζουν την επιφάνεια των APC για το ειδικό για αυτά σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC. Αν δεν το αναγνωρίσουν, εξέρχονται του λεμφικού οργάνου μέσω των απαγωγών λεμφικών αγγείων και επιστρέφουν στο αίμα ώστε να διελαύνουν από άλλους λεμφαδένες. Σπάνια, ένα αθώο Τ κύτταρο αναγνωρίζει το ειδικό σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC στην επιφάνεια ενός APC για τον TCR που φέρει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μορίου LFA-1 (με εναλλακτική ονομασία CD11α), η οποία προκαλεί την ισχυρή προσκόλληση του Τ κυττάρου στο APC και την παύση της μετανάστευσης και των δύο κυττάρων.

1.4.2. Συνδιεγερτικά μόρια

Μετά την πάροδο μερικών ωρών από την αναγνώριση του ειδικού συμπλόκου πεπτίδιο/μόριο MHC από τον TCR του CD4 κυττάρου, αυξάνεται η επιφανειακή έκφραση του μορίου CD40, που είναι μέλος της οικογένειας των TNF. Ο CD40 συνδέεται με τον υποδοχέα του, τον συνδέτη-CD40 (CD40L ή CD154) που βρίσκεται στην επιφάνεια του APC. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση και ωρίμανση του APC, η οποία χαρακτηρίζεται από την αύξηση της επιφανειακής έκφρασης άλλων μορίων, υπεύθυνων για την παρουσίαση του αντιγόνου, καθώς και συνδιεγερτικών μορίων, όπως τα μόρια του MHC τάξης I και II, το ICAM-1 (εναλλακτική ονομασία CD54), το CD80 και το CD86. Η φάση αυτή της αλληλεπίδρασης Th και APC είναι πολύ σημαντική, διότι επιτρέπει στο APC να παρουσιάσει το αντιγόνο στα CTL και να τα ενεργοποιήσει. Είναι δυνατόν το APC να ευαισθητοποιήσει το CTL αφού αποσυνδεθεί με το Th ή να το παρουσιάσει ταυτόχρονα στο Th και το CTL. Και στις δύο διαδικασίες είναι απαραίτητη η παρουσία ενός Th κυττάρου, ώστε, μέσω της αλληλεπίδρασης CD40-CD40L, να ενεργοποιηθεί και να ωριμάσει το APC (εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Τύποι αλληλεπιδράσεων μεταξύ $CD4^+$, $CD8^+$ και APC [Βασισμένο στο Ridge et al, 1998].

Η σωστή ενεργοποίηση των Τ κυττάρων από το APC και η αποφυγή πρόκλησης ανέργειας εξαρτάται από την παρουσία συνδιεγερτικών μορίων στις επιφάνειες των Τ λεμφοκυττάρων και των APC, καθώς και από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Στα Τ κύτταρα εντοπίζονται μεταξύ άλλων τα μόρια CD28, 4-1BB (με εναλλακτική ονομασία CD137), OX40 (με εναλλακτική ονομασία CD134), ICOS, LIGHT και CD27 που επάγουν ενεργοποίηση και τα CTLA-4 (με εναλλακτική ονομασία CD152) και CD30 που προκαλούν αναστολή. Το πιο σημαντικό συνδιεγερτικό μόριο είναι το CD28, το οποίο συνδέεται με τα Β7 μόρια (Β7.1 και Β7.2), CD80 ή/και CD86, στα APC. Παρότι υπάρχουν και εναλλακτικές οδοί συνδιέγερσης, η σύνδεση του CD28 αποτελεί το πιο σημαντικό δευτερεύον σήμα.

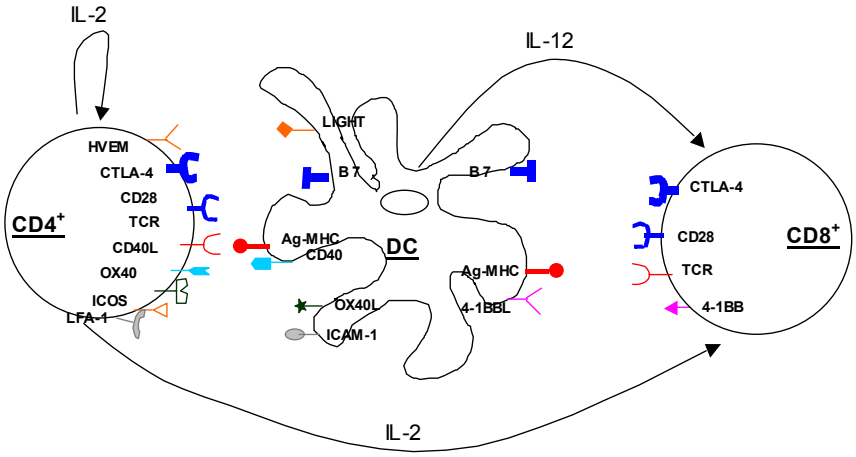
Πολύ σύντομα από την ευαισθητοποίησή τους, τα Τ κύτταρα αυξάνουν την έκφραση του μορίου CTLA-4, έναν εναλλακτικό συνδέτη για τα μόρια Β7 των APC με μεγάλη ομολογία προς το CD28, που όμως προσδένεται ισχυρότερα στα Β7 μόρια, προκαλώντας αναστολή της ενεργοποίησης.

Τα μόρια 4-1BB και OX-40 είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της διέγερσης όταν ενωθούν με τους υποδοχείς τους, πιθανά μέσω αναστολής του θανάτου λόγω ενεργοποίησης (activation-induced cell death). Το ICOS προκαλεί την ενεργοποίηση των Th με παρόμοιο τρόπο με το CD28, αλλά ενώ οδηγεί στην έκκριση IFN-γ και IL-4, δεν οδηγεί στην έκκριση IL-2. Ένα νέο μέλος της οικογένειας των TNF, το LIGHT

είναι συνδιεγερτικό μόριο που δρα ανεξάρτητα από τη ύπαρξη σύνδεσης του CD28. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο συνδέτες του, οι LTβR και HVEM.

Το μόριο CD27 που εντοπίζεται σε Τ και Β κύτταρα, όταν συνδεθεί με τον υποδοχέα του CD70, που υπάρχει στα DC και σε πολλά είδη λεμφοκυττάρων, ελέγχει όχι μόνο την έναρξη της ανοσολογικής απάντησης, αλλά και το μέγεθος και τη δράση του προκύπτοντος πληθυσμού δραστικών κυττάρων. Τέλος, το μόριο CD30, που εκφράζεται σε Τ και Β λεμφοκύτταρα και στα θυμοκύτταρα, δρα ανασταλτικά στην ανοσολογική απάντηση των Τ κυττάρων ως αποτέλεσμα στη διέγερση από εαυτά αντιγόνα.

Η αλληλεπίδραση του TCR των Τ κυττάρων με το αντίστοιχο σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC και η ακόλουθη σύνδεση των συνδιεγερτικών μορίων, οδηγεί στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αθώων Τ λεμφοκυττάρων, ώστε να δημιουργηθεί ένας πληθυσμός δραστικών ειδικών για το συγκεκριμένο αντιγόνο Τ κυττάρων. Τα επιφανειακά μόρια που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία αυτή συνοψίζονται στην εικόνα 1.8.



Εικόνα 1.8 Επιφανειακά μόρια που λαμβάνουν μέρος στην αλληλεπίδραση μεταξύ $CD4^+$, $CD8^+$ και APC [Σωτηροπούλου, για την παρούσα διατριβή].

1.4.3. ΤΗ1, ΤΗ2 τύπος ανοσοαπόκρισης

Όταν τα αθώα Th λεμφοκύτταρα ενεργοποιηθούν και αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται, ως αποτέλεσμα της ευαισθητοποίησής τους από το αντίστοιχο σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου MHC, διαφοροποιούνται σε δύο βασικές υποκατηγορίες δραστικών $CD4^+$ κυττάρων, τα ΤΗ1 και τα ΤΗ2 βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Ο τύπος ΤΗ1 χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κυρίως IFN-γ, IL-2 και TNF-β, ενώ τα ΤΗ2 κύτταρα παράγουν κυρίως IL-4, IL-10 και IL-13. Οι παραγόμενες κυτταροκίνες

επηρεάζουν το αποτέλεσμα της ανοσολογικής απάντησης. Τα TH1 κύτταρα, παράγοντας IFN-γ επάγουν την έκφραση πολλών πρωτεϊνών της ενδοκυττάριας επεξεργασίας αντιγόνων (όπως οι TAP, οι πρωτεΐνες του πρωτεασώματος και τα μόρια MHC τάξης I) και συνεπώς προάγουν την κυτταρική ανοσία. Επίσης επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων ισοτύπου IgG2a και την ενεργοποίηση των φυσικών φονικών κυττάρων. Είναι σημαντικά για την άμυνα ενάντια σε ενδοκυτταρικά παθογόνα και καρκινικά κύτταρα. Τα TH2 κύτταρα ενεργοποιούν τα μαστοκύτταρα και τα εωσινόφιλα, δρώντας ενάντια σε εξωκυττάρια παθογόνα, ατοπικές και αλλεργικές αντιδράσεις. Η εκλυόμενη IL-4 ενισχύει την παραγωγή ανοσοσφαιρινών τάξης IgG1 και IgE προάγοντας τη χυμική ανοσία.

Η επιλογή του τύπου των Th λεμφοκυττάρων εξαρτάται από τις κυτταροκίνες που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον, το ποσό και την αλληλουχία του πεπτιδίου που προκάλεσε την ενεργοποίησή τους, τον τρόπο εισόδου του στον οργανισμό και τα συνδιεγερτικά μόρια. Μεγάλα ποσά πεπτιδίων έχουν ως αποτέλεσμα μεγάλη συγκέντρωσή τους σε συνδυασμό με μόρια MHC στην επιφάνεια των APC και επάγουν τη διαφοροποίηση των αθώων Th σε τύπο TH1 δραστικών Th κυττάρων. Επίσης, σύμπλοκα πεπτιδίων/μορίων MHC που συνδέονται ισχυρά με τον TCR οδηγούν σε TH1 ανοσοαπόκριση. Το αντίθετο συμβαίνει για τη δημιουργία TH2 τύπου ανοσολογικής απάντησης. Δεδομένου ότι κάθε αντιγόνο παρουσιάζει πολλούς επιτόπους με διαφορετική συγκέντρωση και συγγένεια με τον απλότυπο του MHC του δέκτη, άρα και του TCR των αθώων λεμφοκυττάρων του, το αποτέλεσμα είναι να υπάρχει σε κάθε αντιγόνο το δυναμικό για την ανάπτυξη και των δύο τύπων ανοσοαπόκρισης.

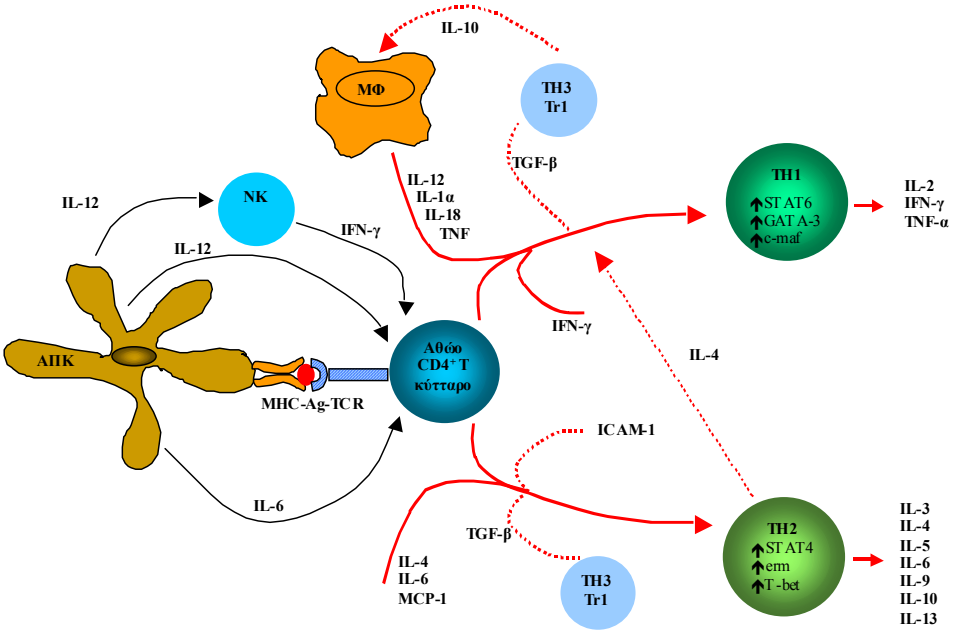
Σημαντικοί υποκινητές του τύπου της ανοσολογικής απάντησης είναι και οι κυτταροκίνες. Τα APC, ανάλογα με τις κυτταροκίνες που παράγουν, μπορούν να ωθήσουν τη διαφοροποίηση των αθώων Th κυττάρων προς τον τύπο TH1 ή TH2. Τα αθώα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται προς TH1 κύτταρα, επάγοντας κυτταρικό τύπο ανοσίας, σε απάντηση στην παρουσία IL-12. Η διαφοροποίηση προς TH1 εξαρτάται επίσης από την παρουσία IFN-γ, ενώ η διατήρησή της εξαρτάται από τις κυτταροκίνες IL-12 και IL-18. Η παρουσία IL-4 και IL-10 αναστέλλει την παραγωγή IL-12 και IL-18 από τα μακροφάγα και τα DC καταστέλλοντας τον τύπο TH1 και επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Th κυττάρων προς τον τύπο TH2. Δεδομένου ότι οι κυτταροκίνες που παράγει κάθε υπότυπος δραστικών Th κυττάρων ενισχύουν την ανάπτυξη των ίδιων και τη διαφοροποίηση

των αθώων Th προς την ίδια κατηγορία, ενώ αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Th κυττάρων της αντίθετης κατηγορίας, συχνά επικρατεί ο ένας τύπος ανοσοαπόκρισης. Όσον αφορά στα συνδιεγερτικά μόρια, η αλληλεπίδραση μεταξύ των ICAM-1 και LFA-1 αναστέλλει τη διαφοροποίηση προς TH2 τύπο Th κυττάρων, ενώ αντίστροφα δρα η σύνδεση του CD30 με τον CD30L

Τα Th κύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί προς τον έναν ή τον άλλο υποτύπο, μπορούν να αλλάξουν κατεύθυνση, αν δεχθούν τα κατάλληλα σήματα μέχρι την τέταρτη διαίρεση μετά από την ευαισθητοποίηση. Μετά από τη στιγμή αυτή, κάθε διαίρεσή τους θα δώσει κύτταρα του ίδιου τύπου.

Υπάρχει και ένας τρίτος τύπος $CD4^+$ T κυττάρων, τα TH3 βοηθητικά λεμφοκύτταρα ή ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα 1 (Tr1). Τα κύτταρα αυτά παράγουν IL-10 και άλλες ανασταλτικές κυτταροκίνες, όπως ο TGF-β και ο ρόλος τους είναι η καταστολή της ανοσολογικής απάντησης όταν ολοκληρωθεί η καταστροφή του αντιγόνου (βλέπε και συνέχεια).

Η διαφοροποίηση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων προς TH1 και TH2 κύτταρα παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα



Εικόνα 1.9 Διαφοροποίηση των αθώων T βοηθητικών λεμφοκυττάρων σε κύτταρα τύπου TH1, TH2 και TH3 (οι συνεχόμενες γραμμές δείχνουν προαγωγή, ενώ οι διακεκομμένες αναστολή) [Βασισμένο σε Kunzendorf et al, 1998; O' Garra et al, 2000].

1.4.4. Δραστικά (effector) Τ λεμφοκύτταρα

Το πρώτο στάδιο μετά την ευαισθητοποίηση των λεμφοκυττάρων είναι ο πολλαπλασιασμός, ο οποίος ξεκινά μέσα στα λεμφικά όργανα, όπου έγινε και η επαφή με το αντιγόνο. Όσον αφορά στη διάρκεια της επαφής με το αντιγόνο που απαιτείται για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, αυτή διαφέρει για τους δύο τύπους και είναι 2 ώρες για τα $CD8^+$ και 6 ώρες για τα $CD4^+$. Η φάση του πολλαπλασιασμού στα $CD8^+$ κύτταρα αρχίζει αμέσως μετά και ο ρυθμός διπλασιασμού είναι πολύ γρήγορος (6-8 ώρες), ενώ στα $CD4^+$ αρχίζει 36-48 ώρες αργότερα και ο χρόνος διπλασιασμού είναι γύρω στις 10 ώρες. Παρόλα αυτά, τα Th κύτταρα που παράγονται είναι αρκετά για τη βοήθεια που παρέχουν στα CTL, δεδομένου ότι κάθε $CD4^+$ κύτταρο δύναται να παρέχει βοήθεια σε πολλά $CD8^+$. Η φάση του πολλαπλασιασμού επεκτείνεται χρονικά όσο παραμένει η παρουσία του αντιγόνου. Υπάρχει όμως ένα δεδομένο χρονικό σημείο, πέραν του οποίου, αν εξακολουθεί η παρουσία του αντιγόνου (για παράδειγμα σε χρόνιες λοιμώξεις) τα Τ κύτταρα διαιρούνται με πιο αργό ρυθμό και είναι μη λειτουργικά (T cell exhaustion).

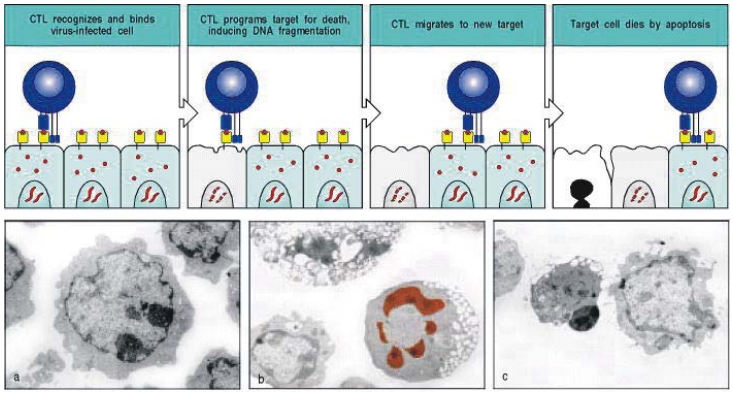
Τα δραστικά Τ κύτταρα εκφράζουν αυξημένα ποσά μορίων προσκόλλησης, όπως τα LFA-1, CD2 και VLA-4 (με εναλλακτική ονομασία CD49d), τα οποία τους επιτρέπουν να προσκολληθούν στο ενδοθήλιο των αγγείων στα σημεία της φλεγμονής και να επιτελέσουν τη λειτουργική τους δράση. Τα $CD8^+$ κύτταρα, μετά την ενεργοποίηση και κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους, συνθέτουν κυτταροτοξικές πρωτεΐνες και τις αποθηκεύουν σε λυτικά οργανίδια. Τα λυτικά οργανίδια είναι ένα είδος τροποποιημένων λυσοσωμάτων, όπου οι κυτταροτοξικές πρωτεΐνες, η περφορίνη και τα granzymes, αποθηκεύονται σε ενεργό μορφή.

1.4.5. Κυτταροτοξικότητα με τη μεσολάβηση Τ κυττάρων (T cell-mediated cytotoxicity)

Με την ενεργό δράση των Τ λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται η καταστροφή των μολυσμένων και των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να επηρεαστεί ο περιβάλλον υγιής ιστός. Δύο είναι οι τύποι κυτταρικού θανάτου, η νέκρωση, που προκαλείται από τραυματισμό της κυτταρικής μεμβράνης και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death) ή απόπτωση, όπου το κύτταρο καταστρέφεται από το εσωτερικό και περιλαμβάνει πυρηνικό αναβρασμό, συρρίκνωση και κατάτμηση του DNA. Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να καταστρέψουν τους

στόχους τους προκαλώντας και τους δύο τύπους κυτταρικού θανάτου. Ο προγραμματισμός της απόπτωσης του κυττάρου στόχου γίνεται μέσα σε 5 λεπτά από την επαφή του με το CTL, αλλά απαιτεί ώρες μέχρι να ολοκληρωθεί.

Όταν το CTL έρθει σε επαφή με το κύτταρο στόχο, προσανατολίζει το σύστημα Golgi προς το σημείο της επαφής και ελευθερώνει τοπικά το περιεχόμενο των λυτικών του οργανιδίων. Με τον τρόπο αυτό, παρότι οι κυτταροτοξικές πρωτεΐνες δεν παρουσιάζουν ειδίκευση, μπορούν να καταστρέψουν μόνο το κύτταρο-στόχο. Όταν ελευθερώσουν τα κυτταροτοξικά μόρια, τα CTL μετακινούνται προς το επόμενο στόχο και προσκολλώνται σε αυτό (εικόνα 1.10).

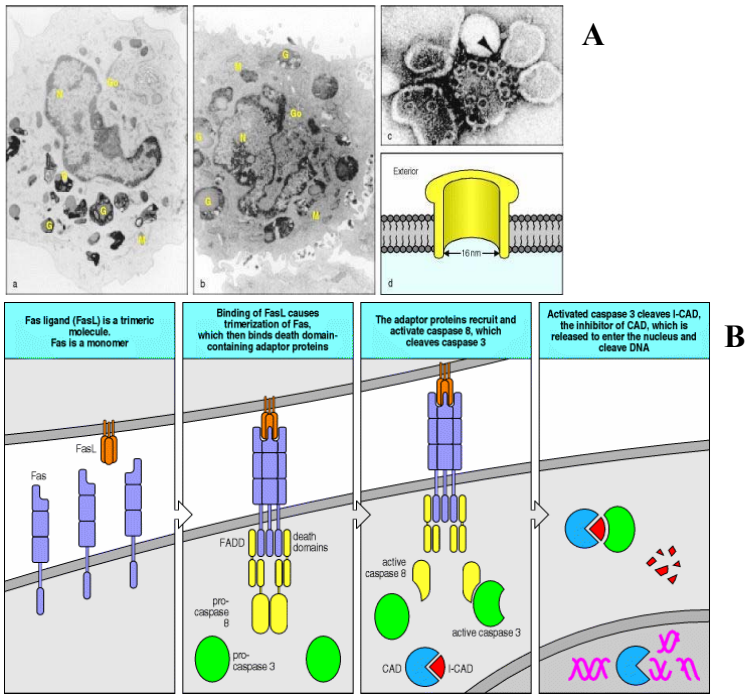


Εικόνα 1.10 Τα CTL επιτίθενται στα κύτταρα-στόχους διαδοχικά και τα καταστρέφουν με τοπική ελευθέρωση κυτταροτοξικών παραγόντων [Roit et al, 1995].

Η περφορίνη, όταν έρθει σε επαφή με τη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, πολυμερίζεται και σχηματίζει μία κυλινδρική δομή λιπόφιλη στο εξωτερικό μέρος και υδρόφιλη στο εσωτερικό, με διάμετρο 16 nm (εικόνα 1.11). Το αποτέλεσμα είναι να σχηματιστεί ένας πόρος στη μεμβράνη, να εισρεύσουν ανόργανα άλατα στο εσωτερικό του κυττάρου και τελικά να πεθάνει.

Τα granzymes είναι πρωτεάσες σερίνης, οι οποίες ενεργοποιούν μια αλληλουχία ενζύμων με αποτέλεσμα την κατάτμηση του DNA. Το granzyme B ενεργοποιεί την κασπάση CPP-32, που ενεργοποιεί τη νουκλεάση CAD που δρα στο DNA.

Εκτός από τις κυτταροτοξικές πρωτεΐνες, τα CTL, αλλά και μερικά δραστικά Th του τύπου TH1, έχουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα FasL (εναλλακτική ονομασία CD178), ο οποίος ενώνεται με τον Fas (εναλλακτική ονομασία CD95) της επιφάνειας των κυττάρων-στόχων (εικόνα 1.11). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας αλληλουχίας κασπασών, οι οποίες προκαλούν απόπτωση.

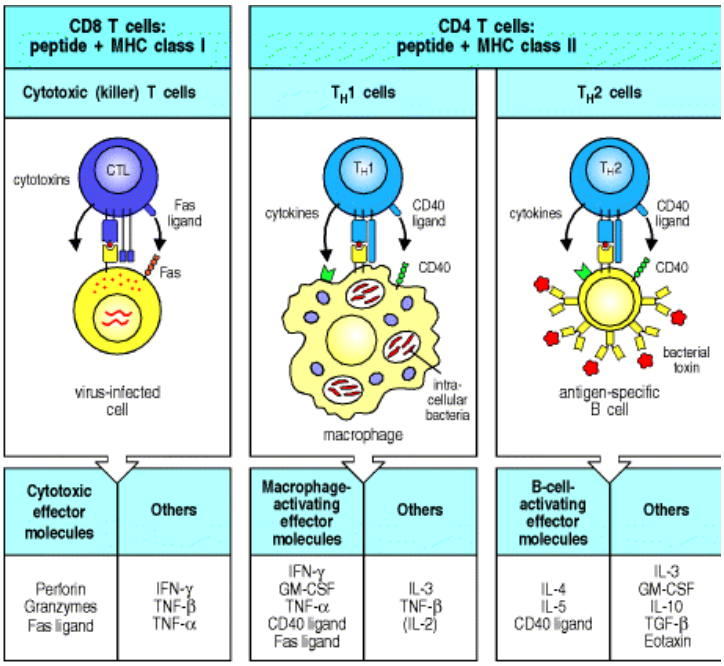


Εικόνα 1.11
Καταστροφή κυττάρου-στόχου μέσω περφορίνης (Α) και μέσω σύνδεσης Fas-FasL [Roit et al, 1995]

Τέλος, παρότι τα Τ κύτταρα καταστρέφουν τα κύτταρα-στόχους κύρια με την περφορίνη και τα granzymes και δευτερευόντως μέσω σύνδεσης Fas-FasL, μπορούν να περιορίσουν τη λοίμωξη και με την έκκριση κυτταροκινών, όπως οι IFN-γ, TNF-α και TNF-β, που συμβάλουν στην άμυνα με ποικίλους τρόπους. Η IFN-γ εμποδίζει την ιική αντιγραφή, επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών των οδών επεξεργασίας και παρουσίασης των αντιγόνων συμβάλλοντας στην επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης, ενεργοποιεί τα μακροφάγα και μειώνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση τρυπτοφάνης, καταστρέφοντας κατ' αυτό τον τρόπο τα ενδοκυττάρια παράσιτα. Οι TNF-α και TNF-β συνεργάζονται με την IFN-γ στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και καταστρέφουν ορισμένους κυτταρικούς στόχους μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα TNFR-I.

Με τη συνδυασμένη δράση Th και CTL, καταστρέφονται τα κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους ξένα προς τον οργανισμό αντιγόνα σε συνδυασμό με εαυτά μόρια του MHC. Μια τυπική ανοσολογική αντίδραση ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα λίγων ημερών και στη συνέχεια η πλειονότητα των δραστικών κυττάρων πεθαίνει.

Η δράση των Τ λεμφοκυττάρων κατά την ανοσολογική απόκριση παρουσιάζεται στην εικόνα 1.12.



Εικόνα 1.12 Λειτουργίες των διαφορετικών τύπων Τ λεμφοκυττάρων κατά την ανοσολογική απάντηση [Roit et al, 1995].

1.4.6. Κύτταρα μνήμης

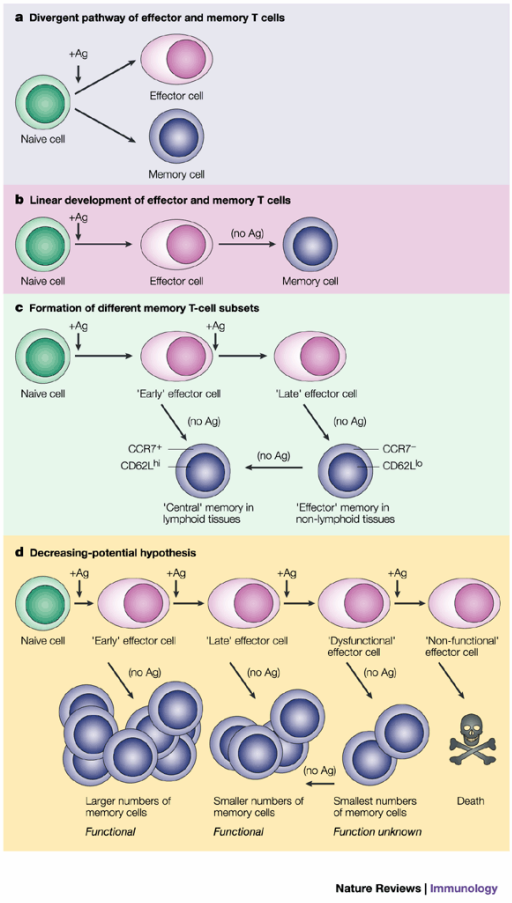
Η αναμνηστική απάντηση ενάντια σε ένα παθογόνο είναι πολύ πιο γρήγορη και πιο αποτελεσματική από την πρωτογενή απάντηση. Η διαφορά αυτή στην ανοσολογική απάντηση, ανάμεσα στην πρώτη φορά που εισέρχεται ένα παθογόνο στον οργανισμό και τις επόμενες, οφείλεται στην ύπαρξη των Th και CTL κυττάρων μνήμης, τα οποία παράγονται στο τέλος της πρωτογενούς ανοσολογικής απόκρισης. Από τα δραστικά $CD4^+$ και $CD8^+$ κύτταρα της πρωτογενούς ανοσοαπόκρισης, το 90% καταστρέφεται σύντομα μετά την εξάλειψη του παθογόνου παράγοντα και συνεπώς των αντιγόνων αυτού. Δεδομένου ότι η επιβίωση είναι το γενετικά προτιμητέο μονοπάτι για τα δραστικά κύτταρα, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο γιατί η μεγάλη πλειοψηφία των δραστικών κυττάρων πεθαίνει και δημιουργούνται τα κύτταρα μνήμης.

Τα κύτταρα μνήμης παρουσιάζουν ομοιότητες με τα αθώα Τ κύτταρα, αλλά διατηρούν και μερικούς χαρακτήρες των δραστικών κυττάρων. Παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα επιφανειακής έκφρασης CD44, που διευκολύνει τη μετακίνησή τους στους ιστούς, ενώ η ισομορφή του CD45 αλλάζει από CD45RA σε CD45RO, εξαιτίας εναλλακτικής συρραφής των εξωνίων που κωδικοποιούν την εξωκυτταρική του

αλληλουχία. Η αλλαγή αυτή διευκολύνει την αναγνώριση του αντιγόνου από τον TCR.

Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες $CD4^+$ κυττάρων μνήμης, ανάλογα με το φαινότυπο και τον εντοπισμό τους. Διακρίνονται από τις διαφορές στην επιφανειακή έκφραση της L-σελεκτίνης (CD62L) και του υποδοχέα-7 της CC-χημειοκίνης (CCR7 ή CD197). Ο CD62L αντιδρά με το μόριο PNAd των ενδοθηλιακών αγγείων και μεσολαβεί στην προσκόλληση, ενώ ο CCR7 συνδέεται με τις χημειοκίνες CCL19 και CCL21 των ενδοθηλιακών αγγείων των λεμφαδένων και προκαλεί την έναρξη της εξαγωγής από τα αγγεία. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα μνήμης με φαινότυπο $CD62L^{hi}CCR7^+$ μπορούν να κυκλοφορούν στα αγγεία και συνεπώς εντοπίζονται στα κεντρικά λεμφικά όργανα και ονομάζονται «κεντρικά» κύτταρα μνήμης (central memory cells), ενώ τα $CD62L^{lo}CCR7^-$ βρίσκονται σε περιφερικούς ιστούς και ονομάζονται «δραστικά» κύτταρα μνήμης (effector memory cells). Όσον αφορά στις λειτουργίες τους, τα κεντρικά $CD4^+$ κύτταρα μνήμης παράγουν IL-2 αλλά μικρά ποσά IFN-γ και IL-4, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει με τα δραστικά. Το αποτέλεσμα είναι τα δραστικά $CD4^+$ κύτταρα μνήμης να απαντούν γρήγορα στην ενεργοποίηση με την παραγωγή κυτταροκινών φλεγμονής, ενώ τα κεντρικά να αυξάνουν την επιφανειακή έκφραση του CD40L και να επάγουν την ενεργοποίηση των APC. Εκτός αυτού, μόνο τα δραστικά $CD8^+$ κύτταρα μνήμης περιέχουν ενδοκυττάρια περφορίνη. Περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για τον καθορισμό των λειτουργιών για τις οποίες είναι υπεύθυνος ο κάθε τύπος Τ κυττάρων μνήμης.

Υπάρχουν τέσσερα μοντέλα για τη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μνήμης. Η απευθείας παραγωγή τους από τα αθώα κύτταρα (εικόνα 1.13.a), η διαδοχική τους διαφοροποίηση από τα ίδια τα δραστικά (εικόνα 1.13.b) και η πλευρική τους διαφοροποίηση ανάλογα με τη διάρκεια παρουσίας του αντιγόνου. Στην τελευταία περίπτωση εμπίπτουν δύο μοντέλα, που αποτελούν παραλλαγές της παραγωγής των κυττάρων μνήμης από τα δραστικά κύτταρα. Το πρώτο υποστηρίζει ότι μικρή διάρκεια επαφής του δραστικού κυττάρου με το αντιγόνο δημιουργεί κεντρικά κύτταρα μνήμης, ενώ μεγαλύτερη δίνει δραστικά κύτταρα μνήμης (εικόνα 1.13.c). Κατά το δεύτερο, όσο περισσότερο διαρκεί η επαφή του δραστικού κυττάρου με το αντιγόνο, τόσο μειώνεται ο αριθμός και η δραστικότητα των κυττάρων μνήμης (εικόνα 1.13.d). Τα μοντέλα αυτά παρουσιάζονται στην εικόνα 1.13.



Εικόνα 1.13 Μοντέλα διαφοροποίησης Τ λεμφοκυττάρων μνήμης [Kaeck et al, 2002].

Παρότι τα κύτταρα μνήμης διατηρούνται σε μικρούς αριθμούς για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα, παρουσιάζουν διαφορές στην ομοιόστασή τους σε σχέση με τα αθώα κύτταρα. Κατ' αυτό τον τρόπο, τα αθώα κύτταρα διαιρούνται με πιο αργούς ρυθμούς και απαιτούν παροδική επαφή με εαυτά μόρια MHC για την επιβίωσή τους. Αντίθετα, τα κύτταρα μνήμης έχουν μικρότερο χρόνο διπλασιασμού, ενώ η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός τους εξαρτάται από τις κυτταροκίνες του μικροπεριβάλλοντος. Για τα $CD8^+$ κύτταρα, η IL-15 είναι η κύρια κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην ομοιόστασή τους, ενώ για τα $CD4^+$ ο συνδυασμός IL-7 και IL-15, καθώς και ο συνδυασμός IL-10 και IL-12 για τα δραστικά Th κύτταρα μνήμης. Εξάλλου, οι κυτταροκίνες IL-4 και IL-12 δεν κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των Th κυττάρων μνήμης σε TH2 και TH1 τύπο αντίστοιχα, αλλά η κατεύθυνση αυτή εξαρτάται από το είδος της αντιγονικής διέγερσης.

1.4.7. Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα

Η πλειονότητα των ανοσολογικών απαντήσεων σε έναν οργανισμό είναι ποιοτικά και ποσοτικά προσαρμοσμένη να παράγει το βέλτιστο αποτέλεσμα. Κάθε απόκριση του ανοσολογικού συστήματος δηλαδή, δεν είναι ανεξέλεγκτη, αλλά αναπτύσσεται μέσα σε ορισμένα όρια. Ο αριθμός των Τ λεμφοκυττάρων και η συγκέντρωση των αντισωμάτων αυξάνονται λογαριθμικά μετά από επαγωγή από ένα δεδομένο αντιγόνο, αλλά τα επίπεδά τους σύντομα σταθεροποιούνται και τελικά μειώνονται. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τα φαινόμενα αυτά είναι περίπλοκοι, δεν έχουν διαλευκανθεί λεπτομερώς μέχρι σήμερα και το σύνολό τους συνιστά την ανοσορύθμιση.

Η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης βασίζεται κατά κύριο λόγο σε Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία συνιστούν μία ετερογενή ομάδα, τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα. Υπάρχουν δύο κύριες θεωρίες για την προέλευσή τους, βασιζόμενες σε μοντέλα πειραματοζώων. Η πρώτη προτείνει ότι μία διακριτή υποομάδα Τ λεμφοκυττάρων που ωριμάζει στο θύμο αδένα συνιστά τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα με καθορισμένη δράση. Κατά τη δεύτερη θεωρία, αθώα Τ λεμφοκύτταρα της περιφέρειας, έρχονται σε επαφή με το αντίστοιχο αντιγόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις και διαφοροποιούνται σε ρυθμιστικά.

Έχουν προταθεί πολλά επιφανειακά μόρια ως δείκτες για τα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα. Κανένας όμως δε συναντάται αποκλειστικά σε αυτά, ούτε και είναι δυνατή η χρήση ενός δείκτη για όλες τις κατηγορίες ρυθμιστικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, υπάρχουν ορισμένα επιφανειακά μόρια που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό τους, αλλά η χρήση τους πρέπει να γίνεται με προσοχή και λαμβάνοντας υπόψη ότι διαφοροποιούνται ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα (ευαισθητοποιημένα, ενεργοποιημένα, μνήμης).

Η κυριότερη ομάδα ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων συνίσταται από τα $CD4^+CD25^+$ κύτταρα, τα οποία αποτελούν το 5-10% των $CD4^+CD8^-$ κυττάρων του θύμου αδένα. Άλλοι επιφανειακοί δείκτες των κυττάρων αυτών είναι η χαμηλή έκφραση του CD45, όσον αφορά στις ισομορφές RB και RO. Η έκκριση κυτταροκινών, κύρια TGF-β, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσορυθμιστική τους δράση, για την οποία όμως είναι απαραίτητη η επαφή των κυττάρων, πιθανά λόγω της αναστολής έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 που επάγουν στα APC, της προώθηση ανασταλτικών σημάτων μέσω του μορίου CTLA-4 που εκφράζουν αυξημένο στην επιφάνειά τους και στον ανταγωνισμό με τα δραστικά

Τ κύτταρα ίδιας ειδικότητας για τη σύνδεση με το APC, καθώς και την πρόσδεση στα μόρια της IL-2 που υπάρχει στο μικροπεριβάλλον

Εκτός από τον πληθυσμό των $CD4^+CD25^+$ κυττάρων, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες ρυθμιστικών Τ κυττάρων, σε μικρότερη αναλογία και με λιγότερο γνωστές δράσεις. Πιο γνωστά είναι τα TH3 κύτταρα που δρουν μέσω της υψηλής παραγωγής TGF-β και ποικίλων ποσών IL-4 και IL-10 κατόπιν ενεργοποίησης με το κατάλληλο αντιγόνο ή μέσω του υποδοχέα CD3, καθώς και τα Tr1 κύτταρα που δρουν εκκρίνοντας μεγάλα ποσά IL-10 και χαμηλή ποσότητα IL-2. Εξάλλου, τα Τ κύτταρα που παρουσιάζουν ανέργεια εκφράζουν CTLA-4 σε υψηλή συγκέντρωση δρώντας ανοσοκατασταλτικά. Επίσης, έχουν εντοπιστεί φυσικά φονικά -Τ κύτταρα (NKT) με ανοσορυθμιστική δράση, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα Vα14 TCR και αναγνωρίζουν γλυκολιπιδικές δομές. Μία υποομάδα των *γδ* Τ κυττάρων με δυνατότητα έκκρισης κυτταροκινών παρόμοια με τα Tr1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή των ανοσολογικών απαντήσεων ενάντια σε όγκους.

Εκτός από τα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα, ανοσορυθμιστική δράση εμφανίζουν και ομάδες $CD8^+$ κυττάρων, πολλά από τα οποία είναι αρνητικά για το επιφανειακό μόριο συνδιέγερσης CD28, καθώς και διπλά αρνητικά $CD4^-CD8^-$ κύτταρα, που δρουν αναστέλλοντας την κυτταροτοξική δράση των CTL που παρουσιάζουν ειδικότητα για το ίδιο αντιγόνο. Η αναστολή αυτή δεν εξαρτάται από κυτταροκίνες, αλλά επιτυγχάνεται με απόπτωση μέσω του μορίου Fas.

Η παρουσία ρυθμιστικών Τ κυττάρων δεν περιορίζεται μόνο στο αντιγόνο για το οποίο παρουσιάζουν ειδικότητα, αλλά επεκτείνεται και σε ανοσολογικές απαντήσεις ενάντια σε άλλα αντιγόνα, που δεν παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με το αρχικό, αλλά εκφράζονται από το ίδιο κύτταρο (bystander suppression) [Bach, 2003].

Η ομοιόσταση των ρυθμιστικών κυττάρων στον οργανισμό, τουλάχιστον σε ότι αφορά στα $CD4^+CD25^+$, εξαρτάται από την παρουσία κυτταροκινών, κύρια IL-2, καθώς και από συνδιεγερτικά σήματα, όπως μέσω των CD28, B7 και CD40. Ο ρόλος της αντιγονικής διέγερσης στη διατήρηση των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων είναι μέχρι σήμερα αμφισβητούμενος.

1.5. Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες εκκρίνονται από ποικίλα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος και επιδρούν σε κύτταρα-στόχους, τα οποία έχουν στη μεμβράνη τους υποδοχείς για τη συγκεκριμένη κυτταροκίνη. Η δράση των κυτταροκινών δύναται να

είναι *αυτοκρινής*, δηλαδή να δεσμεύεται και να δρα στο ίδιο το κύτταρο από το οποίο εκκρίνεται, *παρακρινής*, δρώντας στα παρακείμενα κύτταρα αυτού που την εκκρίνει ή *ενδοκρινής*, επιδρώντας σε κύτταρα που εντοπίζονται σε μακρινά σημεία του οργανισμού. Η δέσμευση μιας κυτταροκίνης στον υποδοχέα της προκαλεί τη μετάδοση μιας αλληλουχίας σημάτων στο κυτταρόπλασμα, η οποία οδηγεί σε αλλαγές στη ρύθμιση και έκφραση γονιδίων.

Οι δράση των κυτταροκινών δύναται να είναι *πλειοτροπική*, δηλαδή να εγείρουν ποικίλες βιολογικές δράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων ή *κοινή (redundant)*, όπου διαφορετικές κυτταροκίνες επάγουν παρόμοιες λειτουργίες, καθιστώντας δύσκολη την απόδοση μιας δράσης σε μία καθορισμένη κυτταροκίνη. Δύο ή περισσότερες κυτταροκίνες μπορεί να εκδηλώνουν *συνεργιστική* δράση, κατά την οποία ο συνδυασμός τους επιδρά τους σε μία βιολογική δραστηριότητα κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το αποτέλεσμα να είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα της δραστηριότητας που θα επιτύγχανε κάθε κυτταροκίνη χωριστά. Στην αντίστροφη περίπτωση, εκδηλώνουν *ανταγωνιστική* δράση, όπου το αποτέλεσμα της σύνδεσης μίας κυτταροκίνης με τον υποδοχέα της αναστέλλει την επίδραση μίας άλλης. Συνήθως η απάντηση ενός κυττάρου στη σύνδεση μιας κυτταροκίνης με τον αντίστοιχο υποδοχέα είναι η ρύθμιση της έκφρασης άλλων υποδοχέων, καθώς και η έκκριση άλλων κυτταροκινών, με αποτέλεσμα τον επακόλουθο επηρεασμό και άλλων κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο, η ειδική για ένα αντιγόνο διέγερση ενός και μόνο λεμφοκυττάρου είναι ικανή να επηρεάσει μια ποικιλία κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αποτελεσματικής ανοσολογικής απάντησης.

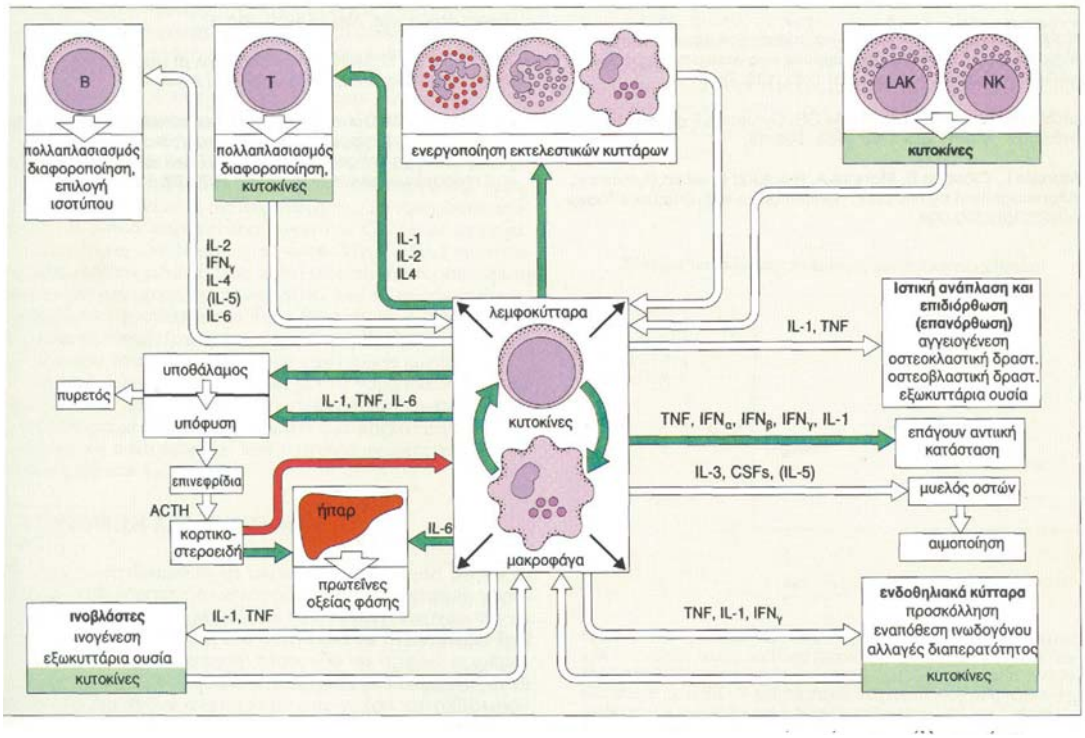
Δεδομένου ότι μια εκλυόμενη κυτταροκίνη αφενός διαχέεται στον περιβάλλοντα ιστό και αφετέρου εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, ο έλεγχος των κυττάρων στα οποία επιδρά, τόσο σε σχέση με τον κυτταρικό τύπο, όσο και σε σχέση με το χρόνο, επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της έκφρασης του είδους και του αριθμού των υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη. Σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι αρκετή η σύνδεση της κυτταροκίνης με τον υποδοχέα της, αλλά απαιτείται και επαφή των κυττάρων, οπότε η συγκέντρωση της κυτταροκίνης στην περιοχή της σύνδεσης (cell junction) αυξάνεται πολύ και δύναται να επηρεάσει το κύτταρο στόχο.

Οι κυριότερες κυτταροκίνες και οι βιολογικές τους δράσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (πηγή: www.copewithcytokines.de)

Κυτταροκίνη	Κύτταρα που την παράγουν	Βιολογική δράση
Ιντερφερόνη-γ (IFN-γ)	TH1 CTL	Αύξηση δραστικότητας μακροφάγων, CTL και φυσικών φονικών κυττάρων Αύξηση επιφανειακής έκφρασης των μορίων MHC Αύξηση της παραγωγής ανοσοσφαιρινών τάξης IgG
Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)	TH1 Ορισμένα CTL	Πολ/μός ευαισθητοποιημένων από αντιγόνο Th και CTL Μακρά επιβίωση αντιγονοειδικών Τ κυτταρικών κλώνων Αύξηση δραστικότητας NK κυττάρων και CTL
Ιντερλευκίνη-4 (IL-4)	TH2	Ενεργοποίηση και ανάπτυξη Β κυττάρων Αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II Αναστολή ανάπτυξης μακροφάγων Πολ/μός TH2
Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)	Μονοκύτταρα Ενδοθηλιακά κύτταρα Ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα	Επαγωγή ενεργοποίησης Τ λεμφοκυττάρων Επαγωγή διαφοροποίησης Β κυττάρων Σε συνεργασία με την IL-2, ωρίμανση των CTL Επαγωγή πολ/μού των θυμοκυττάρων
Ιντερλευκίνη-7 (IL-7)	Στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών και θύμου αδένα	Ανάπτυξη θυμοκυττάρων Διαφοροποίηση και ωρίμανση Β προγονικών κυττάρων Αύξηση έκφρασης IL-2 και IL-2R από τα Τ κύτταρα
Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)	TH2	Αναστολή παραγωγής κυτταροκινών από τα TH1 και τα μακροφάγα Αύξηση έκφρασης μορίων MHC τάξης II
Ιντερλευκίνη-12 (IL-12)	Λεμφοκύτταρα	Αύξηση παραγωγής κυτταροκινών από TH1 Αναστολή παραγωγής κυτταροκινών από TH2 Αύξηση κυτταρολυτικής δράσης NK κυττάρων Ενεργοποίηση μυελοποίησης
Ιντερλευκίνη-13 (IL-13)	TH2 Ενεργοποιημένα Th $CD8^+$ Τ κύτταρα	Αναστολή δραστικότητας μακροφάγων Αύξηση πολ/μού και διαφοροποίησης Β κυττάρων Αύξηση της επαγόμενης από την IL-2 LAK δραστικότητας
Ιντερλευκίνη-15 (IL-15)	Μακροφάγα Μονοκύτταρα Στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών Ενδοθήλιο θύμου αδ.	Επαγωγή πολ/μού και επιβίωσης $CD8^+$ και TCR$\gamma\delta$ Τ και NKT κυττάρων Ρύθμιση αιμοποίησης Επαγωγή πολ/μού, ενεργοποίησης και λειτουργίας φυσικών φονικών κυττάρων
Ιντερλευκίνη-18 (IL-18)	Μονοκύτταρα, DC Μακροφάγα, λεμφοκύτταρα	Επαγωγή αύξησης και διαφοροποίησης TH1 Επαγωγή έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών
Ιντερλευκίνη-21 (IL-21)	Ενεργοποιημένα Th	Επαγωγή TH2 τύπου ανοσοαπόκρισης Πολ/μός Β κυττάρων, Ρόλος στην ενεργοποίηση των NK
Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α)	TH1 Ορισμένα TH2 Ορισμένα CTL Μακροφάγα	Κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα Αύξηση παραγωγής κυτταροκινών από ποικίλα κύτταρα κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση
Παράγοντας νέκρωσης όγκων-β (TNF-β)	TH1 CTL	Κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα Αύξηση φαγοκυτταρικής δράσης σε μακροφάγα και ουδετερόφιλα
Παράγοντας μεταβολής της αύξησης-β (TGF-β)	Μακροφάγα Λεμφοκύτταρα Αιμοπετάλια	Χημειοτακτισμός σε μονοκύτταρα και μακροφάγα Αναστολή πολ/μού σε λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα Περιορισμός φλεγμονώδους αντίδρασης και επαγωγή επούλωσης πληγών
Παράγοντας ενεργοποίησης κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF)	TH1 ΟρισμέναTH2 Ορισμένα CTL	Διαφοροποίηση μονοκυττάρων σε δενδριτικά κύτταρα Πολ/μός μακροφάγων, δενδριτικών και κοκκιοκυττάρων Διαφοροποίηση Β κυττάρων Αναστολή ανάπτυξης Τ κυττάρων

Ο ρόλος των κυτταροκινών στο ανοσολογικό σύστημα παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 1.14 [Roit et al, 1995].

Εικόνα 1.14 Οι φυσιολογικοί ρόλοι του δικτύου των κυτοκινών



1.6. Μοντέλα ενεργοποίησης των κυττάρων του ειδικού κλάδου του ανοσοποιητικού συστήματος

1.6.1. Κλασικό μοντέλο διάκρισης εαυτού από μη εαυτό

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο αναγνώρισης του τύπου «εαυτό-μη εαυτό», τα ειδικά για εαυτά αντιγόνα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζονται και καταστρέφονται κατά την ωρίμανσή τους στο θύμο αδένα, προστατεύοντας κατ' αυτό τον τρόπο τον οργανισμό από την ανοσολογική απάντηση ενάντια σε δικά του αντιγόνα και συνεπώς από την καταστροφή των κυττάρων του.

Αναλυτικότερα, ο τυχαίος ανασυνδυασμός των εξωνίων κατά το σχηματισμό του TCR, οδηγεί σε μία τεράστια ποικιλία υποδοχέων αντιγόνων. Κάποιοι από αυτούς αναγνωρίζουν εαυτά μόρια και καταστρέφονται μέσω της θετικής και της αρνητικής επιλογής των ανώριμων λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα. Συγκεκριμένα, με τη θετική επιλογή επιβιώνουν τα Τ κύτταρα που αναγνωρίζουν τα εαυτά μόρια

MHC και έχουν μικρή ή μέτρια ισχύ σύνδεσης με τα εαυτά αντιγόνα, ενώ με την αρνητική επιλογή καταστρέφονται τα κύτταρα που εμφανίζουν TCR που δύναται να προσδεθεί ισχυρά με εαυτά μόρια. Τα κύτταρα που επιβιώνουν δεν ξεπερνούν το 10%, ενώ τα υπόλοιπα πεθαίνουν με απόπτωση.

Εκτός από το κλασικό μοντέλο ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος, έχουν προταθεί και εναλλακτικά μοντέλα, τα οποία με τις τροποποιήσεις τους καλούνται να δώσουν εξηγήσεις για τις διαφορετικές ανοσολογικές απαντήσεις σε φαινόμενα όπως η αυτοανοσία, η απόρριψη μοσχεύματος και η απόρριψη όγκου. Κοινό σημείο σε όλα τα μοντέλα αποτελεί η σημασία των συνδιεγερτικών μορίων στην επιφάνεια των APC.

1.6.2. Μοντέλο «εντόπισης-δόσης-χρόνου»

Σύμφωνα με τον Zinkernagel, ένα αντιγόνο, ανεξάρτητα της προέλευσής του, για να είναι ανοσογονικό θα πρέπει να φτάνει στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα (σπλήνα ή λεμφαδένες) σε ορισμένη συγκέντρωση και για δεδομένο χρόνο. Αντιγόνα που διέρχονται πολύ γρήγορα, σε μεγάλα ποσά ή για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλούν απενεργοποίηση όλων των ειδικών Τ λεμφοκυττάρων. Για το λόγο αυτό, με εξαίρεση τις λευχαιμίες και τα λεμφώματα, όλοι οι άλλοι τύποι καρκίνου δεν είναι ανοσογονικοί, διότι παραμένουν σταθερά στους περιφερικούς ιστούς και συνεπώς αγνοούνται από το ανοσολογικό σύστημα.

1.6.3. Μοντέλο «αναγνώρισης δομής (pattern) από υποδοχείς»

Κατά τους Medzhitov και Janeway, η ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης είναι απαραίτητη για την επαγωγή της ειδικής. Όταν τα κύτταρα του μη ειδικού κλάδου του ανοσολογικού συστήματος αναγνωρίζουν συντηρημένες μοριακές δομές σχετιζόμενες με μικροβιακά παθογόνα, μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης δομών (pattern recognition receptors, PRRs), παρέχουν συνδιεγερτικά σήματα. Με τον τρόπο αυτό, η μη ειδική ανοσολογική απάντηση είναι υπεύθυνη για την αύξηση της επιφανειακής έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων από τα APC. Τα εαυτά αντιγόνα δεν αναγνωρίζονται από τους PRRs, δεν επάγεται η έκφραση συνδιεγερτικών μορίων από τα APC και συνεπώς δεν είναι δυνατή η σωστή ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και προκαλείται ανέργεια. Το μοντέλο αυτό αποτελεί τροποποίηση του κλασικού μοντέλου όσον αφορά στο γεγονός ότι η

διάκριση «εαυτό-μη εαυτό» γίνεται μέσω του μη ειδικού κλάδου του ανοσολογικού συστήματος.

1.6.4. Μοντέλο «κινδύνου»

Η Matzinger προτείνει ότι το ανοσολογικό σύστημα ενεργοποιείται με βάση τον πιθανό κίνδυνο για βλάβη των ιστών. Κατ' αυτό τον τρόπο, τα κατεστραμμένα κύτταρα, ανεξάρτητα από την αιτία που προκάλεσε την πίεση (stress) ή την καταστροφή τους, επάγουν την ανοσολογική απάντηση παρέχοντας ένα σήμα κινδύνου. Η βάση του μοντέλου αυτού είναι συμβατή με του προαναφερθέντος όσον αφορά στην ιδέα ότι η μη ειδική ανοσολογική απάντηση ενεργοποιεί την ειδική με τη συμμετοχή ειδικών μορίων. Τα μόρια όμως αυτά δεν είναι απαραίτητο να είναι αλλογενή ή μικροβιακά, αλλά δύνανται να είναι εαυτά μόρια, τα οποία απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα

Βιβλιογραφία γενικής εισαγωγής:

1.1. Perez et al, 2003; Roit et al, 1995

1.2. Hennecke et al, 2001; Kaech et al, 2002; Kuby, 1992; McLellan et al, 2000; Roit et al, 1995

1.3. Carbone et al, 1998; Davis, 1995; Hennecke et al, 2001; Janeway et al, 2001; Lechler et al, 1996; Rammensee et al, 1995; Reimann, et al, 1999; Renner et al, 2000; Seliger et al, 2000; Valitutti et al, 1995; Van den Eynde et al, 2001

1.4. Bach, 2003; Bennett et al, 1997; D'Elios et al, 1998; Geginat et al, 2003; Groux, 2001; Hurwitz et al, 2000; Janeway et al, 2001; Kaech et al, 2002; Kunzendorf et al, 1998; O' Garra et al, 2000; Ossendorp et al, 2000; Read et al, 2001; Renner et al, 2000; Roit et al, 1995; Sakaguchi, 2000; Sprent et al, 2001; Tuma et al, 2002

1.5. Fehniger et al, 2001; Janeway et al, 2001; Kuby, 1992; Renner, 2000; Roit et al, 1995

1.6. Matzinger, 1994; Medzhitov et al, 1998; Roit et al, 1995; Zinkernagel, 2000

2. ΕΙΔΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Παρά τις προόδους των κλασικών θεραπευτικών στρατηγικών για τον καρκίνο, η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών υποτροπιάζει και καταλήγει. Η ανάγκη για την αντιμετώπιση της νόσου με εναλλακτικό τρόπο οδήγησε στην ανάπτυξη ανοσοθεραπευτικών μεθόδων. Η ιδέα της ανοσοθεραπείας του καρκίνου έγινε γνωστή στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα, όταν ο William Coley χρησιμοποίησε ζωντανά στελέχη του πυογενούς βακτηρίου *Streptococcus erysipelas* με σκοπό τη δημιουργία γενικευμένης ανοσολογικής απάντησης, μέρος της οποίας να κατευθυνθεί ενάντια σε όγκους σαρκώματος [Coley, 1893]. Οι σποραδικές θετικές αποκρίσεις που παρατήρησε οφείλονταν κατά πάσα πιθανότητα σε ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης από τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που προκάλεσαν τα βακτήρια. Για να επαχθεί όμως ειδική ανοσολογική απάντηση ενάντια σε όγκους απαιτείται να χαρακτηριστούν στα καρκινικά κύτταρα συγκεκριμένα αντιγόνα, ώστε να δύναται το ανοσολογικό σύστημα να τα αναγνωρίσει ως στόχους. Συνεπώς, το πρώτο βήμα στην προσπάθεια για ανοσοθεραπεία του καρκίνου είναι η απομόνωση αντιγόνων που εκφράζουν τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία κατά προτίμηση να μην εκφράζονται από τους φυσιολογικούς ιστούς ώστε να αποφευχθεί η αυτοάνοση απάντηση.

2.1. Τα βήματα που οδήγησαν στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Η ανακάλυψη μορίων-δεικτών σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα από τους Gold και Freedman ήταν ο ακρογωνιαίος λίθος στην πορεία για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Τα αντιγόνα που απομόνωσαν [Tumor Associated Antigens (TAA), καρκινικά αντιγόνα] εκφράζονταν σε ποικίλα καρκινώματα γαστρεντερικής προέλευσης [Gold et al, 1965]. Η ταυτοποίηση κοινών για διάφορες νεοπλασίες αντιγόνων, τα οποία δεν εκφράζονταν από φυσιολογικά κύτταρα έθεσαν τη βάση για αντιγόνο-ειδική ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Λίγο αργότερα, οι Burnet και Tomas, ανεξάρτητα, έθεσαν καθορισμένο επιστημονικό σκεπτικό για την πιθανή συμμετοχή του ανοσολογικού συστήματος στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Ο πρώτος θέσπισε τον όρο «ανοσολογική επίβλεψη» (immunosurveillance) και θεώρησε ότι η απάντηση του ανοσολογικού συστήματος ενάντια στον όγκο οφείλεται στη διάκριση ανάμεσα σε εαυτό και μη-εαυτό, ενώ ο δεύτερος την αιτιολόγησε ως πρωτογενή άμυνα στη

νεοπλασία [βλέπε ανασκόπηση στην αναφορά Smyth et al 2001]. Ακολούθως, ο Hellstrom παρατήρησε ότι λεμφοκύτταρα και αντισώματα από ασθενείς με διαφόρους τύπους όγκων είχαν κυτταροτοξική δράση ενάντια σε αυτόλογα καρκινικά κύτταρα, χωρίς όμως η ανοσολογική αυτή απόκριση να είναι αρκετή για την απόρριψη του όγκου [Hellstrom et al, 1968]. Τέλος, η ικανότητα απομόνωσης των διαφορετικών τύπων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, επέτρεψε την ταυτοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων ως τον δραστικό πληθυσμό με την ισχυρότερη αντικαρκινική αντίδραση [Wybran et al, 1974].

Τα βήματα που προαναφέρθηκαν αποτέλεσαν την απαρχή της προσπάθειας για in vivo απόρριψη των καρκινικών κυττάρων. Για πολλά χρόνια όμως, η έλλειψη σημαντικής απόκρισης των ασθενών στις ανοσοθεραπευτικές μεθόδους, οδήγησε στην άποψη ότι αυτές δεν ήταν κατάλληλες για μια ασθένεια όπως ο καρκίνος. Δραστική αλλαγή στην αντιμετώπιση αυτή προκάλεσαν ο Boon και οι συνεργάτες του, επιτυγχάνοντας να κλωνοποιήσουν το πρώτο καρκινικό αντιγόνο, αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ότι όντως τα καρκινικά κύτταρα δύνανται να διαφέρουν από τα αυτόλογα υγιή όσον αφορά στο φαινότυπο και έτσι να αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα [van der Bruggen et al, 1991]. Το εύρημα αυτό έδωσε το έναυσμα για την ταυτοποίηση πληθώρας καρκινικών αντιγόνων και έθεσε τις βάσεις για την ανάπτυξη ενεργητικής ανοσοθεραπευτικής αντιμετώπισης (εμβόλια) για τον καρκίνο..

Η πρόοδος που έχει συντελεστεί στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου τα τελευταία 20 έτη μπορεί να ανακεφαλαιωθεί μέσα από τέσσερα βασικά ερωτήματα, που έθεσε ο Rosenberg [Rosenberg, 2001b].

- *Ο χειρισμός του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να προκαλέσει υποχώρηση του όγκου;* Ακόμα και απλοί χειρισμοί, όπως η συστηματική χορήγηση κυτταροκινών, για παράδειγμα της IL-2, μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της καρκινικής μάζας και σε ορισμένους ασθενείς ακόμα και εξάλειψή της. Δυστυχώς, τα ποσά των κυτταροκινών που απαιτούνται για την εξάλειψη των όγκων, στις περισσότερες περιπτώσεις είναι τοξικά για τον οργανισμό.
- *Ποια αντιγόνα αναγνωρίζονται στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα;* Όπως θα δούμε αναλυτικά στη συνέχεια, υπάρχει πληθώρα αντιγόνων στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ύπαρξή τους υποδεικνύει το γεγονός ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στην απόκριση σε μολυσματικούς παράγοντες και στον καρκίνο.

- *Μπορεί η ανοσοποίηση να δημιουργήσει ειδικά για τον όγκο Τ λεμφοκύτταρα;* Ειδικά για τα καρκινικά αντιγόνα Τ λεμφοκύτταρα είναι δυνατό να δημιουργηθούν με ποικιλία πρωτοκόλλων εμβολιασμού. Τα λεμφοκύτταρα αυτά δύνανται να είναι βοηθητικά, κυτταροτοξικά ή και οι δύο κατηγορίες.
- *Ποιοι μηχανισμοί οδηγούν στη διαφυγή του όγκου από την ανοσολογική επιτήρηση;* Οι μηχανισμοί αυτοί, όπως αναλύονται εκτενέστερα στη συνέχεια, μπορεί να οφείλονται στα Τ λεμφοκύτταρα, όπως ανεπαρκείς αριθμοί, λανθασμένο ισοζύγιο CD4 και CD8 λεμφοκυττάρων, ανέργεια, μείωση της παρουσίας μορίων TCR στην επιφάνεια και αυξημένη απόπτωση ή να οφείλονται στον ίδιο τον όγκο, όπως παραγωγή ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, απώλεια των μορίων του MHC από την επιφάνειά τους και έλλειψη ενδοκυτταρικών μονοπατιών απόπτωσης.

2.2. Καρκινικά αντιγόνα αναγνωριζόμενα από τα Τ λεμφοκύτταρα

Η προσέγγιση της ανοσοθεραπείας του καρκίνου που στηρίζεται στη δημιουργία ανοσολογικής απάντησης ενάντια στα καρκινικά αντιγόνα, βασίστηκε στην διαπίστωση ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές στην έκφραση γονιδίων ή/και μοριακές διαφοροποιήσεις συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα [Moingeon, 2001]. Τα καρκινικά αντιγόνα μπορούν να προκύψουν από φυσιολογικά αντιγόνα που εκφράζονται σε λάθος ιστό, λάθος αναπτυξιακό στάδιο ή λάθος ποσότητα (γονιδιακή ενίσχυση), από σημειακές μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες και από λάθος μετά-μεταφραστικό έλεγχο έκφρασης ή μεταβολή του πλαισίου ανάγνωσης [Rosenberg, 2001b].

Μέχρι πρόσφατα, δεδομένου ότι η κύρια προσέγγιση της ανοσοθεραπείας του καρκίνου βασιζόταν κύρια στο ρόλο των CD8 κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, τα καρκινικά αντιγόνα που είχαν αναγνωριστεί αφορούσαν σε πεπτίδια με ικανότητα σύνδεσης σε μόρια του MHC τάξης Ι, που αναγνωρίζουν τα κύτταρα αυτά. Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα είναι ικανά να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα και να μειώνουν τη μάζα του όγκου τόσο στα πειραματόζωα, όσο και σε κλινικές δοκιμές. Μόλις τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να δίνεται προσοχή στα βοηθητικά CD4 λεμφοκύτταρα, με συνέπεια την προσπάθεια ταυτοποίησης αντιγόνων αναγνωριζόμενων από αυτά, δεδομένου ότι έχει πλέον αποδειχθεί ο σημαντικό ρόλος των CD4 λεμφοκυττάρων στην ευαισθητοποίηση και τη διατήρηση της ανοσολογικής απόκρισης, ακόμα και σε όγκους που δεν εκφράζουν μόρια του MHC τάξης ΙΙ.

2.2.1. Μέθοδοι ταυτοποίησης καρκινικών αντιγόνων

Τέσσερις είναι οι κύριες τεχνικές για την ταυτοποίηση καρκινικών αντιγόνων. Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε αρχικά από την ομάδα του T. Boon [van der Bruggen et al, 1991] ήταν η γενετική τροποποίηση (transfecting) κυττάρων-στόχων, τα οποία εξέφραζαν τα κατάλληλα μόρια του MHC, με βιβλιοθήκες ανασυνδυασμένου DNA από καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας Τ λεμφοκύτταρα που είχαν την ικανότητα καταστροφής του αντίστοιχου όγκου, εξέταζαν ποια από τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα καταστρέφονταν και χρησιμοποιούσαν το αντίστοιχο συμπληρωματικό DNA για την παραγωγή του πεπτιδίου. Πρόκειται για απλή και αξιόπιστη μέθοδο με την οποία δύνανται να ταυτοποιηθούν μόνο αντιγόνα που προσδένονται σε μόρια MHC τάξης Ι, τα οποία ακολουθούν το ενδοκυττάριο μονοπάτι παρουσίασης. Μέγιστο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι θα πρέπει να καθοριστεί πριν τον έλεγχο της βιβλιοθήκης ανασυνδυασμένου DNA το μόριο του MHC που επιθυμούμε να προσδεθεί το πεπτίδιο. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιήθηκε το καρκινικό αντιγόνο MAGE1 [Traversari et al, 1992].

Παραλλαγή της τεχνικής αυτής από την ομάδα του Rosenberg επέτρεψε την απομόνωση αντιγόνων ειδικών και για μόρια που προσδένονται σε μόρια MHC τάξης ΙΙ και αναγνωρίζονται από τα Th λεμφοκύτταρα. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν φορείς που κωδικοποιούν αλληλουχίες της αμετάβλητης αλυσίδας (Ii) μετά από σύντηξη με cDNA βιβλιοθήκες καρκινικών κυττάρων. Η αλληλουχία της Ii σε αυτούς τους φορείς είναι σχεδιασμένη να μεταφέρει τις μεταφραζόμενες πρωτεΐνες στο μονοπάτι έκφρασης των μορίων MHC τάξης ΙΙ. Στη συνέχεια, γίνεται γενετική τροποποίηση βακτηρίων με τις βιβλιοθήκες αυτές και Τ λεμφοκύτταρα ειδικά για τον αντίστοιχο όγκο χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των πιθανών καρκινικών αντιγόνων [Wang et al, 1999b].

Με δεδομένο ότι τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν πεπτίδια μόνο όταν βρίσκονται συνδεδεμένα στα μόρια του MHC, ο H-G Rammensee και η ομάδα του [Cox et al, 1996] έκαναν εκχύλιση πεπτιδίων καρκινικών αντιγόνων με τη χρήση οξέως από την επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων ή από απομονωμένα σύμπλοκα πεπτιδίων-μορίων του MHC τάξης Ι και στη συνέχεια τα διαχώρισαν με υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία (high-pressure liquid chromatography, HPLC). Τα προκύπτοντα με αυτό τον τρόπο πεπτίδια συνδέονται με τα επιφανειακά μόρια κατάλληλων APC και ελέγχονται για την ικανότητα ενεργοποίησης ειδικών για τον όγκο $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια γίνεται καθαρισμός των πεπτιδίων αυτών και η

αμινοξική τους αλληλουχία καθορίζεται με αποσύνθεση τύπου Edman ή κυκλική φασματοφωτομετρία μάζας. Αναζήτηση των πεπτιδίων σε βάσεις δεδομένων οδηγεί στον καθορισμό της μητρικής πρωτεΐνης και του αντίστοιχου γονιδίου. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελούν οι τεχνικές δυσκολίες καθορισμού της αμινοξικής αλληλουχίας από τις πολύ μικρές ποσότητες δραστικών πεπτιδίων που απομονώνονται από την επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Εξάλλου, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση καρκινικών αντιγόνων συνδεόμενων με μόρια MHC τάξης Ι.

Εναλλακτικά, η αναφερόμενη ως «αντίστροφη ανοσολογία» (reverse immunology), έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, αρχικά από την ομάδα του R. Kiessling [Blake et al, 1996], για τον έλεγχο αν πιθανές πρωτεΐνες, επιλεγμένες λόγω της υπερέκφρασής τους από τα καρκινικά κύτταρα, αντιπροσωπεύουν καρκινικά αντιγόνα. Κατασκευάζονται συνθετικές βιβλιοθήκες πεπτιδίων βασιζόμενες στα δομικά μοτίβα σύνδεσης των πεπτιδίων με κάθε είδος μορίου του MHC. Η επιλογή των κατάλληλων πεπτιδίων προς σύνθεση πραγματοποιείται με τη βοήθεια βάσεων δεδομένων (βλέπε αναλυτικά στο τμήμα «Υλικά και Μέθοδοι»). Οι πιο γνωστές βάσεις δεδομένων είναι οι SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) και BIMAS (www-bimas.dcrt.nih.gov/molbiol/hla_bind/), ενώ στη συνέχεια απαιτείται έλεγχος της δυνατότητας φυσικής δημιουργίας των πεπτιδίων που προκύπτουν, μέσω του πρωτεασώματος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι (βλέπε αναλυτικά στο τμήμα «Υλικά και Μέθοδοι»), που παρέχονται σε βάσεις δεδομένων όπως οι PAPROC (www.paproc.de) και NETCHP (www.cbs.dtu.dk) [Schirle et al, 2001]. Τα παραγόμενα πεπτίδια χρησιμοποιούνται για in vitro ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων. Αν τα κύτταρα που παράγονται είναι δραστικά ενάντια στον αντίστοιχο όγκο, η πρωτεΐνη θεωρείται καρκινικό αντιγόνο. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να αναγνωριστούν ως καρκινικά αντιγόνα και μη ειδικά αντιδρώντα (cross-reactive) πεπτίδια. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος τόσο της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν ειδικά για τον όγκο λεμφοκύτταρα, όσο και της φυσικής παρουσίασής τους από τα καρκινικά κύτταρα.

Η ορολογική ανάλυση βιβλιοθηκών ανασυνδυασμένου DNA είναι μια νέα σχετικά τεχνική, γνωστή ως SEREX (serologic analysis of recombinant cDNA expression libraries), η οποία πρωτοχρησιμοποιήθηκε από ην ομάδα του T. Strong [Hampton et al, 2000]. Βασίζεται στο γεγονός ότι αφενός στον ορό πολλών ασθενών υπάρχουν αντισώματα ειδικά τόσο για επιφανειακά όσο και για ενδοκυττάρια

καρκινικά αντιγόνα και αφετέρου ότι η παραγωγή αντισωμάτων απαιτεί την ύπαρξη βοηθητικών Τ κυττάρων. Κατ' αυτό τον τρόπο, ορός αίματος ασθενών χρησιμοποιείται για την ανίχνευση (μέσω σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος) πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από βιβλιοθήκες ανασυνδυασμένου DNA καρκινικών κυττάρων εκφρασμένες σε προκαρυωτικά κύτταρα. Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της φυσικής παρουσίασης του αντιγόνου από τα κύτταρα του όγκου και της ικανότητας αυτού να προκαλεί την ενεργοποίηση ειδικών για τον όγκο Τ λεμφοκυττάρων. Με το SEREX ταυτοποιήθηκαν καρκινικά αντιγόνα όπως τα ήδη γνωστά MAGE και BAGE και νέα όπως τα NY-ESO-1 και SSX2. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση νέων αντιγόνων οροί αίματος ασθενών που λαμβάνουν πειραματικά εμβόλια [Wang et al, 1999a και Rosenberg, 2001a].

2.2.2. Κατηγορίες καρκινικών αντιγόνων

Τα καρκινικά αντιγόνα μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες, αν και στη βιβλιογραφία είναι δυνατόν να βρεθούν και παραλλαγές στον τρόπο κατάταξης:

- *Αντιγόνα διαφοροποίησης*, τα οποία εκφράζονται αποκλειστικά σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως για παράδειγμα το Melan-A/MART-1, η gp100 και η τυροσινάση, τα οποία εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα μελανώματος και σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα αλλά όχι σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς. Τα αντιγόνα διαφοροποίησης προσφέρουν το πλεονέκτημα ότι εκφράζονται στην πλειονότητα των ασθενών με τον αντίστοιχο τύπο καρκίνου και συνεπώς είναι δυνατή η δημιουργία πρωτοκόλλων θεραπείας με ευρεία εφαρμογή. Λόγω όμως του μηχανισμού αυτο-ανοχής (self tolerance) τα ειδικά για τα αντιγόνα αυτά Τ λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν πολύ χαμηλή συγγένεια με τα αντίστοιχα σύμπλοκα πεπτιδίου-μορίου MHC [Topalian, 2001].
- *Καρκινικά αντιγόνα βλαστικής σειράς* (cancer-testis antigens), τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που είναι σιωπηλά σε όλους τους ενήλικες ιστούς, με εξαίρεση τα κύτταρα της σπερματικής σειράς στους άρρενες, τα οποία όμως δεν εκφράζουν μόρια του MHC, με συνέπεια να μην καταστρέφονται από τα ειδικά για αυτά λεμφοκύτταρα. Τα αντιγόνα αυτά (π.χ. MAGE, BAGE, NY-ESO-1) εκφράζονται σε ποικίλους τύπους καρκίνου, όπως το μελάνωμα, οι όγκοι του πνεύμονα, της κεφαλής και του λαιμού και τα καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως.

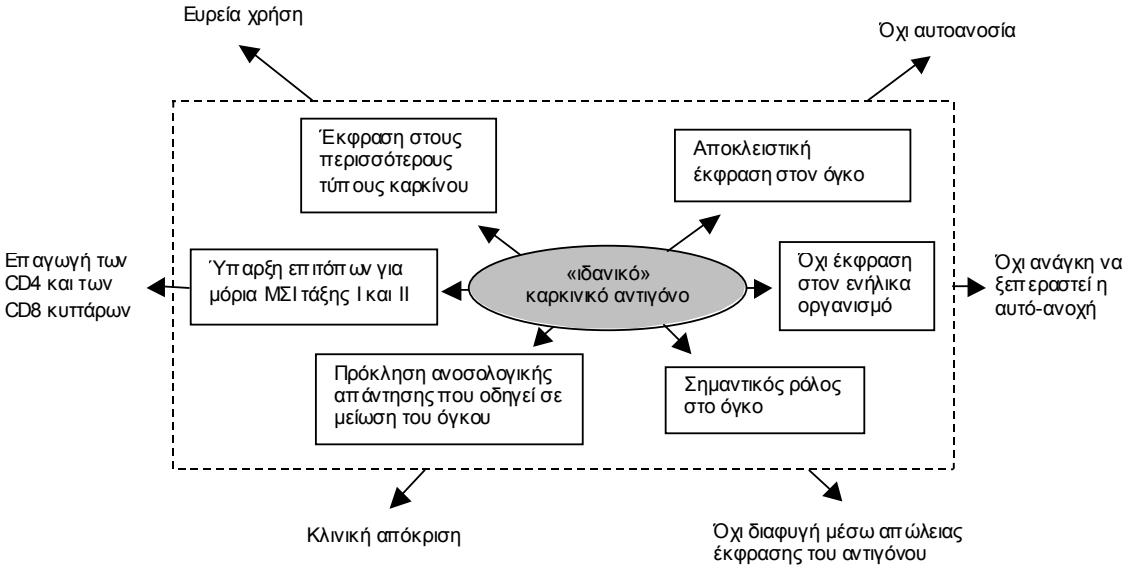
- *Μεταλλαγμένα αντιγόνα*, τα οποία στη φυσιολογική τους δομή εντοπίζονται σε ποικίλους ιστούς, αλλά η μεταλλαγμένη τους μορφή απαντάται μόνο σε καρκινικά κύτταρα. Πρόκειται για σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες δημιουργούν αντιγόνα ειδικά για τον κάθε ασθενή ή ακόμα και για την κάθε μετάλλαξη, με την εξαίρεση λίγων μόνο μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί σε μικρό αριθμό διαφορετικών ασθενών. Παραδείγματα αποτελούν η p53, το Ras, η κασπάση-8 και το BCR-abl.
- *Υπερεκφραζόμενα αντιγόνα*, τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα σε μεγαλύτερα ποσά απ' ότι στους φυσιολογικούς ιστούς, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες HER-2/neu, MUC-1, το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο και η α-εμβρυϊκή σφαιρίνη. Δεδομένου ότι εκφράζονται σε κάποιο ποσοστό και στα φυσιολογικά κύτταρα, ο ακριβής τους χαρακτηρισμός δεν είναι «καρκινικά αντιγόνα», αλλά «καρκινικά-σχετιζόμενα αντιγόνα».

Ορισμένοι ερευνητές ως ξεχωριστές κατηγορίες καρκινικών αντιγόνων θεωρούν τις μουκίνες και τα ιικά αντιγόνα. Οι μουκίνες στα φυσιολογικά κύτταρα παρουσιάζονται γλυκοζυλιωμένες σε πολύ μεγάλο βαθμό, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα ορισμένων τύπων όγκων του μαστού, των ωοθηκών και του παγκρέατος, με αποτέλεσμα να μπορούν να προκαλέσουν την ειδική αντίδραση των λεμφοκυττάρων. Τα αντιγόνα εξάλλου που προέρχονται από ογκογόνους ιούς σχετίζονται με μορφές κακοήθειας, όπως για παράδειγμα ο ιός Epstein-Barr με το λέμφωμα τύπου Burkitt [Boon et al, 1997]

Παρότι μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δεκάδες καρκινικά αντιγόνα, για τα περισσότερα από αυτά δεν έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος, όταν χρησιμοποιηθούν σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το ίδιο το αντιγόνο δεν είναι ανοσογονικό ή στο ότι η μέθοδος χορήγησής του δεν είναι η κατάλληλη. Παρόλα αυτά, ορισμένες ερευνητικές ομάδες προτείνουν τη διάκριση ανάμεσα στα αντιγόνα που δεν φαίνεται να προκαλούν αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος και τα ονομάζουν «αντιγόνα καρκίνου» και σε αυτά που μπορούν να την προκαλέσουν και τα ονομάζουν «αντιγόνα απόρριψης του καρκίνου» [Schultze et al, 2001].

2.3. Ιδιότητες που καθιστούν ένα καρκινικό αντιγόνο υποψήφιο για χρήση σε εμβόλια κατά του καρκίνου

Όπως προαναφέρθηκε, η ταυτοποίηση καρκινικών αντιγόνων δε συνεπάγεται και τη δυνατότητα χρήσης τους για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Θα πρέπει να πληρούν αρκετές επιπλέον προϋποθέσεις. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού καρκινικού αντιγόνου παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα [Schultze et al, 2001]:



Εικόνα 2.1 Διάγραμμα χαρακτηριστικών του ιδανικού καρκινικού αντιγόνου [Βασισμένο στο Schultze et al, 2001].

2.4. Σύνδεση των καρκινικών αντιγόνων στα μόρια MHC

Η επαγωγή των $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ κυττάρων από τα καρκινικά αντιγόνα εξαρτάται από την ισχύ σύνδεσής του με το μόριο MHC που θα το παρουσιάσει και στη συνέχεια, από την προκύπτουσα συγγένεια του συμπλόκου πεπτίδιο/μόριο MHC με τον TCR του ειδικού για το πεπτίδιο Τ κυττάρου.

Τροποποίηση των πεπτιδίων, που οδηγεί στην ισχυρότερη πρόσδεση των πεπτιδίων στο επιθυμητό μόριο MHC δύνανται να βελτιώσουν την ανοσογονικότητά τους. Οι πιθανές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την αύξηση της ισχύος πρόσδεσης του πεπτιδίου με το μόριο MHC, η οποία μπορεί να επιτευχθεί αφενός με την υποκατάσταση αμινοξέος στη θέση πρόσδεσης και αφετέρου με την ταυτόχρονη βελτίωση της πρόσδεσης και τη σταθεροποίηση του συμπλόκου με την τοποθέτηση αρωματικού αμινοξέος σε μία από τις θέσεις 1, 4 ή 5. Είναι επίσης δυνατή η αναστολή της πρωτεολυτικής αποδιάταξης του συμπλόκου με ακετυλίωση ή αμίνωση

του άκρου του πεπτιδίου, καθώς και η μείωση του διμερισμού με υποκατάσταση των καταλοίπων κυστεΐνης. Τέλος μπορεί να αυξηθεί η ενεργοποίηση του TCR με τροποποίηση της αμινοξικής αλληλουχίας του TCR στο σημείο αλληλεπίδρασης [Parmiani, 2002].

2.5. Ανοσοενισχυτικά

Ανοσοενισχυτικά (adjuvants) ονομάζονται ποικίλοι παράγοντες οι οποίοι αναμιγνύονται με ένα αντιγόνο και ενισχύουν την ανοσολογική απάντηση μετά την ανοσοποίηση. Τα ανοσοενισχυτικά ενεργοποιούν τα APC ώστε να ευαισθητοποιούν τα Τ κύτταρα πιο αποτελεσματικά, ενεργοποιούν επίσης τα φυσικά φονικά κύτταρα και άλλα κύτταρα του μη ειδικού κλάδου του ανοσοποιητικού συστήματος να παράγουν κυτταροκίνες ενώ τέλος επάγουν την επιβίωση των ειδικών για το αντιγόνο Τ λεμφοκυττάρων.

Ως ανοσοενισχυτικά έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία αρκετές κυτταροκίνες, όπως η IL-2, ο GM-CSF, η IL-12 και η IL-4, καθώς και προϊόντα βακτηριακών κυττάρων, με κυριότερο το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) από θετικά κατά Gram βακτήρια και το μονο-φωσφορυλο-λιπίδιο Α (MPL) από Σαλμονέλα. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι ισχυρή ανοσοενισχυτική δραστικότητα έχει το βακτηριακό DNA, εξαιτίας της παρουσίας σε αυτό μη μεθυλιωμένων δινουκλεοτιδίων τύπου CpG. Τα βακτηριακά αυτά προϊόντα προσδένονται σε πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς των DC, των μακροφάγων και ίσως των φυσικών φονικών κυττάρων και άλλων κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας [Finn, 2003]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins), ένα φυσικό ανοσοενισχυτικό, παρουσιάζονται πολλά υποσχόμενες για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν ευρύ φάσμα πεπτιδίων, ενώ επάγουν την παρουσίαση αυτών από μόρια MHC τάξης Ι των DC, καθώς και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα [Pardoll, 1998].

Δεδομένου ότι η παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων στα $CD4^+$ και τα $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα ελέγχεται από διαφορετικό μονοπάτι επεξεργασίας και παρουσίασης στα APC (εξωκυττάριο για τα $CD4^+$ και ενδοκυττάριο για τα $CD8^+$), διαφορετικά ανοσοενισχυτικά προωθούν την επεξεργασία των αντιγόνων σε καθορισμένο μονοπάτι. Όλα τα ανοσοενισχυτικά, εκτός από τα νουκλεϊκά οξέα, ωθούν κυρίως την εξωκυττάρια οδό παρουσίασης. Δύο ομάδες ανοσοενισχυτικών κατευθύνουν αποτελεσματικά τα αντιγόνα στο κυτταρόπλασμα, το ενδοκυττάριο μονοπάτι

επεξεργασίας και συνεπώς στην παρουσίαση μέσω μορίων MHC τάξης I, τα μικροσωματίδια (microparticles), όπως οι μικροσφαίρες πολύ-γαλακτικού-πολύ-γλυκολικού οξέος (PLGA) και τα σύμπλοκα ISCOM, που αποτελούν μικκύλια σχηματιζόμενα από μίγμα Quil A και χοληστερόλης [Finn, 2003].

2.6. Σύγχρονες μέθοδοι ανοσοθεραπείας του καρκίνου που βασίζονται στη χρήση καρκινικών αντιγόνων

Είναι πλέον δεδομένο ότι οι σχέση ανάμεσα στον καρκίνο και το ανοσολογικό σύστημα διέπεται από τους γενικούς νόμους της ανοσολογίας. Παρόλα αυτά, η κατάταξη των αντιδράσεων του ανοσολογικού συστήματος είναι ασαφής. Μια αντίδραση έναντι των καρκινικών κυττάρων δύναται να αντιμετωπισθεί σαν αντίδραση ενάντια σε εαυτά μόρια, σε μη εαυτά αντιγόνα, σε πρώην εαυτά αντιγόνα ή σε συνδυασμό των προαναφερθέντων [Topalian, 2001]. Εξάλλου, σε αντίθεση με την απάντηση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, όπου το ανοσολογικό σύστημα αντιδρά ενάντια σε νέα παθογόνα, στην περίπτωση της ανοσοθεραπείας του καρκίνου, καλείται να αντιμετωπίσει εκ νέου ένα αντιγόνο στο οποίο έχει ήδη εκτεθεί [Pardoll, 1998].

Εστιάζοντας στην ανάπτυξη ανοσοθεραπευτικών μεθόδων που εμπλέκουν καρκινικά αντιγόνα, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η απάντηση του ανοσολογικού συστήματος όταν συναντήσει ένα αντιγόνο διαφέρει, κατά περίπτωση. Μπορεί να επαχθεί έναρξη ανοσολογικής απόκρισης με συνέπεια την καταστροφή του παθογόνου παράγοντα που το φέρει, μπορεί όμως και να επαχθεί ανοχή λόγω ανέργειας, αγνόησης (ignorance) ή φυσικής κατάργησης του κλώνου (physical deletion). Η κατεύθυνση της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος, εξαρτάται από το πλαίσιο μέσα στο οποίο αναγνωρίζεται το αντιγόνο. Για το λόγο αυτό, έχουν προταθεί ποικίλες προσεγγίσεις της βασιζόμενης στα καρκινικά αντιγόνα ανοσοθεραπείας του καρκίνου, με διαφορετικούς τρόπους παρουσίασης των αντιγόνων [Pardoll, 1998].

Πίνακας 2.1: Προσεγγίσεις για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου βασιζόμενες σε καρκινικά αντιγόνα [Βασισμένο σε Wang et al, 1999a]

Ενεργητική ανοσοθεραπεία
Ανοσοποίηση με 1. Απομονωμένο ολόκληρο αντιγόνο σε πρωτεϊνική μορφή 2. Ανοσογονικό πεπτίδιο (φυσικό ή τροποποιημένο) 3. APC «φορτωμένα» με το αντιγόνο ή πεπτίδια αυτού ή γενετικά τροποποιημένα με το γονίδιο που κωδικοποιεί το αντιγόνο 4. Ανασυνδυασμένοι ιοί που κωδικοποιούν το αντιγόνο 5. «Γυμνό» DNA, που κωδικοποιεί το αντιγόνο
Παθητική ανοσοθεραπεία («Επίκτητη ανοσοθεραπεία»)
1. Έγχυση κυττάρων in vitro ευαισθητοποιημένων με το αντιγόνο (ολικός πληθυσμός ή προκύπτων κλώνος). 2. Έγχυση δραστικών κυττάρων γενετικά τροποποιημένων με γονίδια που κωδικοποιούν TCR ειδικά για το αντιγόνο ή κυτταροκίνες

2.6.1 Ενεργητική ανοσοθεραπεία

Ανοσοποίηση με απομονωμένα ολόκληρα αντιγόνα σε πρωτεϊνική μορφή ή ανοσογονικά πεπτίδια (φυσικά ή τροποποιημένα)

Η έγχυση πεπτιδίων έχει ως στόχο τη δέσμευσή τους από τα APC και την παρουσίασή τους στα Τ λεμφοκύτταρα, ώστε να επαχθεί ανοσολογική αντίδραση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία φέρουν τα αντιγόνα. Το πιο σημαντικό ερώτημα στα κλινικά αυτά πρωτόκολλα είναι ο τρόπος με τον οποίο θα παρουσιαστεί το αντιγόνο στο ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να επιτευχθεί η ισχυρότερη δυνατή ανοσολογική απόκριση. Οι κλινικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι και τα εμβόλια αυτού του τύπου είναι πιο αποτελεσματικά αν η έγχυση των πεπτιδίων γίνει ταυτόχρονα με συστηματική χορήγηση ανοσοενισχυτικών [Perez-Diez et al, 2002].

Στα τροποποιημένα πεπτίδια σημαντική θέση κατέχουν οι κρυπτικοί επίτοποι (cryptic epitopes) υπερεκφραζόμενων καρκινικών αντιγόνων, οι οποίοι παρουσιάζουν μικρή ισχύ σύνδεσης με τα μόρια MHC και συνεπώς τα αντίστοιχα ειδικά Τ κύτταρα δεν υφίστανται ανοσολογική ανοχή (tolerance). Η προσθήκη ενός καταλοίπου τυροσίνης στην πρώτη θέση των πεπτιδίων αυτών δύναται να αυξήσει την ισχύ σύνδεσης με τα μόρια HLA-A2.1, ενώ ταυτόχρονα τα ειδικά για τα πεπτίδια αυτά Τ

κύτταρα που ενεργοποιούνται μπορούν να αναγνωρίσουν και τα φυσικά παρουσιαζόμενα πεπτίδια [Tourdot et al, 2000; Scardino et al, 2002].

Εδώ κατατάσσονται και τα εμβόλια της πρώτης γενιάς, τα οποία περιλαμβάνουν ολόκληρα, απενεργοποιημένα με ακτινοβόληση, καρκινικά κύτταρα ή προϊόντα λύσης (lysates) αυτών. Σημαντικό πλεονέκτημα των εμβολίων αυτών αποτελεί το γεγονός ότι δεν είναι απαραίτητο να καθοριστεί η σύστασή τους σε αντιγόνα, καθώς και το ότι περιέχουν μεγάλο αριθμό επιτόπων που ενεργοποιούν τόσο τα βοηθητικά όσο και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, επάγοντας έτσι ισχυρή ανοσολογική απάντηση. Η ίδια όμως αυτή ιδιότητά τους τα καθιστά και επικίνδυνα για την επαγωγή αυτοανοσίας ενάντια σε ποικίλα εαυτά αντιγόνα που περιέχονται στο μίγμα [Moingeon, 2001].

Ανοσοποίηση με APC «φορτωμένα» με το αντιγόνο ή πεπτίδια αυτού ή γενετικά τροποποιημένα με το γονίδιο που κωδικοποιεί το αντιγόνο

Τα πεπτίδια μπορούν να χορηγηθούν δεσμευμένα επάνω σε APC. Τα DC, αποτελώντας το σύνδεσμο ανάμεσα στη μη ειδική και την ειδική ανοσία αποτελούν φυσικό ανοσοενισχυτικό παρέχοντας όλα τα απαιτούμενα συνδιεγερτικά σήματα, μόρια προσκόλλησης και μεγάλη συγκέντρωση μορίων MHC στην επιφάνειά τους. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί δενδριτικά κύτταρα (DC) με δεσμευμένα πεπτίδια, ολόκληρες πρωτεΐνες ή RNA, DC γενετικά τροποποιημένα με ανασυνδυασμένο ιό που κωδικοποιεί το αντιγόνο ή DC μετά από σύντηξη με καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα των κλινικών αυτών δοκιμών παρουσιάζονται πολλά υποσχόμενα, αλλά παρά ταύτα, η πλειοψηφία των ασθενών υποτροπιάζει και καταλήγει [Perez-Diez et al, 2002].

Ελέγχοντας την προοπτική εγκαθίδρυσης μιας μεθόδου θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου με τη δυνατότητα εφαρμογής σε όλους τους ασθενείς, θα πρέπει να συνεκτιμάται το γεγονός ότι οι μέθοδοι επίκτητης ανοσοθεραπείας, καθώς και οι μέθοδοι της ενεργητικής που απαιτούν τη χρήση αυτόλογων DC, είναι ειδικές για τον κάθε ασθενή, καθιστώντας έτσι τη θεραπεία χρονοβόρα και δαπανηρή.

Ανοσοποίηση με ανασυνδυασμένους ιούς που κωδικοποιούν το αντιγόνο

Δεδομένου ότι η μόλυνση με βακτήρια ή ιούς δύναται να αυξήσει την επιφανειακή έκφραση συνδιεγερτικών μορίων, έχουν ενεθεί ιικοί φορείς γενετικά τροποποιημένοι ώστε να εκφράζουν καρκινικά αντιγόνα. Παρά το γεγονός ότι αυτός ο τρόπος εμβολιασμού έχει θετικά αποτελέσματα σε μοντέλα ποντικών, δεν έχει επιτευχθεί σημαντική απάντηση σε κλινικές δοκιμές [Perez-Diez et al, 2002].

Ανοσοποίηση με «γυμνό» DNA που κωδικοποιεί το αντιγόνο

Μία νέα προσέγγιση στα εμβόλια κατά του καρκίνου είναι η χρήση γυμνού DNA, η οποία, αν αποδειχθεί αποτελεσματική, θα αποτελέσει σημείο αναφοράς, δεδομένης της ευκολίας παραγωγής και χρήσης του. Το πλασμιδιακό DNA έχει τη δυνατότητα να παρέχει ανοσογονικά αντιγόνα, να τα παρουσιάζει μέσω των μορίων MHC τάξης I και II, να επάγει ανοσολογική μνήμη και να περιέχει ανοσοενισχυτικό (τις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες CpG). Μέχρι στιγμής, τα πρώτα δεδομένα από τη χρήση γυμνού DNA ως εμβολίου δεν είναι αρκετά για την εκτίμηση της πιθανής αποτελεσματικότητάς του [Renner et al, 2000].

Ανοσοποίηση με χρήση κυτταροκινών ως ανοσοενισχυτικά, με συστηματική χορήγηση ή έχοντας εισάγει το αντίστοιχο γονίδιο σε γενετικά τροποποιημένο φορέα

Με την εισαγωγή του γονιδίου της κυτταροκίνης στον φορέα του εμβολίου, το αποτέλεσμα είναι η πολύ μεγάλη τοπική συγκέντρωση της κυτταροκίνης, η οποία αλλάζει το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον, ενισχύοντας τη δραστικότητα των APC και την ενεργοποίηση των ειδικών για τον όγκο Τ λεμφοκυττάρων, χωρίς να παρουσιάζει την τοξικότητα που προκαλεί η συστηματική χορήγηση [Armstrong et al, 2001].

Συνοπτικά, οι χρησιμοποιούμενες στρατηγικές ενεργητικής ανοσοποίησης για την πρόκληση ανοσολογικής απάντησης ενάντια σε καρκινικά αντιγόνα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Αντιγόνο	**Ανοσοενισχυτικό**	**Πλεονεκτήματα**	**Μειονεκτήματα**
Πρωτεΐνη ή πεπτίδιο	Μη κυτταρικό π.χ., CpG, GM-CSF, KLH	Καθορισμένο αντιγόνο Κλινικά αποτελεσματικό σε λεμφώματα	Έχει αναφερθεί διαφυγή της ανοσολογικής επίβλεψης στο μελάνωμα
Πρωτεΐνη ή πεπτίδιο	Κυτταρικό π.χ., DC, ενεργοποιημένο Β λεμφοκύτταρο	Αυτόλογο Καθορισμένο αντιγόνο Κλινικά υποσχόμενο στο μελάνωμα	Χρονοβόρα και ακριβή τεχνική
Καρκινικό κύτταρο	Κυτταρικό π.χ., σύντηξη με DC	Δεν υπάρχει ανάγκη να καθοριστεί το αντιγόνο Περιέχει πολλά αντιγόνα Κλινικά αποτελεσματικό σε καρκίνωμα του νεφρού	Χρονοβόρα και ακριβή τεχνική Δεν υπάρχει πάντα το απαιτούμενο ποσό καρκινικών κυττάρων Δύσκολη η παρακολούθηση της απάντησης στον ασθενή
DNA	-	Οικονομική μέθοδος Εύκολη εφαρμογή	Δεν έχουν αναφερθεί κλινικές απαντήσεις ως τώρα

2.6.2. Παθητική ανοσοθεραπεία

Έγχυση κυττάρων in vitro ευαισθητοποιημένων με το αντιγόνο (ολικός πληθυσμός ή προκύπτων κλώνος).

Στην παθητική ανοσοθεραπεία, Τ λεμφοκύτταρα ειδικά για αντιγόνα του αυτόλογου όγκου απομονώνονται και πολλαπλασιάζονται in vitro ώστε να αποκτηθούν μεγάλοι αριθμοί. Ως πηγή των λεμφοκυττάρων αρχικά χρησιμοποιήθηκαν διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) πολλαπλασιασμένα in vitro με τη χρήση IL-2, τα οποία ενέθηκαν στους ασθενείς με ταυτόχρονη συστηματική χορήγηση της ίδιας κυτταροκίνης. Η μέθοδος δεν απαιτεί απομόνωση συγκεκριμένης ειδικότητας λεμφοκυττάρων, ενώ χρησιμοποιεί μίγμα $CD4^+$ και $CD8^+$ λεμφοκυττάρων. Σήμερα, για την απομόνωση των κατάλληλων κυττάρων, χρησιμοποιούνται επίσης PBMC ή λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, τα οποία μετά από επάλληλες ενεργοποιήσεις in vitro εγχύονται στους ασθενείς.

Το αποτέλεσμα των κλινικών αυτών δοκιμών ήταν στην πλειονότητα των περιπτώσεων η δραματική μείωση του αρχικού ποσοστού των ειδικών Τ λεμφοκυττάρων στο αίμα μετά τις πρώτες ημέρες και η ανάγκη για επαναληπτικές δόσεις του εμβολίου. Η ανάγκη για επαναληπτικές δόσεις αποτελεί και το μέγιστο μειονέκτημα της ανοσοθεραπευτικής αυτής μεθόδου, δεδομένου ότι τεχνικά, η απόκτηση του απαιτούμενου αριθμού κυττάρων είναι δύσκολη [Perez-Diez et al, 2002]

Εναλλακτικά, στην περίπτωση που η ανοσοθεραπεία κατευθύνεται σε εαυτό-αντιγόνο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικά για τον όγκο Τ λεμφοκύτταρα προερχόμενα από άλλο δότη και με αυτό τον τρόπο να καμφθεί ο μηχανισμός της αυτοανοχής. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, οι οποίοι όμως, μετά την αρχική ανταπόκριση στη θεραπεία υποτροπίασαν. Πρόσφατες κλινικές μελέτες υποδεικνύουν τη θεραπεία αυτή για συμπαγείς όγκους, όπως το καρκίνωμα του νεφρού [Armstrong et al, 2001].

Έγχυση δραστικών κυττάρων γενετικά τροποποιημένων με γονίδια που κωδικοποιούν TCR ειδικά για το αντιγόνο ή κυτταροκίνες

Τα Τ λεμφοκύτταρα με TCR ειδικό για καρκινικά αντιγόνα αναλαμβάνουν να καταστρέψουν τα κύτταρα του όγκου, ενώ οι κυτταροκίνες που εκκρίνουν μπορεί να

προκαλούν καταστροφή του όγκου, όπως ο TNF, ή βελτίωση της επιβίωσης των Τ λεμφοκυττάρων, όπως οι ιντερλευκίνες [Armstrong et al, 2001].

Ακόμα και στις περιπτώσεις που έχουμε ανοσολογική απάντηση στους ασθενείς μετά το εμβόλιο, στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί υποτροπιάζουν και πεθαίνουν. Δεδομένου ότι δραστικά, ειδικά για τα καρκινικά αντιγόνα Τ λεμφοκύτταρα έχουν βρεθεί στην περιοχή του όγκου, η πλέον πιθανή εξήγηση είναι ότι η προκαλούμενη ανοσολογική αντίδραση είναι ανεπαρκής ή ακατάλληλη για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Εξάλλου, η ετερογένεια των όγκων, η οποία αφορά σε ποικιλομορφία στην έκφραση αντιγόνων του MHC, στον ρυθμό ανάπτυξης, στη διαφορική δεκτικότητα στους μηχανισμούς ειδικής άμυνας και στη διαφορετική αλληλεπίδραση του όγκου με το περιβάλλον, καθιστά δύσκολη την ανίχνευση των απαντήσεων στους ασθενείς. Είναι συχνές οι περιπτώσεις κατά τις οποίες στη διάρκεια της θεραπείας ενός ατόμου κάποιοι όγκοι υποχωρούν ενώ άλλοι συνεχίζουν να μεγαλώνουν [Perez-Diez et al, 2002].

Αναφερόμενοι στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, θα πρέπει να αναφέρουμε και τη χρήση των φυσικών φονικών κυττάρων (NK), μιας κατηγορίας λεμφοκυττάρων, η οποία ανήκει στη μη ειδική ανοσία. Η δράση των NK δεν κατευθύνεται ενάντια σε συγκεκριμένα αντιγόνα και, δεδομένου ότι δρουν κύρια ενάντια σε κυτταρικούς στόχους που στερούνται επιφανειακής έκφρασης μορίων MHC τάξης Ι, δύνανται να προκαλέσουν τη λύση καρκινικών κυττάρων που έχουν χάσει τη δυνατότητα έκφρασής αυτών. Οι κύριες στρατηγικές χρήσης τους διακρίνονται, όπως και στην περίπτωση των Τ λεμφοκυττάρων, σε ενεργητική και παθητική ανοσοθεραπεία. Στην πρώτη περίπτωση, με την επίδραση κυτταροκινών, κύρια IL-2, προκαλείται ενεργοποίηση των NK του οργανισμού, ενώ στη δεύτερη εγχύονται στον ασθενή, τοπικά ή συστηματικά, in vitro ενεργοποιημένα αυτόλογα ή αλλογενή NK κύτταρα. Οι κλινικές δοκιμές παρουσιάζονται πολλά υποσχόμενες, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα του τρόπου ενεργοποίησης των NK, καθώς και της μεθόδου κατεύθυνσής τους στην περιοχή του όγκου για να αποτελέσουν κλινική πρακτική για τη θεραπεία του καρκίνου [Albertsson et al, 2003].

2.7. Χρήση αντισωμάτων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Η αναζήτηση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα άρχισε το 1960, με κύριο πρόβλημα την πολυκλωνικότητα των προϊόντων και συνεπώς την δράση τους ενάντια σε υγιείς ιστούς εκτός από τα καρκινικά κύτταρα. Η ανάπτυξη της τεχνογνωσίας και η τεχνική της δημιουργίας υβριδωμάτων από τους Kohler και Milstein επέτρεψε το χαρακτηρισμό πολλών καρκινικών αντιγόνων, που δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι αντισωμάτων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Τα κυριότερα αντισώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί [Carter et al, 2001]:

Table 1 | **Antibodies in advanced oncology trials***

Antibody trade name (generic name)	Antigen target	Antibody type	Strategy to enhance activity of naked antibody	Tumour target	Status	Corporate sponsors
Avastin (bevacizumab)	VEGF	hu IgG_1	Combination with chemotherapy	Metastatic NSCLC, metastatic CRC	Phase III, Phase III	Genentech
BEC2 (mitumomab)	Anti-idiotypic mAb, GD3 ganglioside mimic	mu IgG	Vaccine	SCLC, malignant melanoma	Phase III, Phase II	ImClone Systems, Merck KGaA
Bexxar (tositumomab)	CD20	mu IgG_{2a}	^{131}iodine	NHL	BLA filed with US FDA	Corixa, GlaxoSmith-Kline
Campath (alemtuzumab)	CD52	hu IgG_1	None	B-cell CLL	Approved in US May 2001	Millennium and ILEX Partners
CeaVac	Anti-idiotypic mAb, CEA mimic	mu IgG	Vaccine in combination with chemotherapy for CRC or TriAb for NSCLC	CRC NSCLC	Phase III, Phase II	Titan Pharma-ceuticals
Herceptin (trastuzumab)	ERBB2	hu IgG_1	Combination with chemotherapy	Metastatic breast cancer overexpressing *ERBB2*	Approved in US September 1998	Genentech
IMC-C225 (centuximab)	EGFR	ch IgG	Combination with chemotherapy or external beam radiation	CRC, locally advanced or metastatic head and neck	BLA filing in progress, Phase III	mClone Systems
LymphoCide (epratuzumab)	CD22	hu IgG	None	NHL	Phase III	Immunomedics
MDX-210	ERBB2 X CD64 (FcγRI)	mu $F(ab')_2$	Bispecific	Ovarian cancer overexpressing *ERBB2*	Phase III	Medarex, Immuno Designed Molecules
Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin)	CD33	hu IgG_4	Calicheamicin conjugate	AML	Approved in US May 2000	Wyeth Laboratories
Panorex (edrecolomab)	EpCam	mu IgG_{2a}	Combination with chemotherapy	Dukes' C CRC	Approved in Germany January 1995	GlaxoSmith-Kline, Centocor
Rituxan (rituximab)	CD20	ch IgG_1	Combination with chemotherapy	NHL	Approved in US November 1997	IDEC Pharma-ceuticals, Genentech
Theragyn (pemtumomab)	PEM	mu IgG_1	^{90}yttrium	Ovarian cancer, gastric cancer	Phase III, Phase II	Antisoma
Zamyl	CD33	hu IgG_1	Combination with chemotherapy	AML	Phase III	Protein Design Labs
Zevalin (ibritumomab tituxetan)	CD20	mu IgG_1	^{90}yttrium	NHL	BLA filed with US FDA	IDEC Pharma ceuticals

2.8. Παρακολούθηση των ασθενών μετά την ανοσοθεραπεία

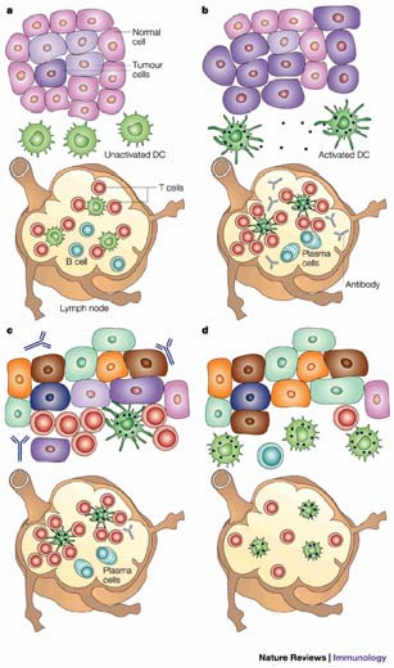
Για την αξιολόγηση των μεθόδων ανοσοθεραπείας, είναι απαραίτητη η παρακολούθηση της ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς ενάντια στον όγκο. Τ λεμφοκύτταρα ειδικά για τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ανιχνευτούν με δύο μεθόδους, τα τετραμερή (tetramers) και την τεχνική ELISPOT. Τα τετραμερή παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης των ειδικών Τ κυττάρων απευθείας ex vivo, χωρίς τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων in vitro και συνεπώς την αποτίμηση του ακριβούς αριθμού τους, με ευαισθησία 1/1000 ως 1/5000. Επίσης, είναι δυνατό ταυτόχρονα να συνεκτιμηθούν και άλλα επιφανειακά μόρια των ειδικών για τον όγκο Τ κυττάρων, ώστε να χαρακτηριστεί πλήρως η ταυτότητά τους. Το μέγιστο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν εξετάζεται η λειτουργικότητα των κυττάρων που μελετούνται, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις έχουν αποδειχτεί ανεργικά. Με τη μέθοδο ELISPOT αντίθετα, ελέγχεται όχι μόνο το ποσοστό των ειδικών για τον όγκο Τ λεμφοκυττάρων, αλλά και η λειτουργικότητά τους, μέσω της παραγωγής κυτταροκινων. Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι, στην περίπτωση πολύ σπάνιων κυττάρων, ότι απαιτείται in vitro πολλαπλασιασμός των Τ λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της ποσόστωσης [Renner et al, 2000].

Για τον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς, εκτός από τον υπολογισμό του αριθμού των ειδικών για τον όγκο Τ λεμφοκυττάρων, είναι απαραίτητες και άλλες λειτουργικές δοκιμασίες, όπως η μέτρηση των εκκρινόμενων κυτταροκινών τόσο με ενδοκυτταρική χρώση σε συνδυασμό με τον κυτταρικό φαινότυπο, όσο και με ποσοτική PCR (real-time PCR). Η πρώτη παρέχει ποσοτικά και λειτουργικά αποτελέσματα, αλλά έχει περιορισμό στην ευαισθησία, ενώ η δεύτερη έχει μεγάλη ευαισθησία, αλλά δεν παρέχει άμεση συσχέτιση της κυτταροκίνης με τα λειτουργικά κύτταρα. Επιπλέον είναι δυνατός ο έλεγχος πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων με την τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων και η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας [Schultze et al, 2001; Parmiani, 2002].

2.9. Μηχανισμοί διαφυγής των όγκων από την ανοσολογική επιτήρηση

Από την έναρξη της δημιουργίας ενός όγκου μέχρι την κλινική του διάγνωση, η αλληλεπίδραση όγκου και ανοσολογικού συστήματος έχει διέλθει πολλά στάδια. Καταρχήν, τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις, αλλά είναι λίγα σε αριθμό και δεν συνιστούν απειλή για τον οργανισμό. Για το λόγο αυτό, τα DC που βρίσκονται στον περιβάλλοντα ιστό δεν ενεργοποιούνται και συνεπώς δεν

ευαισθητοποιούν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα των κοντινών λεμφαδένων. Όταν ο όγκος αρχίσει να μεγαλώνει και να αποκτά ετερογένεια, τόσο τα προϊόντα του όγκου, όσο και οι πιθανές βλάβες στον περιβάλλοντα ιστό, ενεργοποιούν τα DC της περιοχής και εκκινείται η ανοσολογική αντίδραση, η ισχύς της οποίας εξαρτάται από τα καρκινικά αντιγόνα και την κατάσταση του οργανισμού του ασθενούς. Στη συνέχεια αρχίζει η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσολογικό σύστημα, η οποία δεν καθίσταται επιτυχής, αφενός λόγω του μεγέθους και της ετερογένειας που έχει αποκτήσει ο όγκος και αφετέρου λόγω των μηχανισμών του για την αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης. Στο τελικό στάδιο, η προκαλούμενη από τον όγκο τοπική και συστηματική ανοσοκαταστολή οδηγεί στην ανέργεια των Τ και Β λεμφοκυττάρων, καθώς και των DC που βρίσκονται στην περιοχή του όγκου. Οι διαδικασία αυτή περιγράφεται στο ακόλουθο σχήμα.



Εικόνα 2.2 Εξέλιξη των αλληλεπιδράσεων όγκου και ανοσολογικού συστήματος. [Finn, 2003].

Η διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την απάντηση του ανοσολογικού συστήματος οφείλεται σε μηχανισμούς που δρουν τόσο στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, όσο και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες, οι οποίες δύνανται να ισχύουν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό [Pawelec et al, 1997; Moingeon, 2001; Armstrong et al, 2001].

Απώλεια επιφανειακής έκφρασης μορίων MHC τάξης I

Ένας κύριος μηχανισμός διαφυγής είναι η απώλεια επιφανειακής έκφρασης μορίων MHC τάξης I, με συνέπεια να αποκλείονται οι ειδικές ανοσολογικές απαντήσεις που καθορίζονται από την παρουσίαση αντιγόνων μέσω των μορίων αυτών. Η απώλεια των μορίων MHC τάξης I μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη έκφρασης της β_2-μικροσφαιρίνης ή στην απώλεια έκφρασης άλλων συστατικών της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας αντιγόνων (όπως οι LMP2, LMP7, Tap1 και Tap2). Η έλλειψη έκφρασης μορίων MHC τάξης I οδηγεί σε αδυναμία αναγνώρισης από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Έχει εντοπισθεί στο μελάνωμα, καθώς και σε τύπους καρκίνου του μαστού, της μήτρας, του εντέρου και του πνεύμονα .

Μείωση και ετερογένεια των εκφραζόμενων καρκινικών αντιγόνων

Οι περισσότεροι όγκοι διαφοροποιούν τα εκφραζόμενα καρκινικά αντιγόνα, με την απώλεια των παλιών και την έκφραση νέων, κυρίως στις μεταστάσεις. Εξάλλου, πολλά καρκινικά αντιγόνα είναι εαυτά μόρια με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται επαρκώς από τα ειδικά για αυτά λεμφοκύτταρα, καθιστώντας τον όγκο μη ανοσογονικό.

Απώλεια έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων τόσο από τα καρκινικά κύτταρα όσο και από τα DC του ίδιου του οργανισμού

Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους συνδιεγερτικά μόρια, με αποτέλεσμα, ακόμα και αν τα αναγνωρίσουν τα T λεμφοκύτταρα, να μην ενεργοποιηθούν σωστά και να προκληθεί ανέργεια. Επιπλέον, σε ορισμένους ασθενείς έχει παρατηρηθεί παρακώλυση της ωρίμανσης των DC, με συνέπεια τη μη σωστή παρουσίαση των αντιγόνων στα T κύτταρα και την πρόκληση ανέργειας.

Έκκριση ανοσοκατασταλτικών ουσιών από τα κύτταρα του όγκου

Τα καρκινικά κύτταρα δύνανται να παράγουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, όπως η IL-10, ο TGF-β, οι προσταγλανδίνες, το CD58, το CD54 και τα συνδεόμενα με την ισοφερριτίνη μόρια p43. Η πρόκληση ανέργειας οδηγεί αφενός στην απώλεια της δραστικότητας των ειδικών για τον όγκο T λεμφοκυττάρων και αφετέρου στον ανοσοκατασταλτικό ρόλο των τελευταίων για το σύνολο της ανοσολογικής απάντησης. Εξάλλου, η ανάπτυξη στρώματος γύρω από τον όγκο, δύναται να κάνει την περιοχή του όγκου μη προσβάσιμη στα T λεμφοκύτταρα.

Επαγωγή ανοσολογικής ανέργειας ή αποκλεισμός των ειδικών για τα καρκινικά αντιγόνα Τ κυττάρων (clonal deletion)

Η υπερέκφραση του FasL είναι συχνή καρκινικά κύτταρα. Υπερέκφρασή του και σύνδεση με το επιφανειακό μόριο Fas των Τ λεμφοκυττάρων προκαλεί απόπτωση των τελευταίων. Έχει εντοπισθεί στο μελάνωμα, στον καρκίνο του εντέρου, του πνεύμονα και σε μεταστάσεις καρκίνου του ήπατος.

Ενεργοποίηση ανοσοκατασταλτικών κυττάρων

Τα κατασταλτικά Τ λεμφοκύτταρα επάγουν άμεση καταστολή της ανοσολογικής απάντησης ενάντια στον όγκο τόσο με την έκκριση κυτταροκινών, όσο και μέσω κυτταρικής αλληλεπίδρασης. Άλλοι τύποι κυττάρων που δύνανται να επάγουν ανοσοκαταστολή είναι μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα, καθώς και φυσικά κατασταλτικά κύτταρα με τον προγονικό φαινότυπο $CD34^{+}$.

Αλλαγή σε μόρια μεταγωγής σήματος των Τ λεμφοκυττάρων

Συχνή είναι η διαφοροποίηση της έκφρασης των σχετιζόμενων με τον TCR μορίων (για παράδειγμα της αλυσίδας CD3-ζ), καθώς και η απώλεια κινασών τυροσίνης που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, πιθανόν λόγω της απελευθέρωσης μεταβολιτών του οξυγόνου από μονοκύτταρα και μακροφάγα της περιοχής του όγκου. Η κατάσταση αυτή είναι αντιστρεπτή με τη συστηματική χορήγηση IL-2. Στο μελάνωμα εξάλλου, έχει διαπιστωθεί έκφραση ανασταλτικών υποδοχέων των φυσικών φονικών κυττάρων στα ειδικά για τον όγκο κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, καθώς και έκφραση στα καρκινικά κύτταρα ισομορφών των μορίων HLA-G, τα οποία τα προστατεύουν από την κυτταρολυτική δράση των φυσικών φονικών κυττάρων.

Χρήση των προϊόντων των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων για την αύξηση του όγκου

Κυτταροκίνες, όπως η IL-4 στις λευχαιμίες και η IL-10 στο μελάνωμα, που παράγονται από Τ λεμφοκύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα του όγκου για την ανάπτυξή του. Η έκφραση από τα καρκινικά κύτταρα υποδοχέων για την IL-2, οδηγεί στη χρήση της για την ανάπτυξή τους και στη μείωση της διαθέσιμης ποσότητας για τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Τέλος, τα διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα δύνανται να παράγουν παράγοντες αγγειογένεσης, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η δημιουργία αγγείων στον όγκο.

Ανάπτυξη σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων και των ηλικιωμένων ατόμων

Τέλος, η δημιουργία όγκων είναι πιο συχνή σε άτομα με κατεσταλμένο ανοσολογικό σύστημα, όπως οι ηλικιωμένοι, οι λήπτες μοσχεύματος και οι ασθενείς με AIDS. Οποιαδήποτε αποσταθεροποίηση της ικανότητας ρύθμισης της ανοσολογικής αντίδρασης μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

2.10. Ο ρόλος των Th και των CTL στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου

Μέχρι πρόσφατα, στις προσπάθειες ανοσοθεραπείας του καρκίνου η έμφαση κατευθυνόταν στα CTL, δεδομένου αφενός ότι η πλειονότητα των όγκων είναι θετικοί για μόρια του MHC τάξης I, αλλά όχι για τα τάξης II και αφετέρου ότι αυτά είναι τα κύτταρα που επιτελούν την κυτταροτοξική δράση, άμεσα με την αναγνώριση του καρκινικού κυττάρου. Εξάλλου, οι in vivo μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα των CTL να μειώνουν δραματικά μεγάλες καρκινικές μάζες. Τα τελευταία χρόνια όμως, τα αποτελέσματα των εργαστηριακών ερευνών υποδεικνύουν ότι τα Th κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενορχήστρωση της ανοσολογικής απάντησης.

Τα Th κύτταρα, μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, επάγουν την ενεργοποίηση των APC και των CTL κυττάρων. Υπάρχει η άποψη ότι τα Th που χρησιμοποιούνται στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου δεν είναι απαραίτητο να είναι ειδικά για τα καρκινικά κύτταρα, αλλά δύνανται να κατευθύνονται και ενάντια σε αντιγόνα μη σχετικά με τον όγκο και να παράγουν τις απαραίτητες κυτταροκίνες παρέχοντας την απαραίτητη βοήθεια στα CTL για να επιτελέσουν την κυτταροτοξική τους δράση [Zeng, 2001]. Παρόλα αυτά, η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων δεν απαιτεί μόνο τα CTL κύτταρα, αλλά και κύτταρα του μη ειδικού κλάδου του ανοσολογικού συστήματος, όπως τα μακροφάγα και τα εωσινόφιλα, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδικότητα για τα καρκινικά κύτταρα. Η ενεργοποίησή τους όμως στην περιοχή του όγκου από τα γειτονικά, ειδικά για τον όγκο, Th κύτταρα, οδηγεί στην έμμεση ειδική κατεύθυνσή τους ενάντια στα καρκινικά κύτταρα [Hung et al, 1998].

Συνοπτικά, οι μέχρι τώρα προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι κατάλληλα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν στην περιοχή του όγκου και να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα που φέρουν τα συγκεκριμένα αντιγόνα, ακόμα και να εξαλείφουν ολόκληρη την καρκινική μάζα.

Επιπλέον, εκτός από την περίπτωση που το αντιγόνο στο οποίο κατευθύνονται τα Τ λεμφοκύτταρα είναι κριτικό για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, η χρήση ενός μόνο επιτόπου ή ενός μόνο αντιγόνου δεν είναι αρκετή για την καταστροφή του όγκου, διότι επάγεται η διαφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης λόγω απώλειας έκφρασης αυτού. Επιπρόσθετα, η χρήση συνδυασμού $CD4^+$ και $CD8^+$ κυττάρων είναι σημαντική για την ανάπτυξη ανοσίας και ανοσολογικής μνήμης. Τέλος, σημαντική δεν είναι μόνο η ποιότητα, αλλά και η ποσότητα των εγχυόμενων κυττάρων, λαμβάνοντας υπόψη τη δυνατότητα εγκατάστασης στην περιοχή του όγκου (homing capacity), το στάδιο ενεργοποίησης και την ικανότητα σύνδεσης των αντιγόνων με τους TCR των λεμφοκυττάρων Pardoll, 2002].

2.11. Πιθανές βελτιώσεις των εμβολίων κατά του καρκίνου

Θεωρητικά, τα εμβόλια κατά του καρκίνου θα πρέπει να είναι μη τοξικά, ικανά να επάγουν ανοσολογική απάντηση ενάντια τόσο στον πρωτογενή όγκο, όσο και στις μεταστάσεις και τέλος να δημιουργούν ισχυρή ανοσολογική μνήμη, εμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την υποτροπή του ασθενούς. Η φύση συνεπώς της ανοσολογικής απάντησης θα πρέπει να περιλαμβάνει ευρείας κλίμακας απάντηση. Θα πρέπει δηλαδή να προκαλεί την παραγωγή κυτταροτοξικών και βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για τα αντιγόνα του όγκου, φυσικών φονικών κυττάρων, καθώς και αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα, τόσο ως άμεσο δραστικό μηχανισμό, όσο και τη διευκόλυνση της εξαρτώμενης από τα αντισώματα κυτταροτοξικότητας (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC). Για το σκοπό αυτό είναι δυνατό τα χρησιμοποιηθεί αφενός συνδυασμός καρκινικών αντιγόνων και αφετέρου πολλαπλές μέθοδοι παρουσίασης τους [Moingeon, 2001].

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι τα θεραπευτικά εμβόλια δύνανται να είναι αποτελεσματικά σε μικρό καρκινικό φορτίο. Ιδεατά λοιπόν, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την κλασική ιατρική αντιμετώπιση, μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Επίσης, σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επιβράδυνση του ρυθμού εξέλιξης της νόσου, διατηρώντας την ποιότητα ζωής.

Οι κλινικές δοκιμές που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, έχουν συμπεριλάβει ασθενείς σε πολύ προχωρημένα στάδια της νόσου, οι οποίοι παρουσιάζουν κάποιου βαθμού ανοσοκαταστολή, τόσο λόγο του όγκου καθεαυτού, όσο και λόγω της

λαμβανόμενης θεραπείας. Εξάλλου, στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς βρίσκονται σε προχωρημένη ηλικία, πολλά χρόνια αφότου ο θύμος αδένας έχει πάψει να λειτουργεί και να παράγει «αθώα» Τ λεμφοκύτταρα. Συνεπώς, η ανοσολογική απάντηση μετά το εμβόλιο βασίζεται στην αναγνώριση του καρκινικού αντιγόνου από ένα ή περισσότερα κύτταρα μνήμης, τα οποία είναι πιθανό να μη μπορούν να ενεργοποιηθούν και να δράσουν το ίδιο αποτελεσματικά με τα αντίστοιχα «αθώα» κύτταρα του ίδιου του ασθενούς σε μικρότερη ηλικία [Haynes et al, 2003]. Οι στρατηγικές του εμβολιασμού πιθανά να είναι πιο αποτελεσματικές σε ασθενείς σε πιο αρχικά στάδια και με μικρότερο καρκινικό φορτίο. Αφού επιβεβαιωθεί η ασφάλεια των εμβολίων, θα ήταν κριτικό να σχεδιαστούν κλινικές δοκιμές σε ασθενείς αμέσως μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Προκαταρκτικές μελέτες, υποδεικνύουν ότι η ανοσοθεραπεία παρουσιάζει πολύ μικρότερη τοξικότητα από τις κλασσικές μεθόδους μεταχειρουργικής θεραπείας του καρκίνου [Finn, 2003].

Ο σκοπός των εμβολίων κατά του καρκίνου είναι η δημιουργία ανοσολογικής απάντησης ικανής να καταστρέψει ειδικά τα καρκινικά κύτταρα χωρίς να προκαλέσει αυτοάνοση απόκριση. Για την επίτευξη του στόχου αυτού είναι απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν τη λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην ανοσολογική απάντηση που προκαλείται από παθογόνους παράγοντες και την ενάντια σε εαυτά κύτταρα κατευθυνόμενη αυτοανοσία.

2.12. Εμβόλια προφύλαξης κατά του καρκίνου

Όπως έχει αποδειχτεί στις μολυσματικές νόσους, τα εμβόλια είναι πιο αποτελεσματικά στην προφυλακτική τους μορφή. Το ίδιο ισχύει κατά πάσα πιθανότητα και για τον καρκίνο. Το ανοσολογικό σύστημα ενός οργανισμού που είναι ευαισθητοποιημένο για καρκινικά αντιγόνα, αναμένεται να μπορεί να καταστρέψει τον αντίστοιχο όγκο, πριν αυτός γίνει κλινικά ανιχνεύσιμος και ετερογενής ως προς τα αντιγόνα και πριν αποκτήσει τη δυνατότητα να προκαλεί ανοσοκαταστολή. Με το σκεπτικό αυτό, έχουν χρησιμοποιηθεί μοντέλα πειραματοζώων για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των προφυλακτικών εμβολίων βασιζόμενων σε καρκινικά αντιγόνα. Δυστυχώς, παρότι έχουν αποδειχτεί επιτυχή δεν είχαν μέχρι σήμερα την ευκαιρία να δοκιμαστούν σε ανθρώπους, ώστε να έχουν τη δυνατότητα να αναπαράγουν το θετικό αποτέλεσμα στην κλινική [Finn, 2003].

Υγιή άτομα που θα μπορούσαν να συμμετάσχουν σε προφυλακτικό εμβολιασμό κατά του καρκίνου αποτελούν άτομα που έχουν εκτεθεί σε μεγάλες

δόσεις καρκινογόνων ουσιών, άτομα με γενετική προδιάθεση, ασθενείς με προνεοπλαστικές εντοπίσεις και πρώην ασθενείς με καρκίνο. Μια πιο προοδευτική πρόταση θα ήταν ο εμβολιασμός του γενικού πληθυσμού ενάντια σε ορισμένες μορφές καρκίνου, όπως συμβαίνει και με τους προγραμματισμένους εμβολιασμούς ενάντια σε συγκεκριμένους μολυσματικούς παράγοντες. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να έχει εφαρμογή σε τύπους καρκίνου που σχετίζονται με μολυσματικούς παράγοντες, όπως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας που προκαλείται από ιούς *papilloma*, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που προκαλείται από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C και το λέμφωμα Burkitt από τον ιό EBV [Forni et al, 2000]. Για τη χρήση του ιού papilloma σε εμβόλια προφύλαξης κατά του καρκίνου έχουν ήδη γίνει επιτυχημένες κλινικές δοκιμές [Koutsky et al, 2002].

Όσον αφορά στα καρκινικά αντιγόνα που θα μπορούσαν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν για προφυλακτικό εμβολιασμό, αυτά δύνανται να συμπεριλάβουν τους καρκινογόνους μολυσματικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν, μεταλλαγμένα ογκογονίδια, την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης, καθώς και αντιγόνα της οικογένειας MAGE [Forni et al, 2000].

Δεδομένης αφενός της βάσης της θεραπευτικής επιστήμης όπως διατυπώθηκε από τον Ιπποκράτη, ότι η θεραπεία πρωτίστως πρέπει να μη βλάπτει, και αφετέρου της ασάφειας στα όρια ανάμεσα στην ανοσία απέναντι στον καρκίνο και την αυτοανοσία, η πιθανή χρήση προφυλακτικών εμβολίων κατά του καρκίνου μπορεί να προταθεί μόνο στην περίπτωση που εξασφαλισθεί η έλλειψη οποιασδήποτε μορφής τοξικότητας και η αποφυγή δημιουργίας αυτοάνοσης απόκρισης.

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν, η προφυλακτική δημιουργία ανοσίας έναντι στον καρκίνο παρουσιάζεται ως μελλοντική αλλά πιθανή προοπτική. Η προφύλαξη, θα μπορούσε να είναι μία νέα μορφή αντιμετώπισης, η οποία εξάλλου βασίζεται σε μηχανισμούς χειρισμού του ανοσολογικού συστήματος που χρησιμοποιούνται από τον πρώτο εμβολιασμό ενάντια στην ευλογιά. Παρόλα αυτά, τα προφυλακτικά εμβόλια δεν αναμένεται να εφαρμοστούν στην κλινική για πολλά ακόμα χρόνια, με εξαίρεση τύπους καρκίνου που σχετίζονται με μολυσματικούς παράγοντες.

3. ΕΙΔΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗ HER-2/neu

Ο Ανθρώπινος Υποδοχέας-2 του Επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα (Human Epidermal growth factor Receptor-2: HER2, HER-2/neu ή c-erbB-2) είναι το δεύτερο μέλος της οικογένειας HER, η οποία περιλαμβάνει τέσσερις υποδοχείς: Τον υποδοχέα του επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, HER1 ή erbB-1), τον υποδοχέα HER2 ή erbB-2, τον υποδοχέα HER3 ή erbB-3 και τον υποδοχέα HER4 ή erbB-4.

```
MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD        30
MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVVQGNL        60
ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIAHNQ        90
VRQVPLQRLR IVRGTQLFED NYALAVLDNG       120
DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK       150
GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA       180
LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK GSRCWGESSE       210
DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC       240
AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA       270
LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP       300
YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR       330
CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN       360
IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA       390
PLQPEQLQVF ETLEEITGYL YISAWPDSLP       420
DLSVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI       450
SWLGLRSLRE LGSGLALIHH NTHLCFVHTV       480
PWDQLFRNPH QALLHTANRP EDECVGEGLA       510
CHQLCARGHC WGPGPTQCVN CSQFLRGQEC       540
VEECRVLQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ       570
NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC       600
PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC       630
THSCVDLDDK GCPAEQRASP LTSIISAVVG       660
ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRL       690
LQETELVEPL TPSGAMPNQA QMRILKETEL       720
RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV       750
AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGSP       780
YVSRLLGICL TSTVQLVTQL MPYGCLLDHV       810
RENRGRLGSQ DLLNWCMQIA KGMSYLEDVR       840
LVHRDLAARN VLVKSPNHVK ITDFGLARLL       870
DIDETEYHAD GGKVPIKWMA LESILRRRFT       900
HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPARE       930
IPDLLEKGER LPQPPICTID VYMIMVKCWM       960
IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ       990
NEDLGPASPL DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA      1020
EEYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVHHRHRSS      1050
STRSGGGDLT LGLEPSEEEA PRSPLAPSEG      1080
AGSDVFDGDL GMGAAKGLQS LPTHDPSPLQ      1110
RYSEDPTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV      1140
NQPDVRPQPP SPREGPLPAA RPAGATLERP      1170
KTLSPGKNGV VKDVFAFGGA VENPEYLTPQ      1200
GGAAPQPHPP PAFSPAFDNL YYWDQDPPER      1230
GAPPSTFKGT PTAENPEYLG LDVPV           1255
```

Εικόνα 3.1 Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης HER-2/neu

Το πρωτο-ογκογονίδιο HER-2/neu βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21 και κωδικοποιεί γλυκοπρωτεΐνη 1255 αμινοξέων, 185 kDa ($p185^{HER2}$) (εικόνα 3.1). Εντοπίσθηκε το 1985 από την ομάδα της Coussens [Coussens et al, 1985] με βάση την ομολογία της πρωτεΐνης με τον υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα, το γεγονός ότι το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι ταυτόσημο με το ογκογονίδιο neu, καθώς και από την εκτεταμένη ομοιότητα της

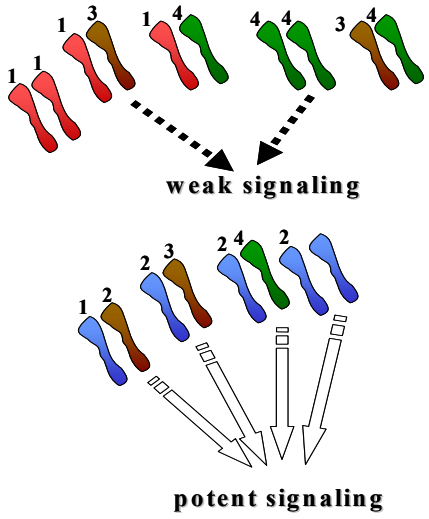
αλληλουχίας του γονιδίου HER-2/neu με το γονίδιο μετασχηματισμού του ιού ερυθροβλάστωσης των πτηνών (transforming avian erythroblastosis virus gene, από το οποίο προήλθε και η πρώτη ονομασία της, erbB) [Sartor, 2002]. Η πρωτεΐνη HER-2/neu και ο υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα έχουν 32 διαφορές που αντιστοιχούν στο 18.7% του μορίου, ενώ η μεγαλύτερη ομολογία εντοπίζεται στην περιοχή με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η περιοχή αυτή είναι σημαντική για τη λειτουργία των μορίων αυτών. Η μικρότερη ομολογία παρουσιάζεται στην καρβοξυτελική ουρά του ενδοκυτταρικού τμήματος, περιοχή που διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη μεταγωγή σήματος προς τον πυρήνα, λόγω της ύπαρξης αλληλουχιών σύνδεσης φωσφοτυροσινασών. Αυτή η περιοχή διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα 4 μέλη της οικογένειας, πράγμα που σημαίνει ότι ο κάθε υποδοχέας παρουσιάζει εξειδίκευση όσον αφορά στα βιοχημικά μονοπάτια που ενεργοποιεί και τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (βλέπε συνέχεια) [Reese et al, 1997].

3.1. Δομή των υποδοχέων της οικογένειας HER

Τα γονίδια HER κωδικοποιούν επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες σε ποικίλους τύπους κυττάρων, οι οποίες αποτελούνται από ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα πλούσιο σε κατάλοιπα κυστεΐνης και πιθανές θέσεις γλυκοζιλύωσης, μία μικρή υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα που περιλαμβάνει μια περιοχή με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης και μία καρβοξυ-τελική ουρά με αλληλουχίες για τη φωσφοριλύωση κινασών τυροσίνης [Foy et al, 2002]. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, ο υποδοχέας HER3 παρουσιάζει έλλειψη ορισμένων καταλοίπων στην καταλυτική περιοχή του μορίου, με συνέπεια να παρουσιάζει χαμηλή δραστικότητα κινάσης και ως εκ τούτου ελαττωμένη μεταγωγή σήματος προς τον πυρήνα [Hynes et al, 1994]. Όλοι οι υποδοχείς ενεργοποιούνται από δύο οικογένειες συνδετών 50 περίπου αμινοξέων, την οικογένεια του επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα και την οικογένεια των heregulin/neuregulin [Akiyama et al, 1986].

Οι υποδοχείς HER βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ως μονομερή. Η δέσμευση συγκεκριμένων συνδετών οδηγεί σε διμερισμό, σταθεροποίηση, παραγωγή αλληλουχίας σημάτων και τελικά σε κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και διαφοροποίηση. Υπάρχουν δέκα διαφορετικά διμερή που δύνανται να σχηματιστούν, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή (εικόνα 3.2) [Alroy et al, 1977]. Οι συνδέτες

των υποδοχέων HER παρουσιάζουν δύο περιοχές, μια υψηλής συγγένειας και μεγάλης ειδικότητας που δεσμεύεται στα μέλη HER1, HER3 ή HER4 και μία χαμηλής συγγένειας και μικρής ειδικότητας που δύναται μεν να συνδεθεί με οποιονδήποτε από τους τέσσερις υποδοχείς, αλλά ο τυπικός συνδέτης της είναι ο HER2. Δεν έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα συνδέτης με υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα HER2. Οι συνδέτες της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του διμερούς HER1-HER2, ενώ η οικογένεια των neuregulins οδηγεί στο σχηματισμό των HER2-HER3 και HER2-HER4 [Yarden, 2001a].



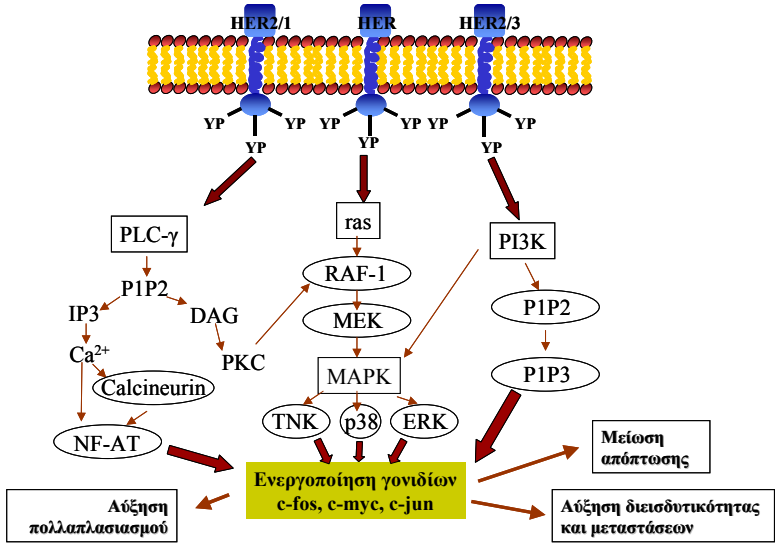
Εικόνα 3.2 Τα πιθανά διμερή των υποδοχέων της οικογένειας HER και η ισχύς του επαγόμενου ενδοκυτταρικού σήματος [Σωτηροπούλου, για την παρούσα διατριβή].

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα μετά τη δέσμευση του αντίστοιχου συνδέτη οδηγεί στη φωσφοριλύωση του ενδοκυτταρικού πρωτεϊνικού τμήματος που έχει ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, με συνέπεια τη μεταγωγή σήματος και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων. Από τα διμερή που σχηματίζονται, τα ετεροδιμερή με τη συμμετοχή του υποδοχέα HER2, δημιουργούν πιο σταθερά σύμπλοκα, με αποτέλεσμα να παρατείνεται η παραμονή τους στην κυτταρική μεμβράνη και συνεπώς να αυξάνεται η ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων (downstream signal transduction). Το πιο τυπικό ετεροδιμερές είναι το HER2-HER3 [Lohrisch et al, 2001].

3.2. Μεταγωγή σήματος (signaling) από τους υποδοχείς HER

Υπάρχουν τρία κύρια μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος, που ενεργοποιούνται με την αλληλεπίδραση του κατάλληλου συνδέτη με το διμερές των υποδοχέων HER. Το μονοπάτι της ενεργοποιημένης από το ras/μιτογόνο πρωτεϊνικής

κινάσης (η κύρια οδός που ενεργοποιείται), της φωσφατιδυλινοσιτιδικής 3'-κινάσης (phosphatidylinositide 3'-kinase, PI3K) και της φωσφολιπάσης C-γ (εικόνα 3.3). Ο τελικός αποδέκτης του σήματος είναι τα γονίδια που ελέγχουν τη μεταγραφή *c-fos, c-myc* και *c-jun* [Wang et al, 2001a]. Τα διμερή υποδοχέων της οικογένειας HER που δεν περιλαμβάνουν το μέλος HER2 επάγουν ασθενή σήματα. Εξάλλου, όταν ο υποδοχέας HER2 εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα, τα διμερή που τον εμπεριέχουν είναι λίγα σε αριθμό και η μεταγωγή σήματος μικρής ισχύος. Το γενικό αποτέλεσμα είναι η φυσιολογική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός του κυττάρου. Αντίθετα, αυξημένη έκφραση του HER2, οδηγεί σε αυξημένη μεταγωγή σήματος, αύξηση του αριθμού των μιτώσεων και τελικά καρκινικογένεση [Yarden et al, 2001b].



Εικόνα 3.3 Μεταγωγή σήματος από τα διμερή υποδοχέων της οικογένειας HER [Σωτηροπούλου, για την παρούσα διατριβή]

Φυσιολογικά, η λειτουργία του υποδοχέα HER2 ρυθμίζεται σύμφωνα με τον κυτταρικό κύκλο, μέσω της διαφορικής φωσφοριλύωσης καταλοίπων σερίνης ή/και θρεονίνης. Το ποσοστό των φωσφοριλυωμένων καταλοίπων τυροσίνης αγγίζει το μέγιστο κατά τις φάσεις G_0/G_1, μειώνεται κατά τις S και G_2 και αγγίζει το χαμηλότερο επίπεδο κατά την M φάση, οπότε και η δραστικότητα της κινάσης είναι η μέγιστη. Στα κύτταρα όπου έχουμε υπερέκφραση του HER2, παρουσιάζεται απώλεια του συγκεκριμένου συστήματος ελέγχου και παρουσιάζεται αυξημένη δραστικότητα κινάσης καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [Kiyokawa et al, 1995].

3.3. Υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu σε μορφές καρκίνου

Η πρωτεΐνη HER-2/neu φυσιολογικά εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα ποικίλων ιστών. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη και στο ανθρώπινο έμβρυο έχει εντοπιστεί στο νευρικό σύστημα, καθώς και στα αναπτυσσόμενα οστά, τους μύες, το δέρμα, την καρδιά, τους πνεύμονες και το επιθήλιο του εντέρου [Yarden et al, 2001a]. Στα φυσιολογικά κύτταρα το γονίδιο HER-2/neu υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο, ενώ αύξηση στα αντίγραφα αυτού (amplification) ή μεταλλαγή του εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό καρκινικών κυττάρων. Η περίπτωση της μετάλλαξης του γονιδίου με συνέπεια τη συνεχή δράση του υποδοχέα είναι εξαιρετικά σπάνια, ενώ συνήθης είναι η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων, η οποία οδηγεί στην υπερέκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης και συμβάλει στην έναρξη του καρκινικού μετασχηματισμού και την εξέλιξη της νόσου [Foy et al, 2002]. Η υπερέκφραση του γονιδίου οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων, τα οποία αλλάζουν τη φυσιολογική έκφραση άλλων γονιδίων και τελικά διαταράσσεται η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η ικανότητα μετανάστευσης και προσκόλλησης, καθώς και η δεκτικότητα σε προ-αποπτωτικά σήματα [Meric et al, 2002]. Η υπερέκφραση του γονιδίου HER-2/neu παρουσιάζεται σταθερή στον αρχικό όγκο και τις μακρινές μεταστάσεις, ενώ οι επιπτώσεις στην απώλεια της φυσιολογικής κυτταρικής ρύθμισης εξαρτώνται από το ποσοστό υπερέκφρασης [Chazin et al, 1992]. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu προκαλεί αύξηση της παραγωγής αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor-VEGF), ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, με συνέπεια την υποβοήθηση της αγγειογένεσης στον όγκο, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και μετάστασή του [Meric et al, 2002; Sartor, 2002].

Υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-2/neu έχει εντοπιστεί στο 25-30% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών στο 35-45% των παγκρεατικών καρκινωμάτων και στο 90% των όγκων του παχέως εντέρου [Maxwell-Armstrong et al, 1998], επίσης έχει εντοπιστεί σε μεγάλα ποσοστά άλλων τύπων καρκίνου, όπως της μήτρας (18-43%), του ενδομητρίου (10-52%), της ουροδόχου κύστεως (27-63%), του νεφρού (22-36%), της κεφαλής και του λαιμού (16-50%), του στομάχου (21-64%), του οισοφάγου (10-26%), του προστάτη (5-46%) [Xia et al, 1999] και του πνεύμονα (13-55%) [Koukourakis et al, 2000]. Έχει βρεθεί επίσης σε τύπους

καρκίνου των σιελογόνων αδένων [Press et al, 1994], ενώ πρόσφατα έχει εντοπισθεί και στην επιφάνεια κυττάρων μελανώματος [Eliopoulos et al, 2002].

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-2/neu έχει συνδυαστεί με επιθετική μορφή της νόσου, αυξημένη πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες και κακή πρόγνωση, τουλάχιστον όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, του παγκρέατος, του στομάχου, της κεφαλής και του λαιμού. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, τον τύπο όπου η πρωτεΐνη HER-2/neu έχει μελετηθεί περισσότερο, η υπερέκφρασή της συνδυάζεται μειωμένη επίδραση της χημειοθεραπείας, της ακτινοθεραπείας και της ορμονικής θεραπείας [Xia et al, 1999]. Πρόκειται δηλαδή για μόριο με προγνωστική αξία, που δύναται να καθοδηγήσει την επιλογή της κλασικής θεραπευτικής μεθόδου αντιμετώπισης [Ravdin, 2000].

3.4. Χρήση της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu ως καρκινικό δείκτη

Όσον αφορά στη χρήση μορίων ως καρκινικούς δείκτες, το Κολέγιο των Αμερικανών Παθολόγων (College of American Pathologists) αναγνωρίζει τρεις κατηγορίες δεικτών. Η κατηγορία Ι περιλαμβάνει δείκτες με προγνωστική αξία και πιθανή χρήση στην αντιμετώπιση του ασθενούς. Στην κατηγορία ΙΙ ανήκουν παράγοντες εκτενώς μελετημένοι, αλλά με αμφίβολη κλινική χρήση, ενώ στην κατηγορία ΙΙΙ τοποθετούνται όλοι οι υπόλοιποι δείκτες που δεν έχουν μελετηθεί πλήρως και δεν έχει αποδειχθεί η προγνωστική τους χρησιμότητα. Από τους δείκτες για χρήση στον καρκίνο του μαστού που προτάθηκαν το 2001 για εξέταση από την Αμερικανική Ένωση Κλινικής Ογκολογίας (American Society of Clinical Oncology) και συμπεριλάμβαναν μεταξύ άλλων την πρωτεΐνη p53, την καθεψίνη-D, το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο και το CA-15-3, μόνο η εκτίμηση των επιπέδων της πρωτεΐνης HER-2/neu συστήθηκε για τις εξετάσεις ρουτίνας [Wedad, 2001; Menard et al, 2001].

Για να χρησιμοποιηθεί βέβαια μια μέθοδος ανίχνευσης στην κλινική θα πρέπει να είναι ευαίσθητη, ακριβής, επαναλήψιμη και να είναι δυνατή η ομοιόμορφη εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε όλα τα εργαστήρια. Η εκτίμηση των επιπέδων της πρωτεΐνης HER-2/neu γίνεται στο επίπεδο του DNA με τις μεθόδους FISH, Southern blot και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), στο επίπεδο του RNA με Northern blot ή στο επίπεδο της πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία, ELISA και Western blot. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ανοσοϊστοχημεία λόγω κόστους και ευκολίας [Wedad et al, 2001]. Η απουσία ενός κοινού συστήματος εντοπισμού

της πρωτεΐνης HER-2/neu μειώνει την προγνωστική της αξία, ενώ για την ορθή αξιολόγησή της απαιτείται ο υπολογισμός όχι μόνο της παρουσίας αλλά και του βαθμού ενεργοποίησής της.

3.5. Προϋπάρχουσα ανοσία ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu σε ασθενείς με καρκίνο

Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη HER-2/neu αποτελεί μη μεταλλαγμένο μόριο που απαντάται φυσιολογικά στον οργανισμό, θα ήταν λογικό το συμπέρασμα ότι δεν είναι δυνατή η ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης εναντίον της. Παρόλα αυτά, Τ και Β λεμφοκύτταρα ειδικά για τη HER-2/neu έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με καρκίνο. Σημαντικό εξάλλου είναι το γεγονός ότι τα ειδικά αυτά κύτταρα και τα παραγόμενα αντισώματα δεν αναγνωρίζουν τα υγιή κύτταρα, τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα HER-2/neu, αλλά μόνο τα καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη [Disis et al, 1994; Lustgarten et al, 1997].

3.5.1. Χυμική ανοσία

Αντισώματα ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς σε αρχικά στάδια της νόσου, αποδεικνύοντας ότι η έκκρισή τους είναι ειδική και δεν σχετίζεται απλά με την ύπαρξη μεγάλου καρκινικού φορτίου, το οποίο απαντάται σε πιο προχωρημένα στάδια [Disis et al, 1997]. Τα αντισώματα κατευθύνονται ενάντια στην εξωκυτταρική περιοχή του μορίου, την ενδοκυτταρική περιοχή ή και τις δύο. Το ποσοστό των ασθενών με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών που εμφανίζει αντισώματα στον ορό κυμαίνεται από 50% έως 55%, αλλά μόνο το 10%-15% παρουσιάζει υψηλό τίτλο (>1:1000). Υψηλός τίτλος αντισωμάτων ενάντια στη HER-2/neu έχει εντοπισθεί και σε ασθενείς με καρκίνο του εντέρου (14%) και του προστάτη (15.5%). Η πρόοδος της νόσου αναστέλλει την παραγωγή των ειδικών αντισωμάτων, δεδομένου ότι μόνο το 7% των ασθενών με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών εμφανίζει ανιχνεύσιμο ποσό αντισωμάτων του ισότυπου IgG στα στάδια III και IV [βλέπε ανασκόπηση στο Baxevanis et al, 2004].

3.5.2. Κυτταρική ανοσία

Ειδικά Τ λεμφοκύτταρα, που αποδεικνύουν την ύπαρξη κυτταρικής ανοσίας ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς των οποίων τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη [Disis et al, 1994; Disis et al, 2000].

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι έχει καμφθεί η φυσική ανοχή ενάντια σε εαυτά μόρια. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης ενάντια σε επιτόπους του αντιγόνου που δεν είναι επικρατείς (subdominant), δεδομένου ότι τα Τ κύτταρα που είναι ειδικά για τους επιτόπους που προσδένονται ισχυρά στον TCR έχουν εξαλειφθεί με την αρνητική επιλογή στο θύμο αδένα [Sercarz et al, 1993].

Σε μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Disis, από τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών σε προχωρημένο στάδιο, το 11% εμφάνιζε ειδικά για τη HER-2/neu $CD4^+$ λεμφοκύτταρα [Disis et al, 2000]. Το μειονέκτημα της ανίχνευσης Τ κυττάρων σε σχέση με την ανίχνευση αντισωμάτων είναι ότι οι περισσότερες χρησιμοποιούμενες μέθοδοι δεν έχουν την κατάλληλη ευαισθησία για τον εντοπισμό τόσο μικρών συχνοτήτων ειδικών κυττάρων. Πολλές ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν *in vitro* ευαισθητοποίηση και πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, με συνέπεια όμως να αλλοιώνεται το αποτέλεσμα. Σε ερευνητική μελέτη της ομάδας μας, στα πλαίσια της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήσαμε μια ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης λειτουργικών ειδικών Τ κυττάρων και εντοπίσαμε αυξημένο ποσοστό ασθενών με κυτταρική ανοσία για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu (25-60% ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πεπτίδιο και το μελετούμενο αλλήλιο MHC) [βλέπε «Αποτελέσματα» και Sotiropoulou et al, 2003a; Sotiropoulou et al, 2003b].

3.6. Ανοσογονικά πεπτίδια προερχόμενα από την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu

Στο κεφάλαιο της ανοσοθεραπείας του καρκίνου αναφερθήκαμε εκτενώς στα χαρακτηριστικά των πεπτιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαγωγή ανοσολογικής απάντησης ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των πεπτιδίων αυτών. Με βάση τη δομή της πρωτεΐνης HER-2/neu, έχουν εντοπισθεί πεπτίδια που δύνανται να προσδεθούν τόσο στα μόρια MHC τάξης Ι, όσο και τάξης ΙΙ και συνεπώς να επάγουν ολοκληρωμένη ανοσολογική απόκριση.

Το πρώτο πεπτίδιο που απομονώθηκε ήταν το HER-2 (369-377), ως επίτοπος που δύναται να δεσμευθεί στα μόρια HLA-A2 και να αναγνωρισθεί από ειδικά για τον αντίστοιχο όγκο λεμφοκύτταρα σε καρκίνο των ωοθηκών [Fisk et al, 1995]. Αργότερα επιβεβαιώθηκε η έκφρασή του και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, των νεφρών, καθώς και στο μελάνωμα [βλέπε ανασκόπηση στην αναφορά

Baxevanis et al, 2004]. Η ομάδα του καθηγητή Kiessling ανέπτυξε από ασκητικό υγρό HLA-$A2^+$ ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών σειρές και κλώνους Τ κυττάρων που αναγνώριζαν τα πεπτίδια HER-2 (435-443), (665-673), (689-697) και (952-960) επάνω σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών, του μαστού, του εντέρου, καθώς και καρκινικές σειρές μελανώματος [Rongcun et al, 1999]. Τα πεπτίδια HER-2 (5-13), (48-56) και (1023-1032) προκάλεσαν κυτταροτοξικές απαντήσεις Τ κυττάρων απέναντι σε καρκινικά κύτταρα μαστού, εντέρου, πνεύμονα και νεφρού [Scardino et al, 2001]. Επίσης, το πεπτίδιο HER-2 (689-697) αναγνωρίσθηκε από CTL καρκίνου του στομάχου [Kono et al, 1998], ενώ πιο πρόσφατα, ερευνητές του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τα πεπτίδια HER-2 (369-377), (665-673) και (689-697) μπορούν να αναγνωρισθούν και από NKT κύτταρα [Baxevanis et al, 2002].

Εκτός από το αλλήλιο HLA-A2, έχει εξετασθεί η ύπαρξη επιτόπων της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu που αναγνωρίζονται από άλλα αλλήλια του MHC. Κατ' αυτό τον τρόπο, το πεπτίδιο HER-2 (754-762) αναγνωρίσθηκε από CTL κύτταρα υγιούς δότη επάνω στην κυτταρική σειρά καρκίνου του εντέρου SW403 μέσω μορίων MHC της υπεροικογένειας HLA-A3 και μάλιστα μέσω τεσσάρων διαφορετικών κοινά απαντούμενων αλληλίων (HLA-A* 1101, -A* 3101, -A* 3301 and -A* 6801). Το πεπτίδιο HER-2 (654-662) εντοπίσθηκε σε συνδυασμό με μόρια HLA-A27 στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων του μαστού, των ωοθηκών, του παγκρέατος και του πνεύμονα, ενώ τα HER-2 (63-71) και (780-788) δύνανται να επάγουν HLA-A24 περιοριζόμενες ανοσολογικές αποκρίσεις [βλέπε ανασκόπηση στην αναφορά Baxevanis et al, 2004].

Όσον αφορά σε επιτόπους που συνδέονται με μόρια MHC τάξης ΙΙ επάγοντας την ενεργοποίηση των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων, οι HER-2 (396-406), HER-2 (776-788) και HER-2 (884-899) έχουν δειχθεί ότι οδηγούν στον πολλαπλασιασμό και την έκκριση κυτταροκινών Th κυττάρων ασθενών με καρκίνο μαστού και ωοθηκών [Anderson et al, 2000; Disis et al, 1996; Fisk et al, 1997]. Η ερευνητική μας ομάδα έδειξε πρόσφατα ότι το πεπτίδιο HER-2 (883-899) δύναται να αναγνωρισθεί από Th κύτταρα υγιών δοτών μέσω των αλληλίων HLA-DR1, HLA-DR4, HLA-DR52 και HLA-DR53 [Perez et al, 2002], ενώ το HER-2 (776-788) μέσω των HLA-DR4, DR7, και DR51 [Sotiriadou et al, 2001].

Τα πεπτίδια που δύνανται να παρουσιασθούν από περισσότερα του ενός αλλήλια MHC παρέχουν τη δυνατότητα ευρείας χρήσης τους σε εμβόλια για τον καρκίνο, καθώς απευθύνονται σε μεγαλύτερο τμήμα του πληθυσμού.

Στον πίνακα που ακολουθεί ανακεφαλαιώνονται τα ανοσογονικά πεπτίδια που έχουν ταυτοποιηθεί από την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu:

Επίπτοποι συνδεόμενοι με μόρια MHC τάξης I			**Επίπτοποι συνδεόμενοι με μόρια MHC τάξης II**		
Θέση	**HLA**	**Αναφορά**	**Θέση**	**HLA**	**Αναφορά**
5-13	A2	Kawashima et al., 1999	62-76	DR4/15, DR51, DR53, DQ6/7	Kobayashi et al., 2000
8-16	A24	Kawashima et al., 1999	605-619	DR4/15, DR51, DR53, DQ6/7	Kobayashi et al., 2000
48-56	A2	Koegh et al., 2001	765-783	DR4/15, DR51, DR53, DQ6/7	Kobayashi et al., 2000
63-71	A24	Kawashima et al., 1999	776-788	DR51, DR7, DR4	Sotiriadou et al., 2001
106-114	A2	Kono et al., 1998	777-789	DR4	Tuttle et al., 1998
171-179	A2	Σωτηροπούλου, για την παρούσα διατριβή	822-836	DR1/11, DR51, DR52, DQ5/7	Kobayashi et al., 2000
369-377	A2	Fisk et al., 1995	883-899	DR1/11, DR4, DR51, DR52, DR53, DQ6/7	Kobayashi et al., 2000
435-443	A2	Kawashima et al., 1999	884-899	DR4	Perez et al., 2002
654-662	A2	Yoshino et al., 1994			
665-673	A2	Rongcun et al., 1999			
689-697	A2	Rongcun et al., 1999			
754-762	A3	Koegh et al., 2001			
	A11				
	A33				
773-782	A2	Lustgarten et al., 1997			
780-788	A24	Kawashima et al., 1999			
785-794	A2	Rongcun et al., 1999			
789-797	A2	Fisk et al., 1995			
799-807	A2	Fisk et al., 1995			
952-961	A2	Rongcun et al., 1999			
1023-1032	A2	Scardino et al., 2001			

3.7. Ανοσοθεραπεία του καρκίνου βασιζόμενη στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu

Η ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu αποτελεί έξοχο στόχο ανοσοθεραπείας του καρκίνου, δεδομένης της ευρείας έκφρασής της αφενός και της προϋπάρχουσας ανοσολογικής απάντησης στους ασθενείς αφετέρου. Οι κίνδυνοι από τη δημιουργία ανοσολογικής απάντησης ενάντια σε μια πρωτεΐνη που υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό είναι ένας περιορισμός, αλλά η υπερέκφρασή της από τα καρκινικά κύτταρα παρέχει τη δυνατότητα μιας επιλεκτικότητας χωρίς τη δημιουργία αυτοανοσίας. Η ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu έχει αποτελέσει συχνά χρησιμοποιούμενη βάση στις κλινικές δοκιμές μεθόδων ανοσοθεραπείας. Έχουν μελετηθεί μέθοδοι επαγωγής χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό.

3.7.1. Αντισώματα ενάντια στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu

Η μόνη εγκεκριμένη ανοσοθεραπευτική μέθοδος ειδική για τη HER-2/neu είναι το trastuzumab (Herceptin™, Genetech Inc, South San Francisco, CA), ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντί- HER-2/neu αντίσωμα παραγόμενο σε ποντίκι, το οποίο σημείωσε την έναρξη για την ειδική θεραπευτική αντιμετώπιση των τύπων καρκίνου του μαστού που είναι ανθεκτικοί στην ορμονική θεραπεία [Piccart et al, 2001]. Η θεραπεία με το Herceptin παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα περίπου στο 20% των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του μαστού [Fountzilas et al, 2003]. Πιστεύεται ότι η δέσμευση του αντισώματος στον υποδοχέα οδηγεί στην εσωτερικοποίηση της πρωτεΐνης HER-2/neu και συνεπώς ελάττωση της έκφρασής της στην επιφάνεια του κυττάρου. Η απώλεια της HER2/neu από την επιφάνεια του κυττάρου οδηγεί στη μείωση της ημίσειας ζωής των διμερών μέσω λυσοσσωμικής διάσπασής τους. Εξάλλου, η εσωτερικοποίηση της πρωτεΐνης δύναται να οδηγήσει στην πρόκληση απόπτωσης μέσω ανάπτυξης σημάτων απόπτωσης [Foy et al, 2002] ή σε κυτταροτοξικότητα κυτταρικής μεσολάβησης εξαρτώμενη από αντισώματα (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-ADCC) [Scher, 2000]. Έξάλλου, το Herceptin ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα στην κυτταροτοξική δράση των χημειοθεραπευτικών μέσων ενισχύοντας τη δράση τους. Παρά την επανάσταση που έφερε η εφαρμογή του Herceptin στις θεραπευτικές μεθόδους που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια, η εφαρμογή του έχει συνδυαστεί με ποικίλες καρδιολογικές επιπτώσεις, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς υποτροπιάζουν [Wang et al, 2001a; Wang et al, 2001b].

3.7.2. Εμβόλια βασισμένα σε πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu

Στις περισσότερες κλινικές δοκιμές μέχρι σήμερα έχει χρησιμοποιηθεί το πεπτίδιο HER-2 (369-377). Η ομάδα του Zaks χορήγησε το πεπτίδιο αυτό χρησιμοποιώντας ως ανοσοενισχυτικό Incomplete Freund's adjuvant (IFA), το οποίο επήγαγε την *in vitro* δημιουργία ειδικών κυτταροτοξικών Τ κυττάρων, που δεν μπορούσαν όμως να αναγνωρίσουν HER-2/neu$^+$ καρκινικές σειρές [Zaks et al, 1998]. Σε άλλη κλινική δοκιμή με τη χρήση GM-CSF ως ανοσοενισχυτικού, δημιουργήθηκε αντίδραση υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου *in vivo* και αντίδραση των ειδικών κυττάρων *in vitro*, χωρίς όμως κλινική απάντηση [Murray et al, 2000]. Παρόμοιο πρωτόκολλο χρησιμοποίησε και η ομάδα της Disis, με αποτέλεσμα τη

δημιουργία αυξημένων συχνοτήτων ειδικών CTL, τα οποία όμως είχαν διάρκεια επιβίωσης μικρότερη των 5 μηνών [Knutson et al, 2002]. Τέλος, σε κλινική δοκιμή ασθενών με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών με τα πεπτίδια HER-2 (369-377) και (654-662), επιτεύχθηκε η δημιουργία λειτουργικών κυτταροτοξικών Τ κυττάρων με μόνο τον έναν όμως από τους έξι ασθενείς να επιδείξει σταθερή νόσο [Brossart et al, 2000].

Με ένα διαφορετικό πρωτόκολλο η ομάδα της Disis πέτυχε την επαγωγή λειτουργικών Th και CTL ταυτόχρονα, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί κλινική απάντηση. Το νέο πρωτόκολλο συνίστατο σε ανοσοποίηση με μεγάλα πεπτίδια με δυνατότητα δέσμευσης σε μόρια MHC τάξης ΙΙ, που εμπεριείχαν ταυτόχρονα επιτόπους που δεσμεύονταν σε μόρια MHC τάξης Ι [Knutson et al, 2001; Disis et al, 2002].

Τα αποτελέσματα των κλινικών αυτών δοκιμών υποδεικνύουν ότι η πρόκληση ανοσολογικής απάντησης και η δημιουργία ειδικών βοηθητικών και κυτταροτοξικών Τ κυττάρων δεν είναι αρκετή για την αντιμετώπιση του όγκου. Πιθανά η χρήση πολλαπλών επιτόπων ή ο συνδυασμός χυμικής και κυτταρικής ανοσοθεραπευτικής προσέγγισης να έχει πιο αποτελεσματική κλινική αντίδραση.

3.7.3. Έγχυση κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων γενετικά τροποποιημένων ώστε να εκφράζουν χιμαιρικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη HER-2/neu

Οι χιμαιρικοί υποδοχείς αποτελούνται από ένα αντίσωμα απλής αλυσίδας της μεταβλητής περιοχής (single-chain antibody fragment, scFv) συντηγμένο με τη ζ αλυσίδα του συμπλόκου TCR/CD3. ή την γ αλυσίδα των υποδοχέων των σταθερών περιοχών (Fc) των ανοσοσφαιρινών IgG ή IgE. Ο μετασχηματισμός Τ κυττάρων με τους υποδοχείς αυτούς, επιτρέπει στα κύτταρα να αποκρίνονται μέσω των υποδοχέων ειδικά για το αντιγόνο, αλλά ανεξάρτητα από τα μόρια MHC [Gritzapis et al, 2003]. Η μεθοδολογία αυτή δεν έχει ακόμα εφαρμοστεί σε κλινικές δοκιμές, αλλά μοντέλα πειραματοζώων δείχνουν ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια πιο γενικευμένη μέθοδο ανοσοθεραπείας.

Για το σχεδιασμό ενός αποτελεσματικού εμβολίου βασισμένου στην πρωτεΐνη HER-2/neu πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι πρόκειται για αντιγόνο που εκφράζεται σε ποικίλους φυσιολογικούς τύπους κυττάρων. Παρά ταύτα, η ανοχή μπορεί να

ξεπεραστεί. Η ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων, καθώς και ειδικών Τ κυττάρων ενάντια σε διάφορους επιτόπους της πρωτεΐνης HER-2/neu δείχνει ότι η υπερέκφραση του μορίου δύναται να προκαλέσει ανοσολογική απάντηση, με τη διαφορά ότι δεν είναι επαρκής για την καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων [Disis et al, 2001].

Η ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu είναι κάτι παραπάνω από ένας απλός καρκινικός δείκτης, δεδομένου ότι η ενεργοποίησή του επηρεάζει την παθογένεση και την κλινική επιθετικότητα της νόσου [Scher, 2000], γεγονός που της επιτρέπει να εξελιχθεί σε έναν κλινικά πολύτιμο δείκτη και ένα αποτελεσματικό θεραπευτικό προϊόν. Με τη χρησιμοποίηση ανοσοθεραπευτικών μεθόδων ειδικών για την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu αποφεύγουμε την παρεμπόδιση της λειτουργίας των υπόλοιπων μελών της οικογένειας. Αυτό είναι σημαντικό για την πρωτεΐνη HER4, η δράση της οποίας παρουσιάζεται ογκοκατασταλτική [Sartor, 2002].

4. ΣΚΟΠΟΣ

Η ταυτοποίηση ογκοειδικών αντιγόνων, τα οποία αναγνωρίζονται από τα Τ λεμφοκύτταρα, έδωσε ιδιαίτερη ώθηση στην ανάπτυξη της κατευθυνόμενης από τα Τ κύτταρα ανοσολογικής απάντησης, στο επίπεδο τόσο της έρευνας της ανοσολογίας του καρκίνου, όσο και της κλινικής ανοσοθεραπευτικής εφαρμογής και έθεσε τις βάσεις για τη χρησιμοποίηση πεπτιδικών εμβολίων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Από την πληθώρα των γνωστών καρκινικών αντιγόνων, έχουν ταυτοποιηθεί κατά κύριο λόγο επίτοποι ικανοί να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης I και συνεπώς να επάγουν την ενεργοποίηση των $CD8^+$ Τ κυττάρων, δεδομένου ότι οι περισσότεροι όγκοι είναι θετικοί ως προς τα μόρια MHC τάξης I, αλλά αρνητικοί ως προς τα μόρια MHC τάξης II. Επιπρόσθετα, τα $CD8^+$ Τ κύτταρα μπορούν να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα απευθείας, μέσω της αναγνώρισης του συμπλόκου MHC τάξης I-πεπτιδίου που εκφράζεται στην επιφάνεια του όγκου.

Τα τελευταία χρόνια, δεδομένης της αναγνώρισης του κεντρικού ρόλου των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων στην έναρξη, οργάνωση και διατήρηση της ανοσολογικής απάντησης, έχουν αναγνωριστεί και αρκετοί επίτοποι που αναγνωρίζονται από μόρια MHC τάξης II. Πρόσφατες κλινικές μελέτες και προκλινικά μοντέλα έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με επιτόπους που δύνανται να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης II, οι οποίοι εμπεριέχουν αλληλουχίες σύνδεσης για τα μόρια MHC τάξης I, είναι αποτελεσματικοί στην ταυτόχρονη ανάπτυξη βοηθητικών και κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων με μακρά διάρκεια ζωής in vivo.

Από τα γνωστά καρκινικά αντιγόνα, η πρωτεΐνη HER-2/neu παρουσιάζει το πλεονέκτημα της υπερέκφρασης σε ποικίλους τύπους καρκίνου, ενώ οι ασθενείς των οποίων όγκοι την υπερεκφράζουν παρουσιάζουν προϋπάρχουσα ανοσία ενάντια σε πεπτίδια αυτής. Η αυξημένη έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα και το γεγονός ότι πρόκειται για εξωμεμβρανική πρωτεΐνη την καθιστούν στόχο για ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τόσο κυτταρική όσο και χυμική ανοσία. Κλινικές έρευνες με χρήση πεπτιδίων της HER-2/neu έχουν δείξει την πρόκληση ανοσολογικής απάντησης στην πλειονότητα των ασθενών. Παρόλα αυτά, οι μεταστατικοί τύποι καρκίνου που υπερεκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη παραμένουν μη θεραπεύσιμοι. Συνεπώς, υπάρχει άμεση ανάγκη για νέες προοπτικές θεραπείας και στο σημείο αυτό η διερεύνηση των πιο ανοσογονικών τμημάτων της αλληλουχίας της

πρωτεΐνης HER-2/neu, καθώς και της αντίδρασης των ασθενών σε αυτά, αποτελούν στόχο για ειδικές νέες αντικαρκινικές θεραπείες.

Έχοντας ως βάση αναφοράς τα προαναφερθέντα και προσεγγίζοντας την ανοσοθεραπεία του καρκίνου μέσα από τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων που μετέχουν στην ανοσολογική απόκριση ενάντια στα κύτταρα του όγκου, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη διερεύνηση των ακόλουθων θεμάτων:

i. Ανάπτυξη ενός καλά καθορισμένου συστήματος για την επαναλήψιμη επαγωγή $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων με μακρά βιωσιμότητα και λειτουργικότητα ενάντια σε ανοσογονικά πεπτίδια ογκοπρωτεϊνών.
ii. Ταυτοποίηση συνθετικών πεπτιδίων της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, τα οποία παρουσιάζουν επιτόπους αναγνωριζόμενους τόσο από $CD4^+$ όσο και από $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα.
iii. Δημιουργία λειτουργικών $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυτταρικών σειρών και κλώνων ενάντια στα νέα πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu.
iv. Ανάπτυξη συστήματος ελέγχου της συνεργασίας των $CD4^+$ και των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων τόσο στο επίπεδο της πρωτογενούς ευαισθητοποίησης (priming), όσο και της διατήρησης ή/και αύξησης της κυτταροτοξικής δράσης των τελευταίων.
v. Υπολογισμός της συχνότητας κυτταροτοξικών Τ κυττάρων ειδικών για συχνά χρησιμοποιούμενα σε μελέτες ανοσοθεραπείας πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu σε ασθενείς με επιθηλιακούς όγκους που υπερεκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Ο απώτερος στόχος μίας τέτοιας μελέτης είναι η χρήση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν στη θεραπεία του καρκίνου, μέσα από την επίκτητη ανοσοθεραπεία με τη χρήση των παραγόμενων λειτουργικών κυττάρων ή την ενεργητική ανοσοθεραπεία, μέσα από τη χρήση των νέων πεπτιδίων στη δημιουργία αποτελεσματικών εμβολίων.

5. ΥΛΙΚΑ

5.1. Καλλιεργητικά υλικά και αντιδραστήρια

Τα καλλιεργητικά υλικά RPMI-1640, Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) και McCoy's 5A, το διάλυμα αλάτων Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) και η L-γλουταμίνη ήταν της Life Technologies, ενώ το θρεπτικό υλικό x-vivo 15 ήταν της BioWittaker. Ο βόειος εμβρυϊκός ορός (FCS) και το διάλυμα Ficoll Separating Solution της Biochrom AG. Το αντιβιοτικό γενταμυκίνη (Garamycin) ήταν της εταιρίας Schering-Plough. Την ινσουλίνη (Humulin Regular) προμηθευτήκαμε από την εταιρία Lilly. Από την εταιρία Sigma προήλθαν η φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA), το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO), το Tween-20, η χρωστική κυανούν του τρυπανίου (trypan blue), το διάλυμα μπλε της βρωμοφαινόλης/φορμαμιδίου (RNA loading buffer) και όλα τα ανόργανα και οργανικά στοιχεία και οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις παρασκευές των διαφόρων διαλυμάτων. Η κυκλοσπορίνη Α (Sandimmun) ήταν της εταιρίας Novartis, η μιτομικίνη C της Kyowa, ενώ οι παστίλιες PBS της.Gibco BRL (Life Technologies).

Οι κυτταροκίνες IL–4, IL-7, IL-12 και TNF-α προήλθαν από την εταιρία R&D Systems, η IL-2 από την Chiron Corporation, η IFN-γ από την Boehringer-Mannheim, ενώ ο GM-CSF από την εταιρία Immunex**.** Τα αντισώματα για καλλιέργεια αντί-HLA-DR και αντί-HLA-A, -B, -C, όπως και το αντίσωμα αντί-IFN-γ για ανοσοενζυμικές δοκιμασίες και το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα αντί-IFN-γ προήλθαν από την PharMingen, ενώ το υπερκείμενο υβριδώματος αντί-HLA-DR4 από την Terra Nova Biotechnology. Το σύζευγμα στρεπταβιδίνης/αλκαλικής φωσφατάσης, το ενζυμικό της υπόστρωμα BCIP/NTB, καθώς και το διάλυμα TBE προμηθευτήκαμε από την Bio-Rad Laboratories. Το σύζευγμα στρεπαβιδίνης/υπεροξειδάσης της ραπανίδος πήραμε από την εταιρία DAKO A/S. Από την εταιρία Seramun προήλθε το TMB, ενώ από τη Merck η παραφορμαλδεΰδη-α.

Όλα τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της ερευνητικής αυτής μελέτης παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Φυσικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Tuebingen και ήταν ευγενική προσφορά των W. Voelter και H. Echner. Η καθαρότητά τους ήταν πάντα μεγαλύτερη του 95%.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής, καθώς και τα έτοιμα συστήματα δοκιμασιών (kits) περιγράφονται στις επιμέρους παραγράφους.

Από την εταιρία Amersham Pharmacia Biotech προμηθευτήκαμε την τριτιωμένη θυμιδίνη [^{3}H] TdR και το ^{51}Cr (με τη μορφή διχρωμικού νατρίου), ενώ το υγρό σπινθηρισμού (Aquasafe 300 Plus) από την Zinsser Analytic.

Η αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II RNase H(-) Reverse Transcriptase ήταν της Invitrogen και η πολυμεράση Taq DNA Polymerase της Fermentas. Η χρωστική Gel Star της FMC BioProducts.

Οι φιάλες και οι μικροπλάκες καλλιέργειας, καθώς και τα φιαλίδια κατάψυξης ήταν της Costar-Corning Incorporated, οι μικροπλάκες με πυθμένα PVDF (Multi-Screen-IP) της Millipore, ενώ οι σωλήνες φυγοκέντρησης της εταιρίας Falcon.

Εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά

Πλήρες RPMI: RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FCS, 2mM L-γλουταμίνη και 50 μg/ml γενταμυκίνη.

Πλήρες DMEM: DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS, 2mM L-γλουταμίνη, 1% ινσουλίνη και 50 μg/ml γενταμυκίνη.

Πλήρες McCoy's: McCoy's εμπλουτισμένο με 10% FCS, 2mM L-γλουταμίνη και 50 μg/ml γενταμυκίνη.

Βασικό θρεπτικό υλικό: X-VIVO 15 εμπλουτισμένο με 10 ng/ml IL-7 και pg/ml IL-12.

5.2. Εργαστηριακά όργανα

Όλες οι διαδικασίες στείρου περιβάλλοντος πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής Holten (model 1,2). Οι καλλιέργειες κυττάρων έγιναν σε επωαστικό κλίβανο Napco-5420 στους 37^{o}C, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας. Για τον έλεγχο των καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε ανεστραμμένο μικροσκόπιο Olympus CK2. Για τη μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Olympus CHB, ενώ για τη μέτρηση των κηλίδων στις ανοσοενζυμικές τεχνικές στερεοσκόπιο Zeiss, Stemi 2000-C. Η ψηφιακή φωτογραφική μηχανή ήταν της Spot Insight Color, ενώ το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image-Pro Plus της Image Analysis Systems. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε με μετρητή Dynatech MR5000.

Στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής ροής FACSCalibur της Becton Dickinson και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Cell Quest ή Paint-A-Gate της ίδιας εταιρίας. Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall RT6000B.

Ο μετρητή γ ακτινοβολίας ήταν Riastar της Packard και ο μετρητής β ακτινοβολίας της LKB Wallac Turku.

Ο θερμικός κυκλοποιητής ήταν της εταιρίας της MJ Research και το φασματοφωτόμετρο U-2000 της Hitachi. Η τράπεζα οπτικοποίησης γέλης αγαρόζης ήταν της Vilber Lourmat.

6. ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1. Κατάψυξη κυττάρων

Τα αποθέματα κυττάρων διατηρούνται κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο, στους -195^{o}C. Τα προς ψύξη κύτταρα πρέπει να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Το εναιώρημά τους τοποθετείται σε σωλήνα φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται στα 700 g για 5 λεπτά. Μετά την απόχυση του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρείται σε 3-10*10^{6} κύτταρα/ml διαλύματος 10% DMSO σε FCS και μεταφέρεται σε φιαλίδια κατάψυξης (0,5-1 ml/φιαλίδιο). Τα φιαλίδια τοποθετούνται για μία ώρα στους –20^{o}C, στη συνέχεια για μία ώρα στους -80^{o}C και τέλος σε δοχείο υγρού αζώτου.

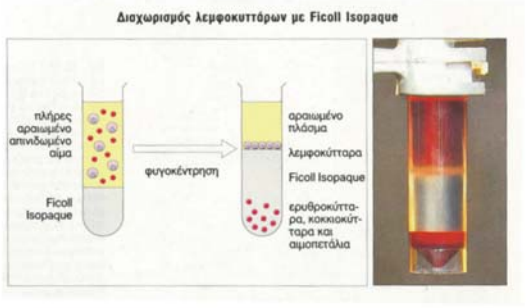
6.2. Απόψυξη κυττάρων

Το φιαλίδιο κατάψυξης αποσύρεται από το υγρό άζωτο και τοποθετείται τάχιστα σε υδατόλουτρο 37^{o}C έως ότου γίνει πλήρης τήξη του εναιωρήματος. Με πιπέτα Pasteur προστίθεται στάγδην 1 ml θρεπτικού υλικού RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 20% FCS, εκτός αν πρόκειται για DC, οπότε προστίθεται 1ml x-vivo 15 εμπλουτισμένο με 10% αυτόλογο ορό. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάριο φυγοκέντρου με 4 ml του ίδιου θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρείται στα 700 g για 5 λεπτά. Μετά την απόχυση του υπερκειμένου το ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό ανάλογο με το είδος των κυττάρων και την πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

6.3. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα (Peripheral blood Monoconuclear Cells, PBMC)

Η λήψη περιφερικού αίματος γίνεται σε ηπαρινισμένη σύριγγα ή σε ασκό αιμοληψίας. Το αίμα επιστρώνεται σε ίσο όγκο Ficoll Separating Solution ανά 25 ml σε στείρους δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 700 g για 25 λεπτά. Το αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης είναι η δημιουργία τεσσάρων

στιβάδων. Στον πυθμένα του σωληναρίου βρίσκονται τα ερυθρά και τα πολυμορφοπύρηνα λευκά αιμοσφαίρια, ακολουθεί το Ficoll Separating Solution, επάνω στο οποίο βρίσκεται η πολύ λεπτή στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων και πάνω από αυτήν το πλάσμα (βλέπε εικόνα).



Το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάρια των 15 ml, απενεργοποιείται για μισή ώρα στους 56^{o}C και φυλάσσεται στους –20^{o}C, ενώ η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων μεταφέρεται σε νέους σωλήνες των 50 ml και εκπλένεται 2 φορές με διάλυμα HBSS. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer και χρησιμοποιούνται άμεσα ή καταψύχονται για μελλοντική χρήση.

6.4. Απομόνωση καρκινικών κυττάρων ασθενών από ασκιτικό ή πλευριτικό υγρό

Το ασκιτικό ή το πλευριτικό υγρό διαμοιράζεται σε κωνικά δοχεία φυγοκέντρου των 250 ml και φυγοκεντρείται στα 400 g για 5 λεπτά. Ακολουθεί επίστρωση των κυττάρων σε 10 ml Ficoll Separating Solution 75% σε νερό, επιστρωμένο σε 15 ml Ficoll Separating Solution 100% και φυγοκέντρηση στα 700 g για 25 λεπτά. Το ασκιτικό ή το πλευριτικό υγρό συλλέγονται ως ανώτερη στιβάδα και καταψύχονται στους –20^{o}C. Τα καρκινικά κύτταρα συλλέγονται ως λευκή στιβάδα επάνω από τη στρώση του 75% Ficoll Separating Solution και μετράται ο αριθμός τους και η πρόσμιξη από διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα (η διάκριση γίνεται με βάση το μέγεθος, όπως εκτιμάται από την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο). Τμήμα των κυττάρων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό επιφανειακών μορίων με κυτταρομετρία ροής, ενώ τα υπόλοιπα καταψύχονται για μελλοντική χρήση ή καλλιεργούνται σε φιάλες καλλιέργειας σε πλήρες DMEM ή RPMI-1640.

6.5. Απομόνωση καρκινικών κυττάρων ασθενών από τμήμα όγκου

Το τμήμα όγκου τοποθετείται σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640, τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια με νυστέρι και στη συνέχεια ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή από Teflon. Τα προκύπτοντα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με HBSS εμπλουτισμένο με 2% FCS και μετρώνται για τον υπολογισμό του αριθμού τους, καθώς και της πρόσμιξης από διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία που

περιγράφεται στην παράγραφο 6.4. Όπου απαιτήθηκε επαγωγή της επιφανειακής έκφρασης μορίων HLA-DR4 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, έγινε μέσω προσθήκης στο θρεπτικό υλικό 100 IU/ml IFN-γ για 2 ημέρες.

6.6. Μέτρηση βιωσιμότητας

Η μέτρηση της βιωσιμότητας γίνεται με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής κυανούν του τρυπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα. Μικροποσότητα καλλιέργειας (90 μl) επωάζεται με 10 μl 2% διαλύματος της χρωστικής σε φυσιολογικό ορό για 2 λεπτά στους 37^{o}C. Το εναιώρημα τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και μετρούνται τα κύτταρα που έχουν απορροφήσει τη χρωστική (μπλε χρώμα) σε σύνολο 500 κυττάρων. Η βιωσιμότητα αντιστοιχεί στο ποσοστό % των άβαφων (ζωντανών) κυττάρων στο σύνολο των μετρηθέντων.

6.7. Δημιουργία υποστηρικτικού πληθυσμού κυττάρων (feeders)

Όταν απαιτείται υποστηρικτικός πληθυσμός κυττάρων, ο κατάλληλος αριθμός PBMC, αμέσως μετά την απομόνωσή τους ή αποψυγμένα, τοποθετούνται σε σωληνάριο των 25 ml με βάση, φυγοκεντρούνται στα 700g για 5 λεπτά και επαναιωρούνται σε 3 ml πλήρους RPMI-1640. Το σωληνάριο τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml μέσα σε θρυμματισμένο πάγο. Το εναιώρημα ακτινοβολείται στα 4500cGy. Τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με διάλυμα HBSS για την απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών, επαναιωρούνται στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό και χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια.

6.8. Απομόνωση κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια

Για την απομόνωση κυττάρων θετικών ή αρνητικών για συγκεκριμένα επιφανειακά μόρια , χρησιμοποιούνται σφαιρίδια που φέρουν στην επιφάνειά τους αντισώματα ειδικά για τα δεδομένα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας. Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιούμε είναι της εταιρίας Miltenyi και το πρωτόκολλο, όπως προτείνει η κατασκευάστρια εταιρία, είναι το ακόλουθο:

Τα συνολικά κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 700 g για 5 λεπτά. Μετά την απόχυση του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρείται σε 80 μl διαλύματος έκπλυσης (2 mM EDTA, 0.5% FCS σε PBS) για κάθε 10^7 κύτταρα. Για κάθε 10^7 κύτταρα προστίθενται επίσης 20 μl εναιωρήματος μικροσφαιρών που φέρουν στην επιφάνειά

τους το επιθυμητό αντίσωμα. Επωάζουμε 15 λεπτά στους 4^{o}C με ήπια ανακίνηση ανά 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται στο εναιώρημα δεκαπλάσιος όγκος διαλύματος έκπλυσης και φυγοκεντρούμε στα 700 g για 5 λεπτά. Μετά την απόχυση του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος έκπλυσης και τοποθετείται σε πάγο. Ακολούθως, τοποθετείται στο μαγνήτη η στήλη της ίδιας εταιρίας και εξισορροπείται με 1 ml διαλύματος έκπλυσης. Προστίθεται το εναιώρημα των κυττάρων και η στήλη ξεπλένεται 3 φορές με 1 ml διαλύματος έκπλυσης. Τα αρνητικά για το επιφανειακό μόριο κύτταρα λαμβάνονται στο έκπλυμα, ενώ για τη λήψη των θετικών κυττάρων, αφαιρούμε τη στήλη από το μαγνήτη, προσθέτουμε 1 ml διαλύματος έκπλυσης και πιέζουμε με το ειδικό έμβολο. Τα κύτταρα που λαμβάνονται (τόσο τα θετικά όσο και τα αρνητικά για τον χρησιμοποιούμενο δείκτη επιφανείας) πλένονται 2 φορές με διάλυμα HBSS και επαναιωρούνται στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την επιθυμητή ακόλουθη χρήση τους.

6.9. Δημιουργία δενδριτικών κυττάρων

Για την παραγωγή δενδριτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα, ανάλογα με τον αριθμό των αρχικών κυττάρων του δείγματος:

1. PBMC, αμέσως μετά την απομόνωσή τους ή μετά από απόψυξη, φυγοκεντρούνται και επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό x-vivo 15 σε συγκέντρωση 2*10^{6}/ml και διαμοιράζονται σε μικροπλάκα 6 θέσεων 2 ml/θέση. Οι μικροπλάκες επωάζονται για 2 ώρες σε κλίβανο 37^{o}C, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας. Τα μη προσκολλημένα κύτταρα απομακρύνονται με 4 ήπιες εκπλύσεις με διάλυμα HBSS.
2. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μαγνητικού διαχωρισμού με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια απομονώνονται τα CD14^{+} κύτταρα από PBMC.

Τα κύτταρα που απομονώνονται με οποιονδήποτε από τους δύο προαναφερθέντες τρόπους καλλιεργούνται σε 2 ml/θέση μικροπλάκας θρεπτικού υλικού x-vivo 15 εμπλουτισμένου με 1% αυτόλογο πλάσμα, 1000 IU/ml IL–4 και 1000 IU/ml GM-CSF. Όσον αφορά στα κύτταρα που απομονώνονται με το δεύτερο τρόπο, η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 2*10^{6} κύτταρα ανά θέση μικροπλάκας. Τις ημέρες 2 και 4 γίνεται προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού με κυτταροκίνες σε ποσότητα 2 ml/θέση μικροπλάκας. Την έκτη ημέρα τα κύτταρα καταψύχονται σε υγρό άζωτο ή γίνεται επαγωγή της ωρίμανσης τους με την προσθήκη θρεπτικού υλικού x-vivo 15 εμπλουτισμένου με 1% αυτόλογο πλάσμα και 10 ng/ml (τελική συγκέντρωση) TNF-α για 24 ώρες. Τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα συλλέγονται την

έβδομη ημέρα και χρησιμοποιούνται για παρουσίαση αντιγόνων. Για την εξακρίβωση της διαφοροποίησής τους προς δενδριτικά κύτταρα ελέγχεται η παρουσία συγκεκριμένων επιφανειακών μορίων με κυτταρομετρία ροής. Αναλυτικότερα, ως δενδριτικά θεωρούνται τα κύτταρα με φαινότυπο $CD3^-CD14^-CD16^-CD20^-$ $CD40^+CD80^+CD83^+CD86^+$ και $HLA\text{-}DR^+$.

Πριν τη χρήση τους, τα δενδριτικά κύτταρα επεξεργάζονται με την μιτομικίνη C (100 μg/ml σε x-vivo) για 45 λεπτά στους 37^{o}C, ώστε να χάσουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με HBSS και καλλιέργεια.

6.10. Μη ειδική για αντιγόνο διέγερση λεμφοκυττάρων

Για τη διέγερση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων χωρίς την αλλοίωση της ποικιλότητας των TCR χρησιμοποιούνται δύο πρωτόκολλα:

1. PBMC, σειρές ή κλώνοι λεμφοκυττάρων καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 10^6/ml στο 1 ml/θέση μικροπλάκας σε μικροπλάκες 24 θέσεων ή στα 100 μl/ θέση μικροπλάκας σε μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι x-vivo 15 εμπλουτισμένο με 1% αυτόλογο πλάσμα, 10 ng/ml IL-7, 100 pg/ml IL-12, 0.75 μg/ml φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) και $0,5*10^6$ υποστηρικτικά κύτταρα ανά ml. Μετά από επώαση 3 ημερών στους 37^{o}C προστίθεται σε κάθε θέση μικροπλάκας ίσος όγκος θρεπτικού υλικού x-vivo 15 εμπλουτισμένο με 1% αυτόλογο πλάσμα, 20 IU/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, 100 pg/ml IL-12.

2. Εναλλακτικά, σε μικροπλάκες 24 θέσεων ή 96 θέσεων επίπεδου πυθμένα καλύπτονται με 250 μl και 50 μl αντίστοιχα, διαλύματος πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού ενάντια σε ανοσοσφαιρίνες ποντικού στα 3,5 μg/ml σε Tris 0.1 M. Οι μικροπλάκες επωάζονται για 2 ώρες στους 37^{o}C, ώστε να γίνει παθητική προσρόφηση του αντισώματος και στη συνέχεια καλύπτονται οι κενές θέσεις με την προσθήκη 0,5 ml/θέση μικροπλάκας ή 50 μl/θέση μικροπλάκας, αντίστοιχα για τις μικροπλάκες 24 και 96 θέσεων, διαλύματος PBS με 2% FCS. Επωάζουμε για 2 ώρες στους 37^{o}C και πλένουμε 2 φορές με PBS. Προστίθενται 250 μl και 50 μl αντίστοιχα διαλύματος μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού αντί-CD3 ανθρώπου και αντί-CD28 ανθρώπου σε RPMI-1640 1 μg/ml για το κάθε αντίσωμα και επωάζουμε 2 ώρες στους 37^{o}C. Μετά από 2 εκπλύσεις με PBS, προστίθενται τα λεμφοκύτταρα σε συγκέντρωση 10^6/ml στο 1 ml/θέση μικροπλάκας στις μικροπλάκες 24 θέσεων ή στα 100 μl/ θέση

μικροπλάκας στις μικροπλάκες 96 θέσεων, σε θρεπτικό υλικό x-vivo 15 εμπλουτισμένο με 10 ng/ml IL-7 και 100 pg/ml IL-12. Μετά από επώαση 3 ημερών στους 37^{o}C προστίθεται σε κάθε θέση μικροπλάκας ίσος όγκος θρεπτικού υλικού x-vivo 15 εμπλουτισμένο με 1% αυτόλογο πλάσμα, 20 IU/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, 100 pg/ml IL-12.

6.11. Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και τα θρεπτικά υλικά στα οποία καλλιεργήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

Κυτταρική σειρά	Προέλευση	Τύπος κυττάρων	Καλλιεργητικό υλικό	Αναφορά
FM3	Ευγενική χορηγία του Δρ. J. Zeuthen, Department of Tumor Cell Biology, Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Hadler et al, 1976
FM3-HER	FM3 τροποποιημένα στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ	Κυτταρική σειρά FM3 μετασχηματισμένη ώστε να εκφράζει την πρωτεΐνη HER-2/neu	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Perez et al, 2002
HT-29	American Type Culture Collection	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέως εντέρου	McCoy's 5A 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Forgue-Lafitte et al, 1979
HCT-116	American Type Culture Collection	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέως εντέρου	DMEM 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Russo et al, 1999
SKBR-3	American Type Culture Collection	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού	McCoy's 5A 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Rishi et al, 1996
K562	American Type Culture Collection	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Klein et al, 1976
B95-8	American Type Culture Collection	Κυτταρική σειρά Β λεμφοκυττάρων πρωτεύοντος, μολυσμένων με ιό EBV, που παράγει στελέχη του ιού	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Steinitz et al, 1978
MCF-7	American Type Culture Collection	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Litvinov et al, 1989
MDA-231	American Type Culture Collection	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού	DMEM 10% FCS 2mM L-γλουταμίνη 50μg/ml γενταμυκίνη	Litvinov et al, 1989

Η επαγωγή της επιφανειακής έκφρασης μορίων HLA-DR4 στην κυτταρική σειρά HT-29, όπου απαιτήθηκε, έγινε μέσω προσθήκης στο θρεπτικό υλικό 100 IU/ml IFN-γ για 2 ημέρες.

6.12. Μετασχηματισμός Β λεμφοκυττάρων με ιό Epstein-Barr

Από κάθε δότη απομονώνονται $5*10^6$ PBMC, φυγοκεντρούνται και επαναιωρούνται σε 5 ml θρεπτικού υλικού αποτελούμενου κατά 50% από πλήρες RPMI-1640 και 50% από υπερκείμενο καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς B95-8 (το οποίο περιέχει σωματίδια του ιού Epstein-Barr). Στο εναιώρημα προστίθεται κυκλοσπορίνη Α σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml για να εμποδίσει την ανοσολογική απάντηση των Τ λεμφοκυττάρων και διαμοιράζεται στα 100 μl/μικροφρεάτιο σε μικροπλάκα 96 θέσεων με πυθμένα σχήματος U. Ακολουθεί επώαση 12 ωρών σε κλίβανο 37^{o}C, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας. Στη συνέχεια αφαιρούνται 50 μl υπερκειμένου από κάθε μικροφρεάτιο και προστίθενται 150 μl/μικροφρεάτιο θρεπτικού υλικού πλήρους RPMI-1640 εμπλουτισμένου με 0,5 μg/ml κυκλοσπορίνη Α. Ακολουθεί ανανέωση του θρεπτικού υλικού δύο φορές την εβδομάδα. Η δημιουργία Β λεμφοκυτταρικών σειρών μακράς επιβίωσης χρειάζεται περίπου 4 εβδομάδες, ανάλογα με το δότη. Μετά τη δημιουργία των κυτταρικών σειρών αφαιρείται από το θρεπτικό υλικό η κυκλοσπορίνη Α.

6.13. Μελέτη κυτταροτοξικότητας

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράσης, γίνεται λήψη του επιθυμητού ποσού κυττάρων-στόχων (0.5-1 x 10^6 κύτταρα), φυγοκέντρηση και ραδιενεργός σήμανση αυτών με 100μl ^{51}Cr (5mCi/ml) και επώαση για 1,5 ώρες στους 37^{o}C με ανακίνηση ανά 15 λεπτά. Ακολουθεί έκπλυση δύο φορές με 10ml HBSS και στη συνέχεια επώαση για 1 ώρα στους 37^{o}C σε 10ml κατάλληλου για κάθε είδος κυττάρων θρεπτικού υλικού. Μετά την πάροδο της μιας ώρας, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και επαναιωρούνται στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 50.000 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια διαμοιράζονται 100 μl/μικροφρεάτιο σε μικροπλάκες 96 θέσεων με πυθμένα σχήματος V. Προστίθενται 100 μl/μικροφρεάτιο από τα προς μελέτη εκτελεστικά κύτταρα στις κατάλληλες συγκεντρώσεις εις τριπλούν. Σε 4 μικροφρεάτια προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό για

τον υπολογισμό της μη ειδικής απελευθέρωσης ^{51}Cr, ενώ σε 4 μικροφρεάτια προστίθεται H_2SO_4 για τον υπολογισμό της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας όταν λυθούν όλα τα κύτταρα-στόχοι. Ακολουθεί επώαση 4 ωρών σε κλίβανο 37^oC, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας, οπότε στα μικροφρεάτια όπου έχουμε λύση των κυττάρων στόχων από τα δραστικά κύτταρα, επέρχεται απελευθέρωση αντίστοιχης ποσότητας ^{51}Cr. Στη συνέχεια η μικροπλάκες φυγοκεντρούνται στα 700g για 5 λεπτά. Από κάθε μικροφρεάτιο λαμβάνονται 100 μl υπερκειμένου και τοποθετούνται σε σωληνάρια για μέτρηση της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας (σε κρούσεις ανά λεπτό, cpm) σε μετρητή γ ακτινοβολίας. Η ικανότητα κυτταροτοξικότητας υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Κυτταροτοξικότητα \%} = \frac{\text{cpm δείγματος} - \text{cpm μη ειδικής απελευθέρωσης}}{\text{cpm ολικής λύσης} - \text{cpm μη ειδικής απελευθέρωσης}} \%$$

6.14. Μελέτη πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων

Τα προς μελέτη Τ λεμφοκύτταρα τοποθετούνται 30.000 κύτταρα/μικροφρεάτιο σε μικροπλάκες 96 θέσεων με πυθμένα σχήματος U μαζί με τα κατάλληλα APC (επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο και μη επωασμένα) σε τελικό όγκο 200μl/ μικροφρεάτιο, σε θρεπτικό υλικό x-vivo 15, εμπλουτισμένο με 1% αυτόλογο ορό, 10 ng/ml IL-7 και 100 pg/ml IL-12. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται για παρουσίαση του αντιγόνου DC, καρκινικά κύτταρα ασθενών ή καρκινικές κυτταρικές σειρές, αυτά προστίθενται στα 3.000 κύτταρα/μικροφρεάτιο, ενώ όταν χρησιμοποιούνται Β-λεμφοκύτταρα μετασχηματισμένα με ιό Epstein-Barr, προστίθενται στα 30.000 κύτταρα/μικροφρεάτιο. Όπου απαιτείται προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων αντί-HLA-DR και αντί-HLA-A, -B, -C προστίθενται σε συγκέντρωση 10 μg/ml, ενώ το υπερκείμενο υβριδώματος αντί-HLA-DR4 προστίθεται σε ποσοστό 50% διαλυμένο σε x-vivo 15. Ως θέσεις ελέγχου χρησιμοποιούνται, για κάθε ομάδα κυττάρων, τριπλέτες φρεατίων μόνο με APC, καθώς και τριπλέτες μόνο με Τ λεμφοκύτταρα σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 10 μg/ml PHA. Την τέταρτη ημέρα από την έναρξη της καλλιέργειας προστίθεται διάλυμα τριτιωμένης θυμιδίνης ([^{3}H]-TdR 48,0 Ci/mmol, 1 mCi/ml) 1 μCi/μικροφρεάτιο σε x-vivo 15, 50 μl/μικροφρεάτιο. Ακολουθεί επώαση 16 ωρών σε κλίβανο 37^oC, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά και λύση των κυττάρων (cell harvesting) σε ειδικά φίλτρα από ίνες γυαλιού που

κατακρατούν τα μεγαλομόρια, προσθήκη υγρού σπινθηρισμού 1 ml/δείγμα και μέτρηση της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας σε μετρητή β ακτινοβολίας. Όλα τα δείγματα τοποθετούνται εις τριπλούν και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cpm.

6.15. Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISPOT

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής ιντερφερόνης-γ σε κυτταρικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot) οι οποίες αναλύονται στη συνέχεια. Μετά την εμφάνιση των κηλίδων τα μικροφρεάτια φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και ο αριθμός των κηλίδων υπολογίσθηκε με το λογισμικό Image-Pro Plus.

6.15.1. Τεχνική ELISPOT που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας:

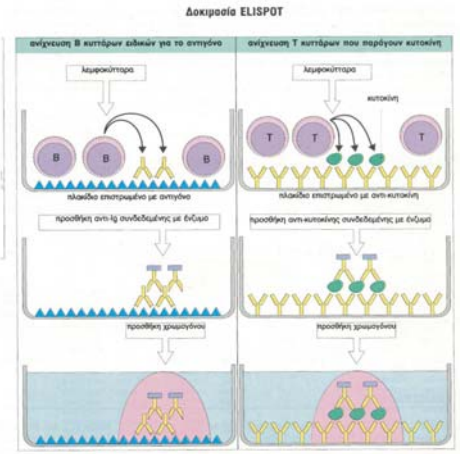
Μικροπλάκες 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα από PVDF (Multi-Screen-IP) επικαλύπτονται με 50 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος 2 μg/ml μονοκλωνικού αντισώματος αντί-IFN-γ σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.1 M με pH 8.0 και επωάζονται 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C). Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος και η μικροπλάκα εκπλένεται 4 φορές με διάλυμα 2% FCS σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2CO_3/Na_2HCO_3 σε φυσιολογικό ορό με pH 7,4 (PBS). Για τη δέσμευση των ελεύθερων θέσεων των μικροφρεατίων προστίθεται διάλυμα 10% FCS σε PBS στα 200 μl/μικροφρεάτιο και η μικροπλάκα επωάζεται για 2 ώρες στους 37^{O}C. Στη συνέχεια αναρροφάται το διάλυμα από τα μικροφρεάτια, προστίθεται η προς μελέτη καλλιέργεια στα 200 μl/μικροφρεάτιο και ακολουθεί επώαση 20 ωρών σε κλίβανο 37^{o}C, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας. Μετά το τέλος της επώασης, το περιεχόμενο των μικροφρεατίων μεταφέρεται ποσοτικά σε μικροπλάκα 96 θέσεων κυκλικού πυθμένα και η μικροπλάκα του ELISPOT εκπλένεται 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης (0,1% Tween-20 σε PBS). Η IFN-γ που έχει εκκριθεί από τα λεμφοκύτταρα ανιχνεύεται με την προσθήκη 100 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος 2,5 μg/ml βιοτινυλιωμένου αντισώματος αντί-IFN-γ σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος/κιτρικού νατρίου 20 mM με pH 7.0, εμπλουτισμένο με 2% FCS, 0.1% Tween-20, 1% πολυαιθυλενογλυκόλη και 0.05% Thimerosal και επώαση 3 ωρών σε κλίβανο 37^{o}C. Μετά από απόχυση του διαλύματος και έκπλυση 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης ακολουθεί προσθήκη 100 μl/μικροφρεάτιο συζεύγματος στρεπταβιδίνης/αλκαλικής φωσφατάσης σε αραίωση 1:5000 και η μικροπλάκα επωάζεται 1 ώρα σε κλίβανο 37^{o}C. Ακολουθεί έκπλυση 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης και προστίθενται 50

μl/μικροφρεάτιο διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος (BCIP/NTB). Όταν εμφανισθούν σκούρες μοβ κηλίδες (7-10 λεπτά) η μικροπλάκα εκπλένεται με άφθονο νερό βρύσης και στεγνώνει στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου.

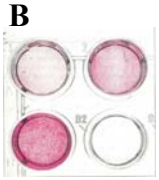
6.15.2. Τεχνική ELISPOT της εταιρείας Biosource:

Μικροπλάκες 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα επικαλύπτονται με 50 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος του παρεχόμενου από τη συσκευασία μονοκλωνικού αντισώματος αντί-IFN-γ. Ακολουθεί προσθήκη 50 μl/μικροφρεάτιο PBS και επώαση 18 ωρών στους 4^{o}C. Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος και η μικροπλάκα εκπλένεται 10 φορές με διάλυμα 0,05% Tween-20 σε PBS (διάλυμα έκπλυσης). Για τη δέσμευση των ελεύθερων θέσεων των μικροφρεατίων προστίθεται διάλυμα 1% αλβουμίνης βοείου ορού σε PBS στα 200 μl/μικροφρεάτιο και η μικροπλάκα επωάζεται 1 ώρα στους 37^{O}C. Στη συνέχεια αναρροφάται το διάλυμα από τα μικροφρεάτια, προστίθεται η προς μελέτη καλλιέργεια στα 100 μl/μικροφρεάτιο και ακολουθεί σε επώαση 5 ωρών σε κλίβανο 37^{o}C, παρουσία 5%CO_2 και υγρασίας. Μετά το τέλος της επώασης, το περιεχόμενο των μικροφρεατίων αποχύνεται με απότομη κίνηση και τα μικροφρεάτια καλύπτονται με παγωμένο απιονισμένο νερό. Η μικροπλάκα παραμένει για 10 λεπτά επάνω σε πάγο και ακολουθούν 10 εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος βιοτινυλιωμένου αντισώματος αντί-IFN-γ παρεχόμενου από τη συσκευασία και η μικροπλάκα επωάζεται 1 ώρα σε κλίβανο 37^{o}C. Μετά από απόχυση του διαλύματος και έκπλυση 5 φορές με διάλυμα έκπλυσης, ακολουθεί προσθήκη 50 μl/μικροφρεάτιο αντιδραστηρίου GABA (φ-σημασμένο αντίσωμα ενάντια σε βιοτίνη) και η μικροπλάκα επωάζεται 1 ώρα σε κλίβανο 37^{o}C. Ακολουθεί έκπλυση 5 φορές με διάλυμα έκπλυσης και προστίθενται 30 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος. Η ανάπτυξη των κηλίδων παρατηρείται σε στερεομικροσκόπιο. Όταν εμφανισθούν σαφείς μοβ κηλίδες (10-15 λεπτά) η μικροπλάκα εκπλένεται με άφθονο απιονισμένο νερό και στεγνώνει στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου.

A



B



Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISPOT.

Α. Η τεχνική ELISPOT
Β. Το αποτέλεσμα όπως παρουσιάζεται σε στερεομικροσκόπιο.

6.16. Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Τα επίπεδα των κυτταροκινών στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (Enzyme-Linked ImmunoAssay). Οι κυτταροκίνες που μελετήθηκαν ήταν η IFN-γ, η IL-2, η IL-4, η IL-10, η IL-13, ο GM-CSF και ο TNF-α. Αναλυτικά, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

6.16.1. Μέθοδος ELISA που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών IFN-γ, TNF-α και GM-CSF

Σειρές μικροφρεατίων πολυστυρενίου υψηλής δέσμευσης καλύπτονται με 150 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος ενάντια στην αντίστοιχη κυτταροκίνη στα 2 μg/ml σε διάλυμα Tris 0.1 M, pH 8.0 και επωάζονται 18 ώρες στους 4^{o}C. Για τη δέσμευση των ελεύθερων θέσεων των μικροφρεατίων προστίθεται διάλυμα 4% FCS σε Tris 0.1 M, pH 8.0 στα 150 μl/μικροφρεάτιο και η μικροπλάκα επωάζεται για 2 ώρες στους 37^{O}C. Στο σημείο αυτό οι σειρές μικροφρεατίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να καταψυχθούν στους –80^{o}C για μελλοντική χρήση. Κατά τη χρησιμοποίησή τους, εκπλένονται 4 φορές με διάλυμα 0,1% Tween-20 σε φυσιολογικό ορό (διάλυμα έκπλυσης) και πληρώνονται με 100 μl/μικροφρεάτιο προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων των προς εξέταση καλλιεργειών, αναραίωτων ή αραιωμένων 1:10 ή/και 1:100 σε x-vivo 15. Ακολουθεί επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 4 εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης, ακολουθεί προσθήκη του βιοτινυλιωμένου αντισώματος ενάντια στην αντίστοιχη κυτταροκίνη (για την IFN-γ στο 1 μg/ml, για τον TNF-α στα 0.5 μg/ml και για το GM-CSF στα 0.3 μg/ml) σε PBS με pH 7.0. Οι σειρές των

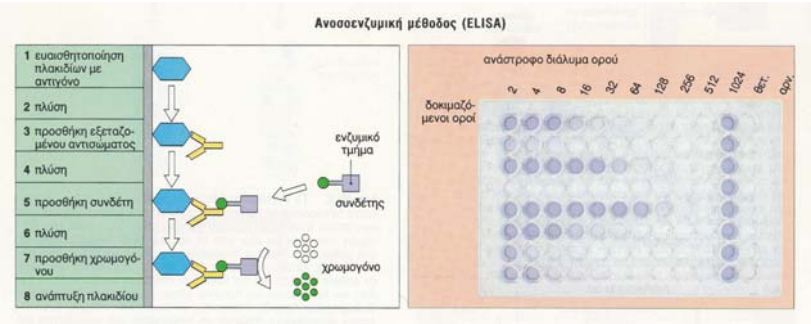
μικροφρεατίων επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα, τα μικροφρεάτια εκπλένονται 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης και προστίθενται 100 μl/μικροφρεάτιο συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης της ραπανίδος διαλυμένο στο διάλυμα που προαναφέρθηκε. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανακίνηση, το διάλυμα αποχύνεται και τα μικροφρεάτια εκπλένονται 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης. Η ανάπτυξη του χρώματος γίνεται με προσθήκη 100μl/μικροφρεάτιο διαλύματος χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 5-10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 50 μl/μικροφρεάτιο H_2SO_4 0.1N και η οπτική απορρόφηση μετράται στα 450 nm σε μετρητή Dynatech MR5000.

6.16.2. Μέθοδος ELISA εταιρείας Diaclone για τον προσδιορισμό των κυτταροκινων IFN-γ, IL-4, IL-10, TNF-α

Σειρές μικροφρεατίων ELISA επικαλυμμένες με αντίσωμα αντί-IFN-γ, αντί-IL-4, αντί-IL-10 και αντί-TNF-α αντίστοιχα, πληρώνονται με 100 μl/μικροφρεάτιο προτύπων διαλυμάτων (στη συγκέντρωση που υποδεικνύεται από την εταιρεία για την κάθε κυτταροκίνη) και δειγμάτων των προς εξέταση καλλιεργειών, αναραίωτων ή αραιωμένων 1:10 ή/και 1:100 στο παρεχόμενο διάλυμα αραίωσης. Ακολουθεί προσθήκη του βιοτινυλιωμένου αντισώματος ενάντια στην αντίστοιχη κυτταροκίνη και επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα, τα μικροφρεάτια εκπλένονται 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης και προστίθενται 100 μl/μικροφρεάτιο συζεύγματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης της ραπανίδος. Μετά από επώαση 1 ώρας σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανακίνηση, το διάλυμα αποχύνεται και τα μικροφρεάτια εκπλένονται 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης. Η ανάπτυξη του χρώματος γίνεται με προσθήκη 100μl/μικροφρεάτιο διαλύματος χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος TMB και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 10-15 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 50 μl/μικροφρεάτιο H_2SO_4 0.1N και η οπτική απορρόφηση μετράται στα 450 nm σε μετρητή Dynatech MR5000.

6.16.3. Μέθοδος ELISA εταιρείας R&D Systems για τον προσδιορισμό της IL-13

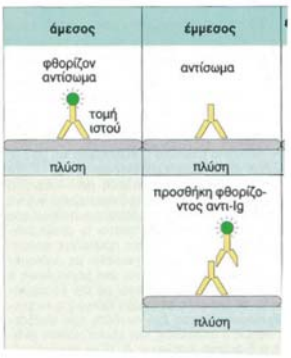
Σειρές μικροφρεατίων ELISA επικαλυμμένες με αντίσωμα αντι-ιντερλευκίνης-13, πληρώνονται με 100 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος RD1W. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl/μικροφρεάτιο προτύπων διαλυμάτων (συγκεντρώσεων από 0 ως 4000 pg/ml) και δειγμάτων των προς εξέταση καλλιεργειών, αναραίωτων ή αραιωμένων 1:10 στο παρεχόμενο διάλυμα αραίωσης και οι σειρές μικροφρεατίων επωάζονται 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος, έκπλυση 3 φορές με το παρεχόμενο διάλυμα έκπλυσης και προσθήκη διαλύματος συζεύγματος στα 200 μl/μικροφρεάτιο. Τα μικροφρεάτια επωάζονται 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20-22^{o}C) υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα, τα μικροφρεάτια εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα έκπλυσης και προστίθενται 200 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος. Η ανάπτυξη του χρώματος γίνεται για 30 λεπτά στο σκοτάδι και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 50 μl/μικροφρεάτιο διαλύματος H_2SO_4. Η απορρόφηση μετράται στα 450 nm σε μετρητή Dynatech MR5000.



6.17. Κυτταρομετρία ροής

Η έκφραση επιφανειακών αντιγόνων σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή μελετήθηκε με τη χρήση φθοριζόντων αντισωμάτων και τη μετέπειτα επεξεργασία των κυττάρων σε κυτταρομετρητή ροής. Ανεξάρτητα από το είδος και την προέλευση των κυττάρων, η διαδικασία χρώσης και επεξεργασίας ήταν η ακόλουθη:

Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των κυττάρων, διαμοιράζονται ανά δοκιμαστικό σωλήνα (5 ml polystyrene) 10-100 *10^3 κύτταρα. Μετά από φυγοκέντρηση τα δείγματα επαναιωρούνται σε 50 μl διαλύματος έκπλυσης (διάλυμα PBS με περιεκτικότητα 2% σε FCS και 0,1% σε NaN_3) και προστίθενται τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα στην προτεινόμενη από την εταιρία αραίωση. Ακολουθεί επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και δύο εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης. Στις περιπτώσεις που το μονοκλώνικό αντίσωμα για το επιφανειακό μόριο, η παρουσία του οποίου ελέγχεται, είναι μη σημασμένο και συνεπώς απαιτείται χρήση δεύτερου αντισώματος, ακολουθεί προσθήκη δεύτερου αντισώματος ενάντια σε ανοσοσφαιρίνη του αντίστοιχου είδους. Η επώαση και οι εκπλύσεις γίνονται όπως και για το πρώτο αντίσωμα (βλέπε εικόνα). Μετά την τελική έκπλυση το ίζημα επαναιωρείται σε 250 μl διαλύματος 1% παραφορμαλδεΰδης-α σε PBS. Στη συνέχεια τα δείγματα μετρούνται σε κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur και επεξεργάζονται με λογισμικό Cell Quest ή Paint-A-Gate.



Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:
Συνδεδεμένα με ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη (FITC) σε αραίωση 1/10: Αντί-CD4, αντί-CD25, αντί-CD45RA, αντί-CD158a και αντί-TCR VB23 από την PharMingen) αντί-TCR VB3.1, αντί-TCR VB5a, αντί-TCR VB6.7, αντί-TCR VB7.1, αντί-TCR VB8a, αντί-TCR VB12, αντί-TCR VB13 και αντί-TCR VB17 από την Endogen, αντί-HER-2/neu από την Becton Dickinson και αντί-HLA-ABC από την DAKO A/S.
Συνδεδεμένα με φυκοερυθρίνη (PE) σε αραίωση 1/20: Αντί-CD3, αντί-CD8, αντί-CD14, αντί-CD16, αντί-CD40, αντί-CD45RO, αντί-CD83, αντί-CD86 και αντί-CD158b από την PharMingen, αντί-HLA DR από την Becton Dickinson, αντί-CD80 και αντί-CD94 από την Immunotech και αντί-mouse IgG από την DAKO A/S.
Συνδεδεμένα με φυκοερυθρίνη-κυανογόνο 5 (PECy5) σε αραίωση 1/20: Αντί-CD56 από την Immunotech.
Μη σημασμένο αντίσωμα: Αντί-CCR7 από την εταιρία Pharmingen.

6.18. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SV Total RNA Isolation System της εταιρίας Promega σύμφωνα με τις παρεχόμενες οδηγίες. Αναλυτικά, το εναιώρημα των κυττάρων από τα οποία επιθυμούμε την απομόνωση RNA τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf και φυγοκεντρείται στα 700 g για 5 λεπτά. Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου προστίθενται 175 μl SV RNA Lysis Buffer και το μίγμα αναδεύεται με αναστροφή του σωληναρίου. Προστίθενται 350 μl SV RNA Dilution Buffer και το μίγμα αναδεύεται με αναστροφή του σωληναρίου 4 φορές. Το δείγμα θερμαίνεται σε πλάκα θέρμανσης στους 70^{o}C για 3 λεπτά και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 12000 g. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο σωληνάριο, προστίθενται 200 μl αιθανόλης και το μίγμα αναδεύεται καλά με πιπέτα. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε διάτρητο σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 12000 g, ώστε να παραμείνουν μόνο τα νουκλεϊκά οξέα. Για τον καθαρισμό του RNA προστίθενται 600 μl SV RNA Wash Solution και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 1 λεπτό. Προστίθενται 50 μl DNase incubation mix (αποτελούμενο από 40 μl Yellow Core Buffer, 5 μl $MnCl_2$ 0.09 M και 5 μl DNase I), ώστε να διαλυθούν τα υπάρχοντα τμήματα DNA και το μίγμα επωάζεται 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 200 μl SV DNase Stop Solution για να σταματήσει η δράση του ενζύμου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 1 λεπτό. Ακολουθούν δύο πλύσεις με SV RNA Wash Solution (η πρώτη με 600 μl και η δεύτερη με 250 μl) και ο διάτρητος σωλήνας φυγοκέντρησης προσαρμόζεται σε σωληνάριο έκλουσης. Προστίθενται 100 μl ελεύθερου από νουκλεάσες νερού και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 1 λεπτό για την έκλουση του RNA. Το παραχθέν RNA, αν δεν χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στους -80 ^{0}C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

6.19. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώνεται γίνεται με φασματοφωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική απορρόφηση (OD) του δείγματος στα 260 nm και στα 280 nm. Η πρώτη τιμή δίνει την απόλυτη ποσότητα (OD:1 = 40 μg/ml), ενώ το πηλίκο των δύο αυτών τιμών χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμίξεις, τότε ο λόγος OD_{260}:OD_{280} = 2. Αν υπάρχουν τέτοιες, ο λόγος αυτός μειώνεται.

6.20. Έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA

Περίπου 3 μl δείγματος ολικού RNA αναμειγνύεται με τριπλάσιο όγκο ειδικού εμπορικού διαλύματος που περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και φορμαμίδιο (RNA loading buffer) και το μείγμα θερμαίνεται στους 100^0C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί πλήρως το RNA. Στη συνέχεια, χρησιμοποιούμε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1,2% σε 1X TBE με βρωμιούχο αιθίδιο και ηλεκτροφορούμε τα δείγματα μας για 30 λεπτά. Το αποτέλεσμα οπτικοποιείται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός και συγκρίνεται με πρότυπο δείγμα RNA.

6.21. Αντίστροφη μεταγραφή- Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA)

Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα του ιϊκού ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης να συνθέτει μόρια DNA με μήτρα μόρια RNA. Περίπου 1 μg ολικού RNA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση cDNA με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RNase H(-) Reverse Transcriptase. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, το RNA αναμιγνύεται με 0,5 μg oligo $(dT)_{12-18}$ εκκινητές και 1 μl δ/τος dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, συγκέντρωσης 10 mM το καθένα) και συμπληρώνεται με DEPC νερό μέχρι τελικού όγκου 11 μl. Το μείγμα επωάζεται στους 65^0C για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετείται στον πάγο για λίγο, ώστε οι εκκινητές που έχουν υβριδιστεί επάνω στο RNA να σταθεροποιηθούν. Έπειτα, προστίθενται 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 2 μl DTT 0,1 M, 1 μl αναστολέα των ριβονουκλεασών RNaseOUT (40 U/μl) και 1μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RNase H(-) (200 U). Το μείγμα επωάζεται στους 42^0 C για 60 λεπτά και ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75^0C για 15 λεπτά. Τα δείγματα του cDNA φυλάσσονται στους -20^0 C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

6.22. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο της β-ακτίνης

Για να βεβαιωθεί η ακεραιότητα του DNA των δειγμάτων που συντέθηκαν, γίνεται έλεγχος παρουσίας του γονιδίου της β-ακτίνης, το οποίο υπάρχει σε όλα τα κύτταρα. Με μήτρα το cDNA των δειγμάτων που συνθέσαμε πραγματοποιείται η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), με

εκκινητές (primers) ειδικούς για το mRNA της β-ακτίνης. Η ακριβής αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:
F: 5΄-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3΄ και
R: 5΄-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3΄ (Clontech, Human beta-actin control panel)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τις εξής συνθήκες: 2 μl cDNA αναμιγνύονται με 1 μl από κάθε εκκινητή (50 pmoles/μl), 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ και 0.1% TritonX-100, 5 μl διαλύματος dNTPs 2 mM το καθένα, 5 Units Taq DNA Polymerase, σε τελικό όγκο 50μl.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή με θερμικό πρωτόκολλο που αποτελείται από 30 κύκλους του 1 λεπτού στους 94^0 C, 1 λεπτό στους 60^0 C και 1,5 λεπτό στους 72^0C.

Όλα τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων αναλύονται σε 1,2% πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει τη χρωστική Gel Star η οποία δεσμεύεται επιλεκτικά και μη αναστρέψιμα σε δίκλωνα μόρια νουκλεϊκών οξέων και οπτικοποιούνται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Το αποτέλεσμα αξιολογείται ως θετικό όταν υπάρχει ακέραιο προϊόν ακτίνης μεγέθους 980 bp. Τα θετικά δείγματα προχωρούν σε τυποποίηση των μορίων του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας.

6.23. Τυποποίηση αντιγόνων του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας (HLA-typing)

Η τυποποίηση των αντιγόνων του MHC έγινε με το Protrans Cyclerplate system for HLA-A*/B*/DRB1*, χρησιμοποιώντας το cDNA που προέκυψε από την αντίστροφη μεταγραφή, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, για κάθε δείγμα, ετοιμάζεται το βασικό μίγμα αποτελούμενο από 276 μl ρυθμιστικού διαλύματος D, 560 μl ρυθμιστικού διαλύματος Y, 200 μl cDNA και 6,5 μl πολυμεράσης Taq (5 U/μl). Μετά από πολύ καλή ανάδευση του μίγματος, το φυγοκεντρούμε για 2-3 δευτερόλεπτα για να κατακαθίσουν τα σταγονίδια που τυχόν έμειναν στα πλάγια του σωληναρίου. Αφαιρούμε το κάλυμμα από τη μικροπλάκα, η οποία περιέχει σε κάθε θέση διαφορετικούς εκκινητές ειδικούς για κάθε αλλήλιο του MHC, και προσθέτουμε σε κάθε θέση 10 μl από το μίγμα. Στις αρνητικές θέσεις ελέγχου προστίθενται 10 μl μίγμα χωρίς DNA. Φυγοκεντρούμε για 2-3 δευτερόλεπτα

τη μικροπλάκα, ώστε όλη η ποσότητα του μίγματος να βρίσκεται στον πυθμένα των θέσεων και κλείνουμε αεροστεγώς τη μικροπλάκα με τα ειδικά πώματα. Η μικροπλάκες φυλάσσονται στους 4^oC μέχρι 8 ώρες ή τοποθετούνται αμέσως στο θερμικό κυκλοποιητή, με θερμικό πρωτόκολλο που αποτελείται από 2 λεπτά στους 94^0C, 10 κύκλους με 10 δευτερόλεπτα στους 94^0C ακολουθούμενα από 1 λεπτό στους 65^0 C, 20 κύκλους με 10 δευτερόλεπτα στους 94^0C ακολουθούμενα από 50 δευτερόλεπτα στους 61^0 C και 30 δευτερόλεπτα στους 72^oC και τέλος αναμονή στους 4^0C.

Όλα τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων αναλύονται σε 1,2% πήκτωμα αγαρόζης με χρωστική Gel Star και οπτικοποιούνται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Το αποτέλεσμα αξιολογείται ως θετικό όταν υπάρχει ακέραιο προϊόν μεγέθους μεγαλύτερου από 125 bp για τα μόρια MHC τάξης I και μικρότερου από 280 bp για τα μόρια τάξης II. Οι αρνητικές θέσεις περιέχουν προϊόντα μεγέθους 90 και 440 bp.

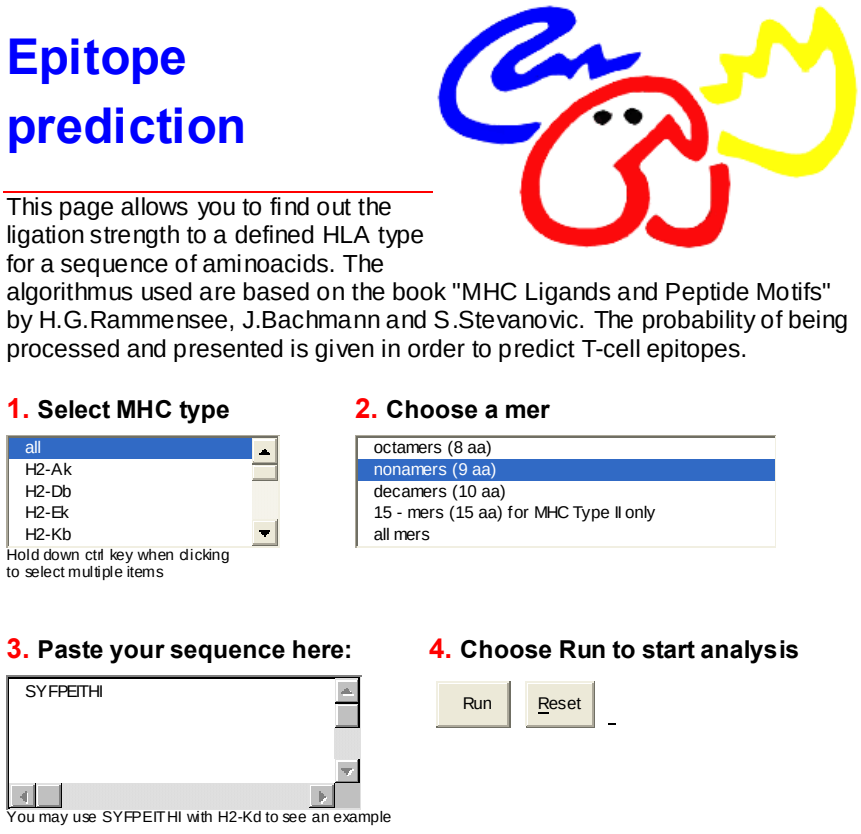
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας αναφοράς των αλληλίων ανά θέση και στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος η σύγκριση του μεγέθους του προϊόντος με το αναμενόμενο μέγεθος για το συγκεκριμένο αλλήλιο.

PROTRANS HLA-A*/B*/DRB1*

Θέση	Ειδικότητα	Θέση	Ειδικότητα	Θέση	Ειδικότητα	Θέση	Ειδικότητα
1	A*01011-0109	25	B07,81	49	B45,5002,76p,82,83	73	DRB1*01
2	A*3601- A*3603	26	B08	50	B49,50,15p,40p	74	DRB1*0103
3	A*02011-0309, A*0247/49/51	27	B13	51	B45,50,54,55,56,82	75	DRB1* 15
4	A*03011-0309, A*3204, A*3602	28	B18	52	B54,55,56,82	76	DRB1*16
5	A*2301- A*2308N, A*2424	29	B18,35,78	53	B54	77	DRB1*03(11)
6	A*23p, A*24p, A*0246/48	30	B35,53	54	B56,82,83	78	DR17(13)
7	A*24p	31	B35,53,75,77	55	B49,59	79	DR18
8	A*25, A*26, A*34, A*66	32	B53,58,77	56	B49,50,27p,40p	80	DRB1*04(11,14)
9	A*2501- A*2503	33	B27,47	57	B46,6702	81	DRB1*07
10	A*2601- A*2617, A*4301	34	B37,4406,51p	58	B46,57,62,63,75,76,77	82	DRB1*08(14)
11	A*3401	35	B38	59	B57	83	DRB1*09
12	A*2502, A*2613, A*3401, A*66p	36	B39,67,62	60	B58,5705	84	DRB1*10
13	A*3402- A*3404, A*1110	37	B67	61	B51,52,53,44p,49,5705,58p,5901,63,77,15p	85	DRB1*11
14	A*11,(*1109week), A*2419, A*2608	38	B40,47	62	B51,78	86	DRB1*12
15	A*29,A*2303, A*2416, A*3203	39	B40,41,48p	63	B51,78,70p,56p	87	DRB1*13(11)
16	A*3001- A*3011	40	B60(40)	64	B52,15012(62)	88	DRB1*13(03,14)
17	A*31012- A*3105	41	B61,40,41,44,45,47,49,50	65	B78,15012(62),1509(70),40p,56p	89	DRB1*13(11,14,16)
18	A*3201- A*3206, A*2503	42	B3702,47	66	B71,70p,75	90	DRB1*13(11,14)
19	A*3301- A*3306	43	B48,81,4012	67	B15,62,75,76	91	DRB1*03,08,12,13,14
20	A*7401- A*7406	44	B62,75,77	68	B76	92	DRB1*14(03,08,11,13)
21	A*68011- A*6820	45	B4802,72,71p	69	B63	93	DRB1*14(11,13,16)
22	A*6901, A*6802/18N	46	B41,4202	70	B64,65	94	DRB5*01,*02
23	A*6901, A*0234, A*0235	47	B42,07p,82,83	71	B65	95	DRB3*01,*02,*03
24	A*4301, A*8001	48	B44,45p	72	B73	96	DRB4*01

6.24. Ταυτοποίηση επιτόπων Τ κυττάρων από καρκινικά αντιγόνα με τη χρήση αλγορίθμων υπολογιστών

Η ταυτοποίηση νέων επιτόπων της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, ειδικών για συγκεκριμένα αλλήλια του MHC, έγινε με τη χρήση της «αντίστροφης ανοσολογίας». Χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων SYFPEITHI του Πανεπιστημίου του Tuebingen (www.syfpeithi.de), η οποία χρησιμοποιεί περιβάλλοντα δομών (motif matrices) προερχόμενα από βελτιωμένες δομές (refined motifs) βασισμένες στη συνολική αλληλουχία (pool sequence) και την ανάλυση μεμονωμένου πεπτιδίου αποκλειστικά φυσικών συνδετών. Οι πιθανοί συνδέτες των μορίων του MHC ιεραρχούνται με βάση τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν στις επικρατούσες και δευτερεύουσες θέσεις σύνδεσης (primary and secondary anchor residues) [Schirle et al, 2001]. Η ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων για την πρόβλεψη των βέλτιστων επιτόπων για σύνδεση με κάθε αλλήλιο είναι η ακόλουθη:



6.25. Εύρεση σημείων κατάτμησης πρωτεϊνών από τα πρωτεασώματα

Τα πεπτίδια που προέκυψαν από την ανάλυση με βάση την ισχύ σύνδεσης με τα δεδομένα αλλήλια του MHC, στη συνέχεια εξετάσθηκαν για τη δυνατότητα να σχηματιστούν φυσικά κατά την επεξεργασία του αντιγόνου μέσω των οδών επεξεργασίας και παρουσίασης των APC. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων PAPROC (www.paproc.de), που βασίζεται σε έναν εξελικτικό αλγόριθμο στηριζόμενο στα δεδομένα της πέψης ολόκληρης της πρωτεΐνης από το πρωτεόσωμα 20S και επιπρόσθετα βιβλιογραφικά δεδομένα πέψης πεπτιδίων [Schirle et al, 2001]. Η ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων PAPROC είναι η ακόλουθη:

Name of the amino acid sequence: Name

Type in your amino acid sequence (in 1-letter-code) QELGKKIKVFGTTGWFKIFA Clear

proteasome species

Human proteasome	Yeast proteasome
☐ wild type I	☐ wild type
☐ wild type II	☐ beta5/Pre2- single mutant
☑ wild type III	☐ beta1/Pre3- single mutant
	☐ beta2/Pup1- single mutant
	☐ beta2/Pup1- beta1/Pre3- double mutant

output style

☑ short form, number of amino acids per line: 20 ☐ list of cleavage positions and strengths

☐ long form ☐ list of cleavage positions only

Submit

6.26. Αναζήτηση ομολογίας πεπτιδίων με την αλληλουχία γνωστών πρωτεϊνών

Τα πεπτίδια που επιλέχθηκαν μετά από τις δύο προηγούμενες διεργασίες επεξεργάζονται με τον αλγόριθμο της βάσης δεδομένων BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), η οποία παρέχει την πληροφορία αν η αμινοξική αλληλουχία που τίθεται υπό έλεγχο παρουσιάζει ομολογία με την αλληλουχία των πρωτεϊνών που υπάρχουν καταχωρημένες στη βάση [Altschul et al, 1997]. Η ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων BLAST είναι η ακόλουθη:

NPS@ is the IBCP contribution to PBIL in Lyon, France

[HOME] [NPS@] [SRS] [HELP] [REFERENCES] [NEWS] [MPSA]
[ANTHEPROT] [Geno3D] [PBIL]

Monday, February 17th 2003 : NPS@ release 3.0 is now available
HMMER (hmmbuild and hmmsearch) is now available (see news)

BLAST search on protein sequence databank

[Abstract] [NPS@ help] [Original server]

Program:

Database :

Sequence name (optional) :
Paste a protein/nucleic sequence below : help

Submit Reset

User : *public@212.205.247.99.* ***Last modification time :*** *Thu Dec 26 12:49:00 2002.*
Current time : *Mon Jan 19 16:25:52 2004 This service is supported by Ministere de la recherche (ACC-SV13), CNRS (IMABIO, COMI, GENOME) and Région Rhône-Alpes (Programme EMERGENCE) . Comments.*

6.27. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το student's t test.

6.28. Μετάφραση βιολογικών όρων

Για τη μετάφραση των βιολογικών και ιατρικών όρων χρησιμοποιήθηκε το λεξικό «Λεξικό βιολογικών και ιατρικών όρων» των Παταργιά ΘΑ, Σέκερη ΚΕ, Σεκερη-Παταργιά Κ και Μαργαρίτη ΛΧ, των εκδόσεων Κωσταράκη.

7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΜΕ ΜΑΚΡΑ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ

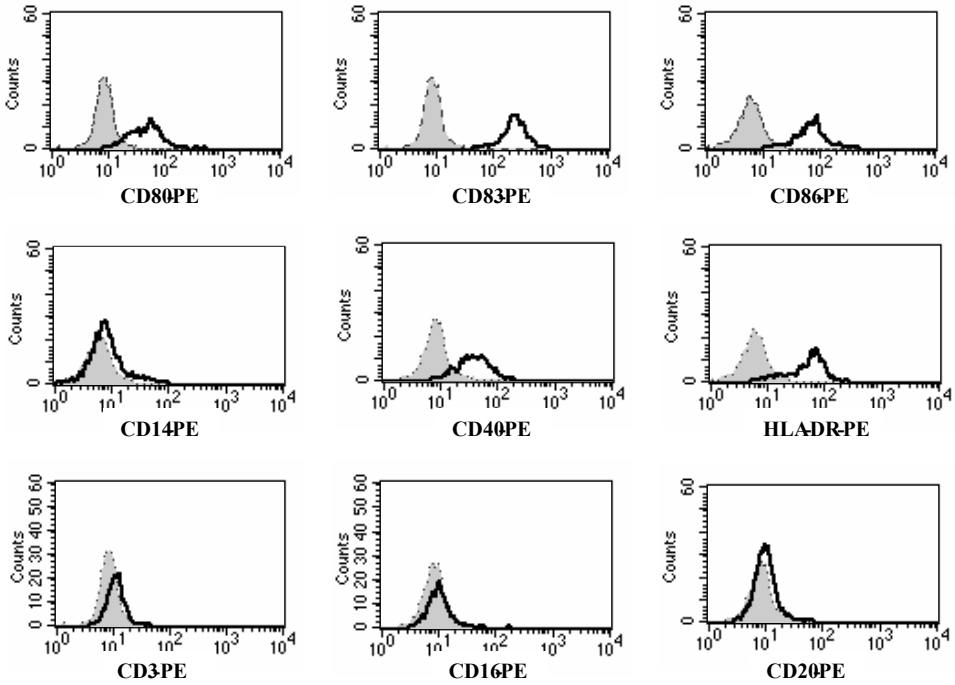
7.1. Επαγωγή $CD4^{\pm}$ Τ λεμφοκυτταρικών σειρών ειδικών για ανοσογονικά πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu

Για την ανάπτυξη ενός καλά καθορισμένου συστήματος επαγωγής $CD4^+$ Τ κυττάρων ειδικών για πεπτίδια ογκοπρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu με αυξημένη ικανότητα σύνδεσης στα μόρια MHC τάξης ΙΙ. Τα πεπτίδια αυτά ήταν τα HER-2 (474-487), με αλληλουχία LCFVHTVPWDQLFR και HER-2 (884-899), με αλληλουχία VPIKWMALESILRRRF. Η τυποποίηση του χρησιμοποιούμενου δότη αίματος όσον αφορά στα αλλήλια των μορίων HLA-DR, ήταν HLA-DR4, -DR11(5). Η μέγιστη ισχύς σύνδεσης των προαναφερθέντων πεπτιδίων με τα αλλήλιά του, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων SYFPEITHI (βλέπε στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι») ήταν 20 και 22 αντίστοιχα (high-affinity binders).

Δεδομένου ότι στα υγιή άτομα, η συχνότητα των $CD4^+$ Τ κυττάρων που φέρουν TCR ειδικό για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu αναμένεται εξαιρετικά χαμηλό (συνήθως <1:100.000), για την επαγωγή $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών σειρών από PBMC υγιούς αιμοδότη απαιτείται αυξημένος αριθμός αρχικών Τ κυττάρων. Για το λόγο αυτό, τα PBMC του δότη επωάσθηκαν για 7 ημέρες σε μικροπλάκες καλλιέργειας, οι οποίες ήταν επιστρωμένες με αντισώματα αντί-CD3 και αντί-CD28 (για τη διαδικασία επίστρωσης βλέπε «Υλικά και μέθοδοι») σε βασικό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 20 IU/ml IL-2. Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτό το σύστημα καλλιέργειας παρουσιάζουν ικανότητα έντονου πολλαπλασιασμού για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να μεταβάλλονται οι αναλογίες των διαφορετικών TCR του αρχικού πληθυσμού, αλλά με σύγχρονη ποσοτικά αύξηση αυτών [Levine et al, 1997]. Από τα κύτταρα που προέκυψαν από αυτή την καλλιέργεια, απομονώθηκαν τα $CD4^+$ Τ κύτταρα με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια (για τη διαδικασία βλέπε «Υλικά και μέθοδοι»). Τα προκύπτοντα $CD4^+$ κύτταρα παρουσίαζαν καθαρότητα μεγαλύτερη από 99%.

Ταυτόχρονα, PBMC του ίδιου δότη χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ώριμων DC (για τη διαδικασία βλέπε «Υλικά και μέθοδοι»). Η επιβεβαίωση ότι πρόκειται για ώριμα DC πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής, με αντισώματα

ειδικά για επιφανειακά μόρια αυτών. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ήταν θετικά για τους δείκτες CD80, CD83, CD86, CD40 και HLA-DR, ενώ ήταν αρνητικά για CD14, CD3, CD16 και CD20, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 7.1.



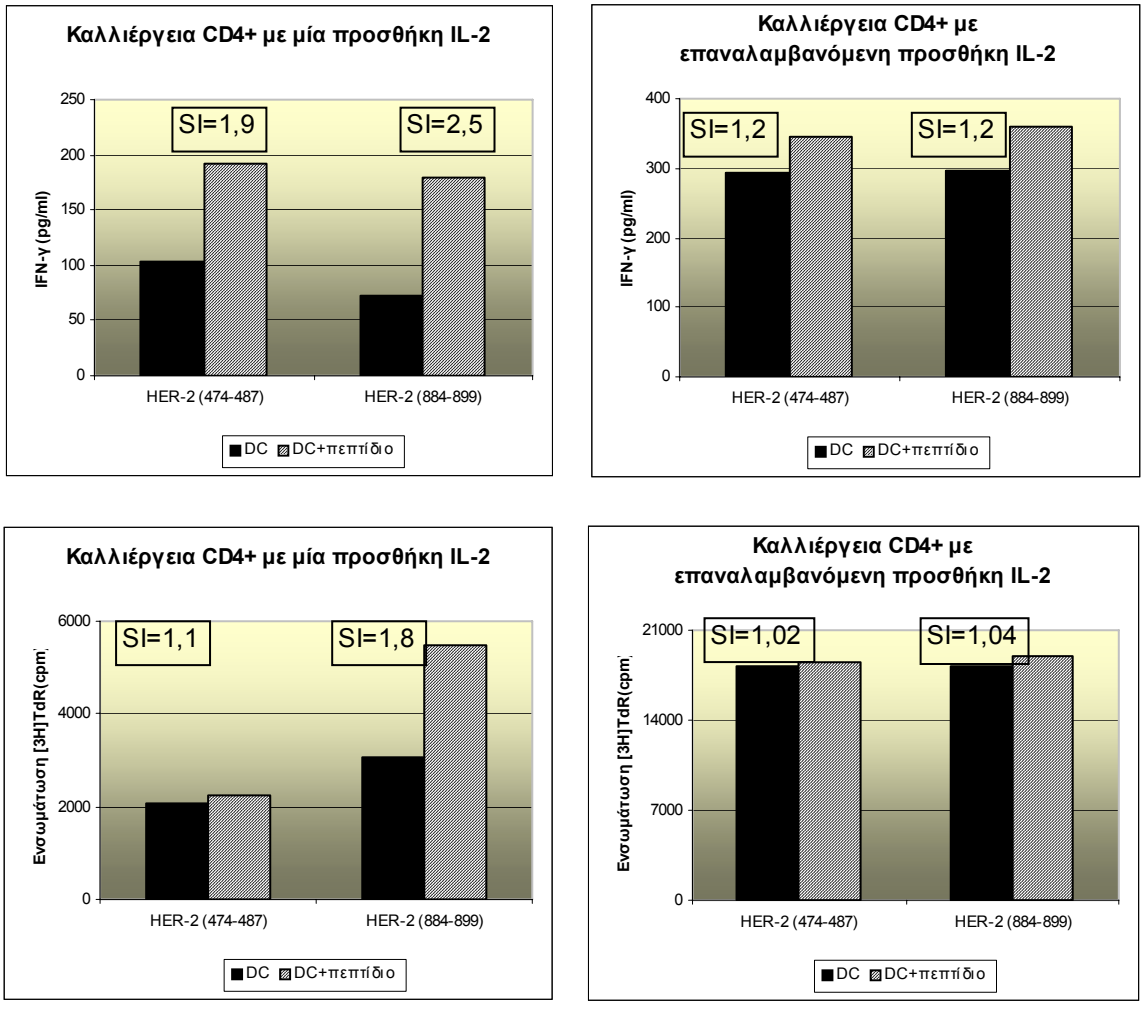
Σχήμα 7.1. Φαινότυπος ώριμων DC. Στα ιστογράμματα με σκούρο χρώμα και λεπτή γραμμή εικονίζεται το αρνητικό δείγμα ελέγχου και με άσπρο χρώμα και έντονη γραμμή το δείγμα με το αναφερόμενο αντίσωμα.

Στη συνέχεια, τα DC χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή των $CD4^+$ κυττάρων με την ακόλουθη διαδικασία:

Τα DC επεξεργάστηκαν με μιτομυκίνη C (βλέπε «Υλικά και Μέθοδοι») και μετά από 3 εκπλύσεις με HBSS, επωάσθηκαν σε x-vivo 15 με 50 μg/ml του επιθυμητού πεπτιδίου για 4 ώρες στους 37^{o}C, ώστε τα μόρια του πεπτιδίου να συνδεθούν με τα μόρια MHC της επιφάνειας των DC (να «φορτωθούν» τα DC). Στη συνέχεια, τα απομονωμένα $CD4^+$ κύτταρα διαμοιράστηκαν $5*10^4$ κύτταρα/θέση σε μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα και προστέθηκαν τα «φορτωμένα» με το πεπτίδιο DC στα 10^4 κύτταρα/θέση (αναλογία $CD4^+$: DC = 5:1), σε 200 μl βασικού θρεπτικού υλικού. Την τρίτη ημέρα αφαιρέθηκαν 100 μl υπερκειμένου της καλλιέργειας και προστέθηκαν 100 μl βασικό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 40 IU/ml IL-2, ώστε η τελική συγκέντρωση της IL-2 να είναι 20 IU/ml. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν στις αναπτυσσόμενες μικροκαλλιέργειες με μεσοδιαστήματα της μίας εβδομάδας ή περισσότερο, ανάλογα με την κατάσταση διέγερσης των

κυττάρων. Πριν την ενεργοποίηση τα κύτταρα έπρεπε, σε παρατήρηση στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο, να έχουν μικρύνει σε μέγεθος και να έχουν λάβει σφαιρική μορφή. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου με την οποία επωάζονταν τα DC υποδιπλασιαζόταν σε κάθε ενεργοποίηση.

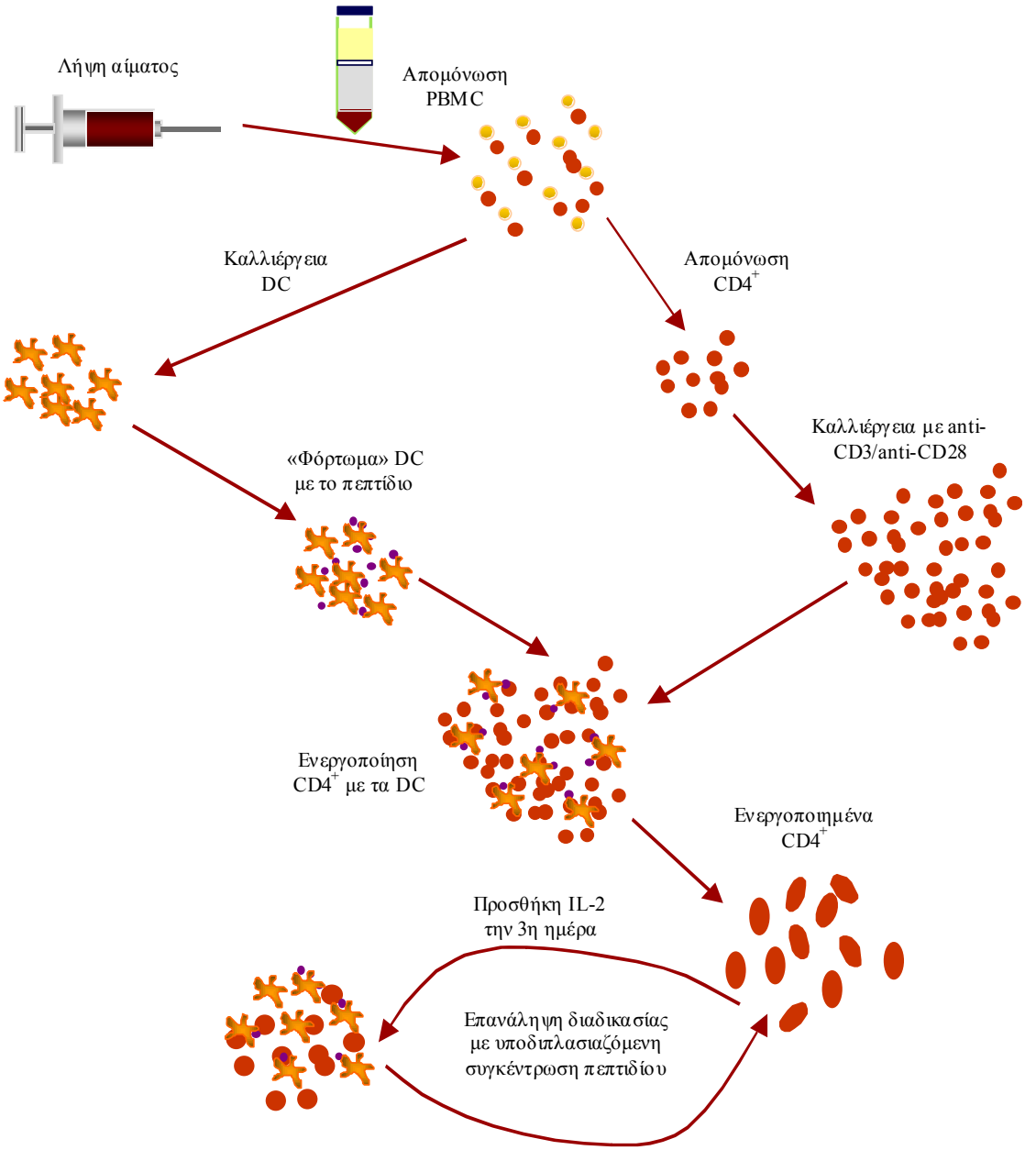
Αρχικά, ελέγχθηκε η απαιτούμενη συχνότητα χρήσης της κυτταροκίνης IL-2 στην καλλιέργεια. Τα κύτταρα χωρίσθηκαν σε δύο ομάδες. Στη μία η προσθήκη της IL-2 γινόταν την τρίτη ημέρα από την ενεργοποίηση και στη συνέχεια ανά 3 ημέρες μέχρι την επόμενη ενεργοποίηση, ενώ στη δεύτερη πραγματοποιείτο προσθήκη IL-2 μόνο την τρίτη ημέρα από την ενεργοποίηση, ανεξάρτητα αν η επόμενη γινόταν σε μεσοδιάστημα μίας εβδομάδας ή περισσότερο. Τα αποτελέσματα, μετά από τρεις ενεργοποιήσεις, παρουσιάζονται στο σχήμα 7.2.



Σχήμα 7.2. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα μετά από 2 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με πεπτίδιο, ανάλογα με τη συχνότητα προσθήκης IL-2 στην καλλιέργεια.

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η επαναλαμβανόμενη προσθήκη IL-2 στην καλλιέργεια, αυξάνει μεν την παραγωγή IFN-γ και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά αυτό γίνεται μη ειδικά. Τούτο ανάγεται από το γεγονός ότι ο δείκτης ενεργοποίησης (stimulation index, SI) στις καλλιέργειες με μονή προσθήκη IL-2 ανάμεσα στις ενεργοποιήσεις παρουσιάζεται μεγαλύτερος του δείκτη στις καλλιέργειες με επαναλαμβανόμενη προσθήκη IL-2, τόσο στη δοκιμασία παραγωγής IFN-γ, όσο και στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού.

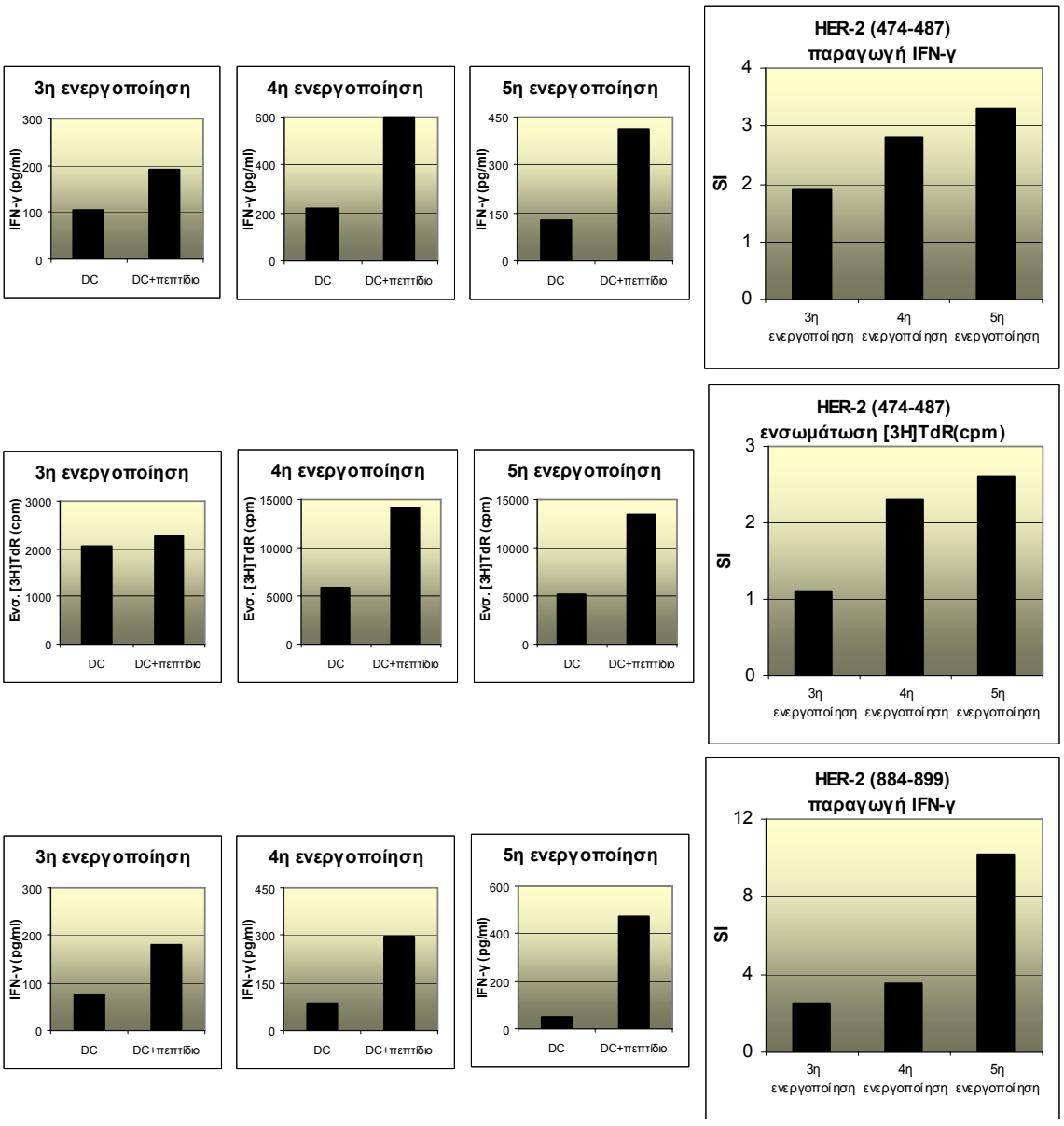
Με βάση τα παραπάνω, τροποποιήθηκε το αρχικό πρωτόκολλο εργασίας για την παραγωγή σειρών ειδικών Τ λεμφοκυττάρων, στο γεγονός ότι οι ενεργοποιήσεις γίνονται σε εβδομαδιαία ή δεκαήμερη συχνότητα (ανάλογα με την κατάσταση διέγερσης των κυττάρων, όπως προαναφέρθηκε) με προσθήκη IL-2 στο θρεπτικό υλικό μόνο την τρίτη ημέρα μετά την εκάστοτε ενεργοποίηση. Το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο παρουσιάζεται συνοπτικά στο σχήμα 7.3.

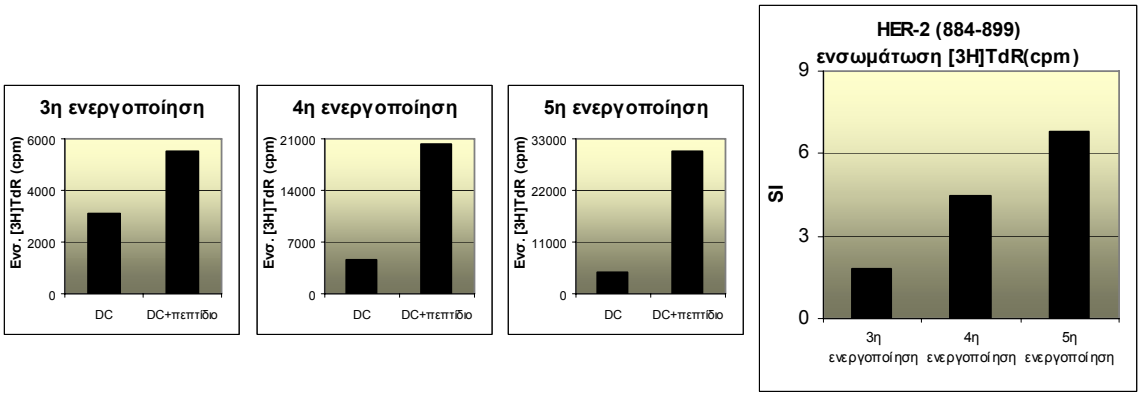


Σχήμα 7.3. Το πρωτόκολλο παραγωγής $CD4^+$T λεμφοκυττάρων ειδικών για πεπτίδια ογκοπρωτεϊνών

7.2. Αύξηση της αναλογίας των ειδικών για τα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια $CD4^{\pm}$ Τ κυττάρων στην καλλιέργεια μέσω επαναλαμβανόμενων ενεργοποιήσεων

Με την προσθήκη στην καλλιέργεια DC «φορτωμένων» με το πεπτίδιο, παρέχεται σήμα ενεργοποίησης στα Τ λεμφοκύτταρα που φέρουν TCR ειδικό για το συγκεκριμένο πεπτίδιο, με συνέπεια τον πολλαπλασιασμό τους και την αύξηση της αναλογίας τους στην καλλιέργεια. Επιπρόσθετα, τα Τ λεμφοκύτταρα που δεν λαμβάνουν σήμα ενεργοποίησης, δεν μπορούν να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους και πεθαίνουν. Η αύξηση της αναλογίας των ειδικών $CD4^{+}$ Τ κυττάρων στον ολικό πληθυσμό της καλλιέργειας φαίνεται από την αύξηση του SI καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ενεργοποιήσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.4.



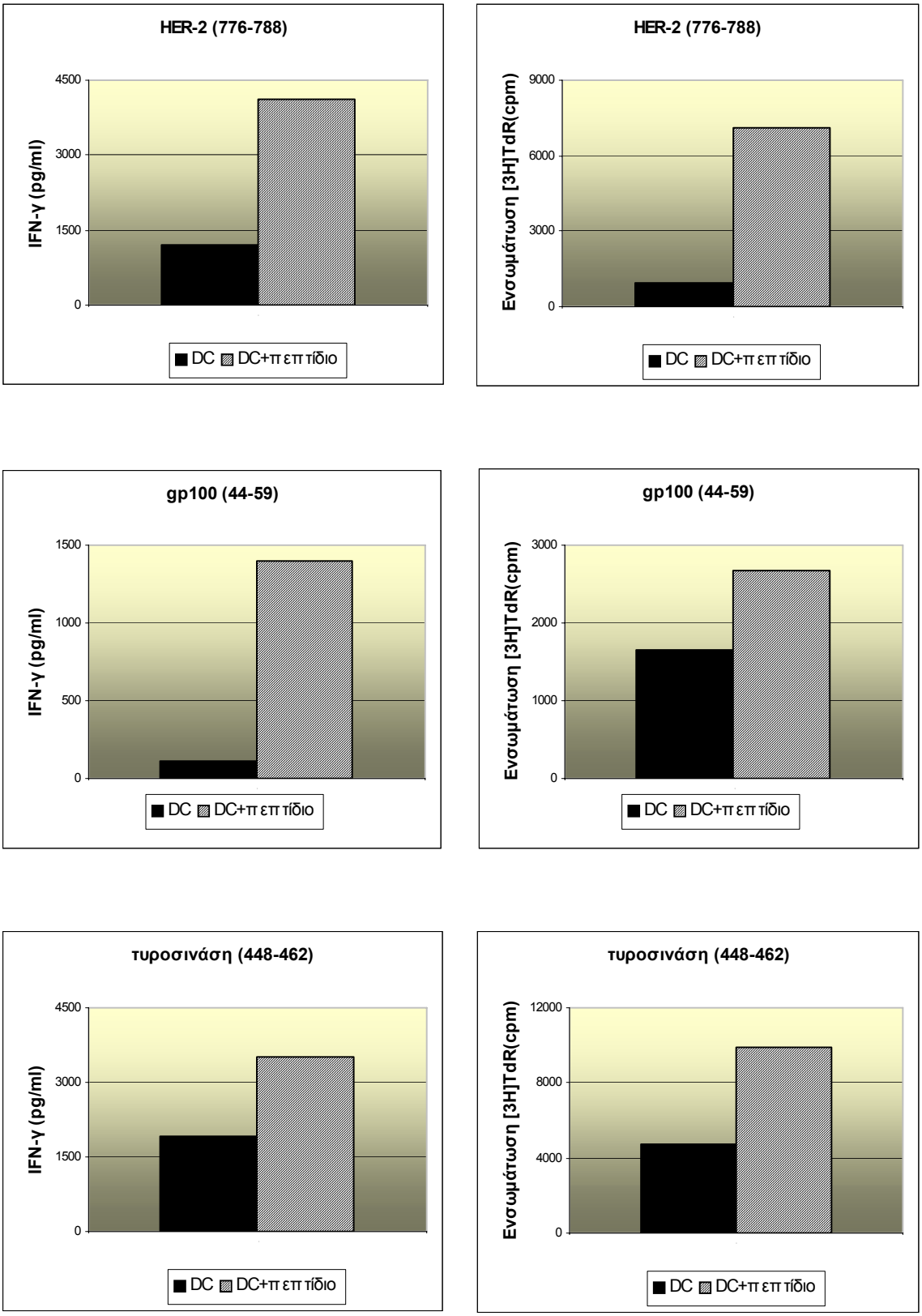


Σχήμα 7.4. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα μετά από επαναλαμβανόμενες ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με το πεπτίδιο HER-2 (474-487) ή το πεπτίδιο HER-2 (884-899) και συνοπτική παρουσίαση των αντίστοιχων SI.

Οι διαφορές στις απόλυτες τιμές έκλυσης IFN-γ και κρούσεων ανά λεπτό οφείλονται στη χρησιμοποίηση διαφορετικού αριθμού κυττάρων στις δοκιμασίες ανάλογα με τη διαθεσιμότητά τους. Το γεγονός αυτό δεν αλλοιώνει το αποτέλεσμα του δείκτη ενεργοποίησης (SI) διότι σε κάθε μεμονωμένη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων στις καλλιέργειες των «φορτωμένων» και των μη «φορτωμένων» DC.

Η αύξηση του δείκτη ενεργοποίησης αυξανομένου του αριθμού των ενεργοποιήσεων των $CD4^+$ Τ κυττάρων κάθε καλλιέργειας υποδηλώνει ότι, με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας σε $CD4^+$ Τ κύτταρα, ειδικά για το χρησιμοποιούμενο κάθε φορά πεπτίδιο. Επιτυγχάνεται δηλαδή, μετά από 5 ενεργοποιήσεις, η δημιουργία ειδικών κυτταρικών σειρών.

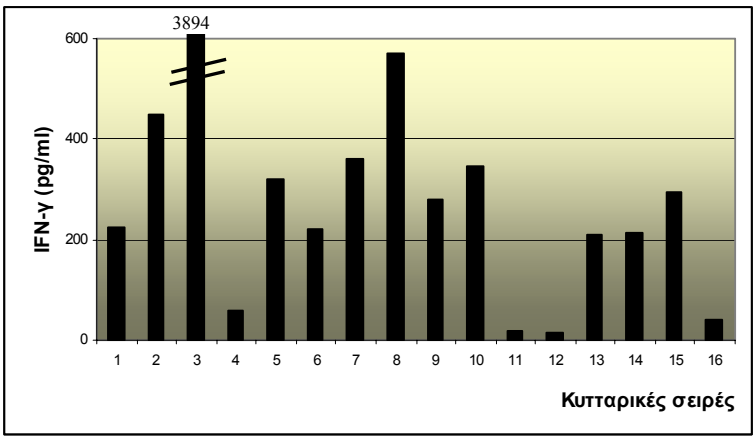
Για την επιβεβαίωση της δυνατότητας εφαρμογής του πρωτοκόλλου αυτού και για άλλα πεπτίδια, χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο HER-2 (776-788), ενώ για την εξέταση της εφαρμογής του πρωτοκόλλου και για άλλα καρκινικά αντιγόνα εκτός της HER-2/neu, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία με τα καρκινικά αντιγόνα του μελανώματος, gp100 και τυροσινάση. Τα αποτελέσματα, κατά την τρίτη ενεργοποίηση, παρουσιάζονται στο σχήμα 7.5.



Σχήμα 7.5. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα μετά από 3 ενεργοποιήσεις με αυτλόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερθέντα πεπτίδια καρκινικών αντιγόνων.

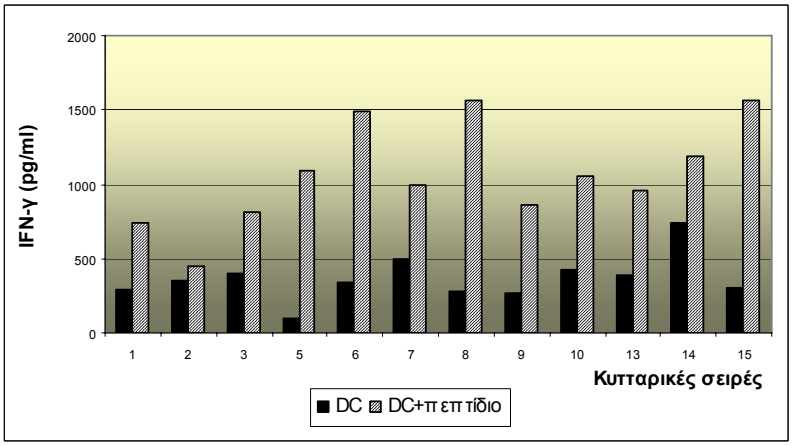
7.3. Επιλογή $CD4^{+}$ κυτταρικών σειρών

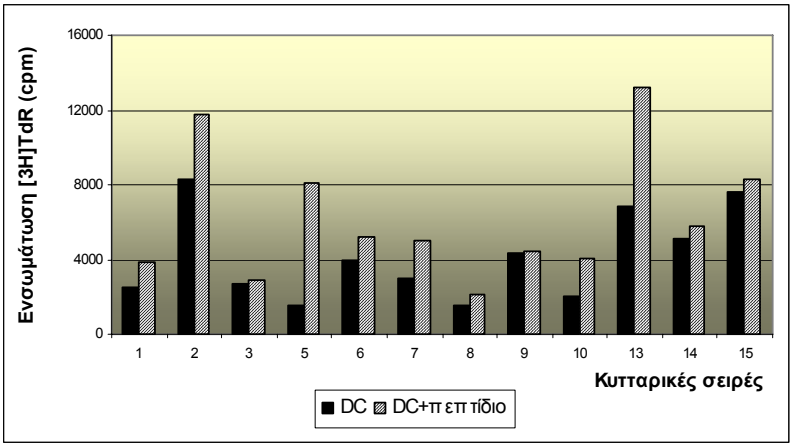
Η περαιτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε μόνο για το πεπτίδιο HER-2 (884-899). Μετά τις διαδοχικές ενεργοποιήσεις των $CD4^{+}$ Τ κυττάρων με DC «φορτωμένα» με το πεπτίδιο, προκύπτουν κυτταρικές σειρές ειδικές για το πεπτίδιο. Στη φάση αυτή, ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε κυτταρική σειρά είναι γενικά περιορισμένος. Για το λόγο αυτό, επάγεται μη ειδικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός με την προσθήκη PHA ή με την τοποθέτηση σε μικροπλάκες επιστρωμένες με αντισώματα αντί-CD3 και αντί-CD28. Όταν αποκτηθεί μεγάλος αριθμός κυττάρων, τα υπερκείμενα των καλλιεργειών ελέγχονται για την ικανότητα παραγωγής IFN-γ για τον αποκλεισμό σειρών που είναι πιθανά ανεργικές (σχήμα 7.6).



Σχήμα 7.6. Παραγωγή IFN-γ από $CD4^{+}$ κυτταρικές σειρές μετά από επαγωγή μη ειδικού πολλαπλασιασμού μέσω μη ειδικής για αντιγόνο κυτταρικής ενεργοποίησης.

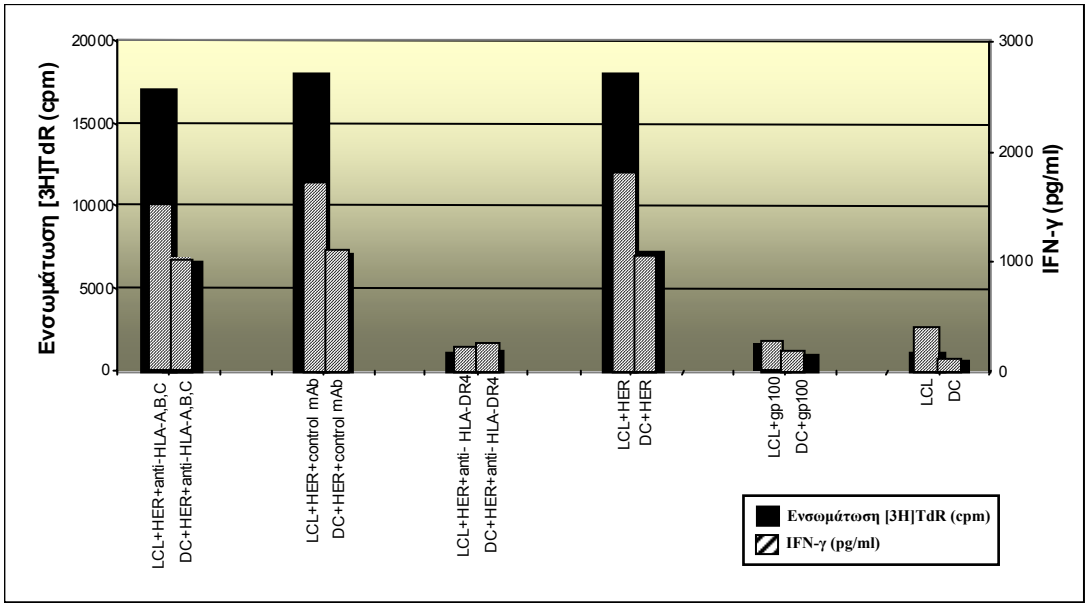
Από αυτές τις σειρές $CD4^{+}$ Τ κυττάρων, οι 4, 11, 12 και 16 θεωρούνται ανεργικές. Οι υπόλοιπες ελέγχονται για την ικανότητα ειδικής απάντησης στη διέγερση με το πεπτίδιο HER-2 (884-899). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.7 .





Σχήμα 7.7. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από $CD4^+$ κυτταρικές σειρές μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με το πεπτίδιο HER-2 (884-899).

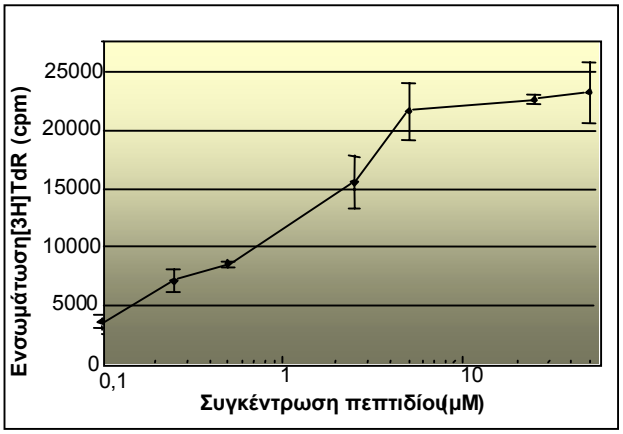
Από τα αποτελέσματα των δοκιμασιών έκκρισης IFN-γ και πολλαπλασιασμού, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά 5, δεδομένης της αυξημένης ειδικής έκκρισης IFN-γ και του ειδικού πολλαπλασιασμού σε απάντηση στο πεπτίδιο HER-2 (884-899) (SI 11.8 και 5.3 αντίστοιχα). Προκειμένου να κλωνοποιηθεί (cloning) η σειρά αυτή, ελέγχθηκε περαιτέρω ο μηχανισμός αναγνώρισης του πεπτιδίου. Για το σκοπό αυτό, διερευνήθηκε ο πολλαπλασιασμός και η έκκριση IFN-γ, χρησιμοποιώντας ως APC, τόσο αυτόλογα DC, όσο και ετερόλογα LCL από δότη ομόζυγο για το αλλήλιο HLA-DR4, ώστε να ελεγχθεί αν όντως το αλλήλιο αυτό περιορίζει την αναγνώριση του πεπτιδίου HER-2 (884-899) από τη δεδομένη σειρά Τ λεμφοκυττάρων. Επιπρόσθετα, προστέθηκε στην καλλιέργεια αντίσωμα ενάντια στο HLA-DR4, ενάντια στα HLA-A, B, C, καθώς και αντίσωμα ελέγχου για τον ισότυπο των δύο προηγούμενων αντισωμάτων, για να αποκλειστεί η μη ειδική πρόσδεσή τους. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα APC «φορτωμένα» με το μη σχετικό, ανοσογονικό πεπτίδιο gp100 (44-59) ως επιπλέον καλλιέργεια ελέγχου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 7.8. Η αυξημένη αντίδραση ενάντια στα μη «φορτωμένα» LCL που παρατηρείται στα διαγράμματα, οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για ετερόλογα κύτταρα, επάνω στα οποία αναγνωρίζονται και άλλα επιφανειακά μόρια εκτός από το μελετούμενο πεπτίδιο. Παρά ταύτα, το SI είναι πολύ υψηλό (5,9), ώστε να μην εγείρουν δυσκολία στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τα αυξημένα επίπεδα της αρνητικής καλλιέργειας ελέγχου (negative control).



Σχήμα 7.8. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από ειδική για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρική σειρά μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC ή ετερόλογα LCL ομόζυγα για το αλλήλιο HLA-DR4 «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών που προαναφέρθηκαν επιβεβαιώνουν ότι τα $CD4^+$ κύτταρα της μελετούμενης καλλιέργειας αναγνωρίζουν το πεπτίδιο HER-2 (884-899) επάνω σε αυτόλογα DC και αλλογενή HLA-DR4 ομόζυγα LCL, με τρόπο που αναστέλλεται από αντίσωμα ενάντια στο μόριο HLA-DR4, αλλά όχι ενάντια στα μόρια HLA-A, B, C. Επίσης, δεν αντιδρούν ενάντια στο μη σχετικό, αλλά ανοσογονικό πεπτίδιο gp100 (44-59).

Τέλος, εξετάσθηκε αν η αντίδραση της $CD4^+$ Τ κυτταρικής σειράς που απομονώθηκε εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πεπτιδίου (dose response). Για το λόγο αυτό, επωάσθηκαν DC με διαφορετικές συγκεντρώσεις HER-2 (844-899), κυμαινόμενες από 0.1 ως 14 μM και εξετάσθηκε η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της σειράς. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο σχήμα 7.9.



Σχήμα 7.9. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης από ειδική για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ κυτταρική σειρά μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντίστοιχου πεπτιδίου.

7.4. Παραγωγή κλώνων ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (884-899)

Η κλωνοποίηση (cloning) της καλλιέργειας που επιλέχθηκε, γίνεται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (limiting dilution) [Perez et al, 2003]. Για το σκοπό αυτό, γίνονται διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων της καλλιέργειας, μέχρι την πυκνότητα του 1 κυττάρου ανά ml θρεπτικού υλικού. Το εναιώρημα αυτό επιστρώνεται σε 10 μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα στα 100 μl/θέση μικροπλάκας. Με βάση τα παραπάνω, σε κάθε θέση αναλογεί 0,1 κύτταρο. Για την καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται βασικό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 0,75 μg/ml PHA. Για την ανάπτυξη των κλώνων είναι απαραίτητη η προσθήκη υποστηρικτικών κυττάρων, τα οποία είναι απενεργοποιημένα αλλογενή PBMC σε συγκέντρωση 50.000/θέση μικροπλάκας (για τη διαδικασία βλέπε «Υλικά και μέθοδοι»). Την τρίτη ημέρα από την έναρξη της καλλιέργειας και στη συνέχεια δύο φορές την εβδομάδα προστίθεται βασικό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 40 IU/ml IL-2.

Από τη διαδικασία αυτή, παρήχθησαν πολλοί κλώνοι, η ειδικότητα των οποίων για το χρησιμοποιούμενο πεπτίδιο έγινε με τις ανοσοενζυμικές δοκιμασίες ELISA και ELISPOT. Δεν έγινε δοκιμασία πολλαπλασιασμού λόγω πολύ περιορισμένου αριθμού κυττάρων. Με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA χρησιμοποιείται μόνο το υπερκείμενο της καλλιέργειας, ενώ με την τεχνική ELISPOT προσφέρεται η δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρών αριθμών λειτουργικών κυττάρων και τα κύτταρα δεν πεθαίνουν, αλλά μετά την επώαση στη μικροπλάκα της δοκιμασίας επιστρέφουν στην αρχική μικροπλάκα καλλιέργειας. Το εναιώρημα κάθε

θέσης μικροπλάκας που περιείχε κύτταρα χωρίστηκε σε δύο θέσεις. Στη μία προστέθηκαν αυτόλογα LCL «φορτωμένα» με το πεπτίδιο HER-2 (884-899) και στην άλλη LCL χωρίς πεπτίδιο. Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών αυτών ήταν τα ακόλουθα:

Πίνακας 7.1. Παραγωγή IFN-γ (pg/ml) επαγόμενη από το πεπτίδιο HER-2 (884-899)

Κλώνος	DC	DC+πεπτίδιο	Κλώνος	DC	DC+πεπτίδιο	Κλώνος	DC	DC+πεπτίδιο
1	28	114	24	8	87	47	43	51
2	48	96	25	1	17	48	30	45
3	12	49	26	13	141	49	59	126
4	0	5	27	9	0	50	0	44
5	165	181	28	3	12	51	14	31
6	0	21	29	108	242	52	4	27
7	33	33	30	12	28	53	0	27
8	89	109	31	59	93	54	51	272
9	0	45	32	2	15	55	19	192
10	0	0	33	0	33	56	26	269
11	0	0	34	3	16	57	165	435
12	0	0	35	37	63	58	135	175
13	0	15	36	31	40	59	51	50
14	66	121	37	30	80	60	83	170
15	0	0	38	19	78	61	129	153
16	0	9	39	17	16	62	39	52
17	9	45	40	75	103	63	25	31
18	1	7	41	16	25	64	110	121
19	4	139	42	33	89	65	16	72
20	9	444	43	45	189	66	1	22
21	0	3	44	41	76	67	54	57
22	0	11	45	44	48	68	125	127
23	0	0	46	21	31	69	15	71

Στον πίνακα 7.1 τα ποσά της IFN-γ παρουσιάζονται γενικά χαμηλά ή και μηδενικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην κάθε θέση της μικροπλάκας είναι δυνατό να υπήρχαν μόνο μερικές εκατοντάδες κύτταρα, οπότε η συγκέντρωση της IFN-γ στο υπερκείμενο είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Αντίθετα, το ELISPOT είναι μία πολύ ευαίσθητη τεχνική, η οποία ενδείκνυται στην περίπτωση που έχουμε μικρό αριθμό κυττάρων. Στον πίνακα 7.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας ELISPOT.

Πίνακας 7.2. Κηλίδες IFN-γ/θέση μικροπλάκας (ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISPOT)

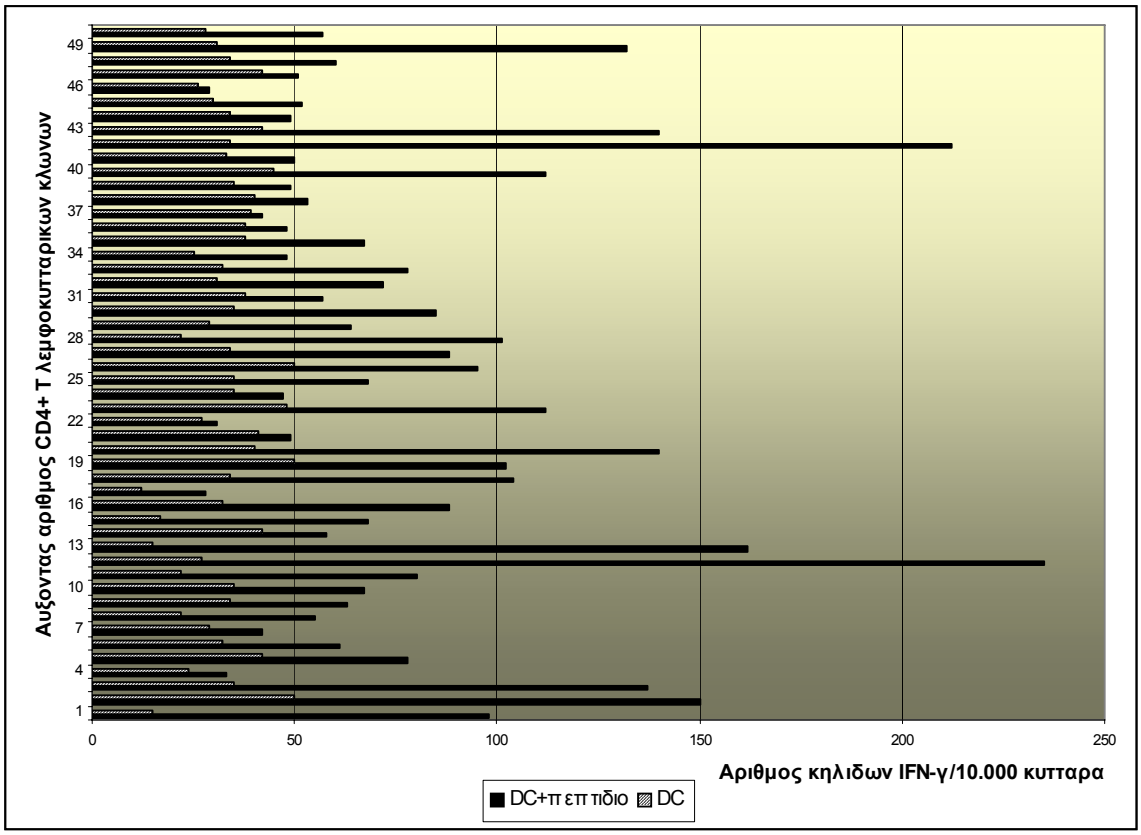
Κλώνος	DC	DC+πεπτίδιο	Κλώνος	DC	DC+πεπτίδιο	Κλώνος	DC	DC+πεπτίδιο
1	6	39	24	130++	>300+++	47	10	19
2	20	60	25	5	11	48	48++	118+++
3	14	55	26	34	54+	49	54++	92++
4	14	15	27	20	41	50	58++	67++
5	24	33	28	40	40++	51	60++	60+++
6	17	31	29	41	49	52	69	97
7	65	121	30	27	31	53	25	34
8	66+ [α]	17+++	31	48	112	54	29	64
9	9	22	32	42+++	86+++	55	31++	52+++
10	5	3	33	63	53	56	4	8
11	19	11	34	35	68	57	2	31
12	6	4	35	6	5	58	34	112+
13	15	20	36	20	38	59	17	56
14	85+	151++	37	34	88	60	38++	95++
15	14	27	38	22	101	61	30	52
16	9	32	39	18	45	62	51	58
17	11	94	40	14	34	63	9	10
18	6	65	41	10	10	64	83	102
19	37	39	42	43	89	65	34	60
20	70++	82+++	43	38	57	66	31	82+
21	7	8	44	5	7	67	28	57
22	42	53	45	31	72	68	18	10
23	7	27	46	32	78	69	61++	58++

[α] Τα σύμβολα «+»αφορούν σε διαλυτή IFN-γ, η οποία δίνει διάχυτο χρώμα στον πυθμένα της θέσης της μικροπλάκας του ELISPOT. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των συμβόλων «+» αυξάνεται και η ένταση του χρώματος άρα και η ποσότητα της διαλυτής IFN-γ.

Με βάση τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν απορρίπτονται οι κλώνοι 4, 10, 11, 12, 21, 28, 30, 35, 41, 44, 51, 62, 63, 68 και 69. Οι υπόλοιποι κλώνοι κλωνοποιούνται πάλι (subcloning), ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να έχουμε ολιγοκλωνική σειρά αντί για κλώνο. Δείγματα από τα κύτταρα κάθε θέσης μικροπλάκας τοποθετούνται σε μία μικροπλάκα 96 θέσεων, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με την προηγούμενη κλωνοποίηση.

7.5. Επιλογή $CD4^{\pm}$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων

Από τη δεύτερη κλωνοποίηση προέκυψαν 51 κλώνοι που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ELISPOT για την ειδική έκκριση IFN-γ, σε απάντηση σε DC «φορτωμένα» με το πεπτίδιο HER-2 (884-899). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.10.



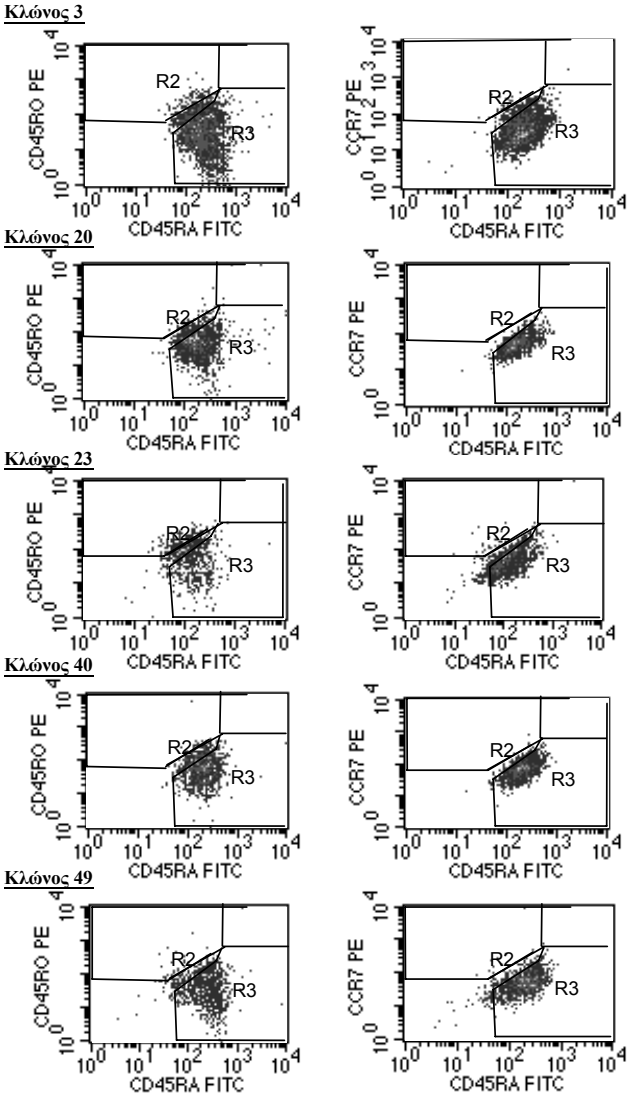
Σχήμα 7.10. Παραγωγή κηλίδων IFN-γ με τη μέθοδο ELISPOT από ειδική για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικούς κλώνους μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ELISPOT, θεωρήθηκαν ειδικές για το αντίστοιχο πεπτίδιο οι κηλίδες IFN-γ, όταν ο αριθμός των κηλίδων που μετρήθηκε ανά 10^4 κύτταρα στις μικροκαλλιέργειες που περιείχαν DC «φορτωμένα» με πεπτίδιο ήταν μεγαλύτερος του αριθμού των κηλίδων στην αντίστοιχη μικροκαλλιέργεια που περιείχε μη «φορτωμένα» DC συν το διπλάσιο της σταθερής απόκλισης του συνόλου των μικροκαλλιέργειών με μη «φορτωμένα» DC. Με τον τρόπο αυτό, θετικοί θεωρήθηκαν 18 κλώνοι, οι οποίοι πολλαπλασιάστηκαν περαιτέρω με την επανάληψη ενός κύκλου μη ειδικής ενεργοποίησης με PHA. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν να αυξηθούν σε αριθμούς κατάλληλους για μελέτη πέντε κλώνοι, αυτοί με αύξοντα αριθμό 3, 20, 23, 40 και 49.

7.6. Φαινοτυπική μελέτη των $CD4^{\pm}$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων

Οι κλώνοι που προέκυψαν επεξεργάσθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση επιφανειακών μορίων.

Καταρχήν εξετάσθηκε αν τα κύτταρα που προέκυψαν είναι δραστικά ή κύτταρα μνήμης. Η διερεύνηση αυτή έγινε με τον έλεγχο της παρουσίας των ισομορφών CD45RA και CD45RO του επιφανειακού μορίου CD45, καθώς και του μορίου CCR7. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.11.

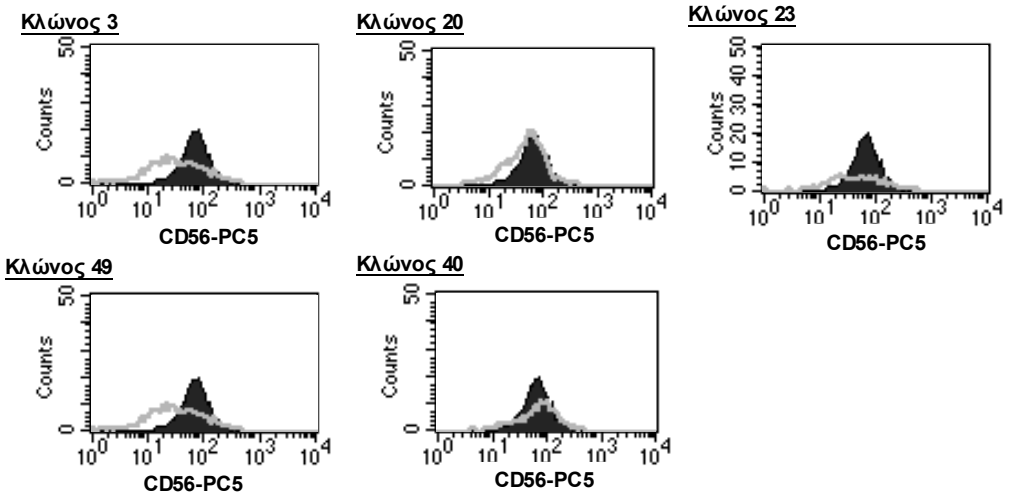


Σχήμα 7.11. Παρουσία των μορίων CD45RA, CD45RO και CCR7 στην επιφάνεια των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικών κλώνων.

Από τα γραφήματα της κυτταρομετρίας ροής διαπιστώθηκε ότι όλοι οι κλώνοι εκφράζουν την ισομορφή CD45RA (92-99%), ενώ η έκφραση της ισομορφής CD45RO δεν ξεπερνά σε κανέναν κλώνο το 1%. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι πρόκειται για δραστικά κύτταρα και όχι για κύτταρα μνήμης, τα οποία σε περίπτωση in vivo έγχυσης, θα μπορούσαν να παράγουν κυτταροκίνες και να οργανώσουν την

ανοσολογική απάντηση ενάντια στα κύτταρα που φέρουν το συγκεκριμένο αντιγόνο. Επίσης, δεν εμφανίζουν το επιφανειακό μόριο CCR7 (η έκφρασή του περιορίζεται στο 0-0.9% των κυττάρων), γεγονός που σημαίνει ότι δεν έχουν την τάση να εισέλθουν στους λεμφαδένες, αλλά μπορούν να μεταναστεύουν στους ιστούς και να επιτελούν εκεί τη λειτουργική τους δράση.

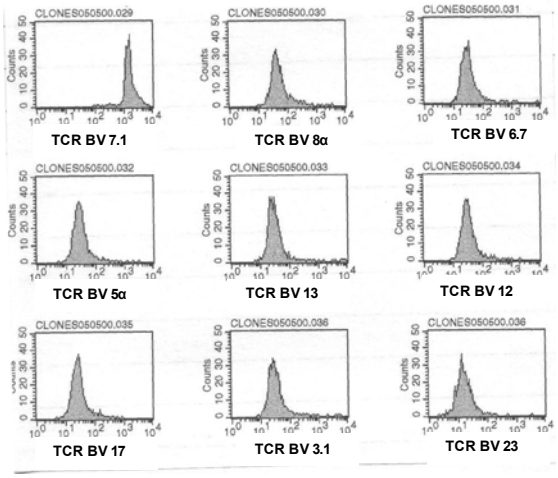
Στη συνέχεια εξετάσθηκε η παρουσία του επιφανειακού δείκτη CD56, για τον έλεγχο της ύπαρξης NKT κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν το φαινότυπο $CD3^{+}CD56^{+}$. Όπως δείχνουν τα διαγράμματα του σχήματος 7.12 οι κλώνοι που απομονώθηκαν δεν εκφράζουν CD56 και συνεπώς αποτελούνται αποκλειστικά από T κύτταρα και όχι NKT.



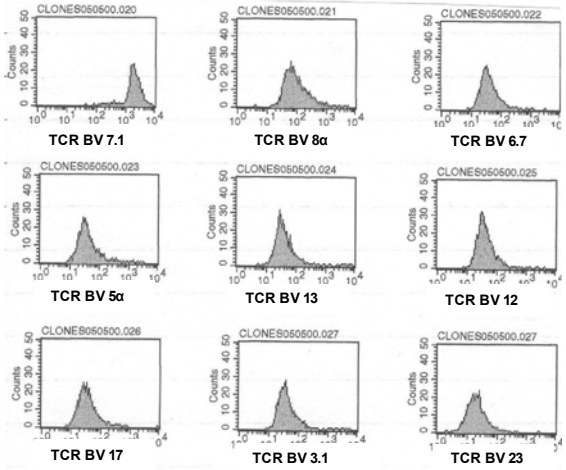
Σχήμα 7.12. Έκφραση του μορίου CD56 στην επιφάνεια των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^{+}$ λεμφοκυτταρικών κλώνων. Με το σκούρο χρώμα απεικονίζεται το δείγμα ελέγχου (αντίσωμα χωρίς ειδικότητα για το συγκεκριμένο μόριο) και με την ανοικτόχρωμη γραμμή το δείγμα με το αντίσωμα ενάντια στο μόριο CD56.

Τέλος, ανιχνεύθηκαν οι περιοχές υψηλής μεταβλητότητας του TCR, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε η παρουσία TCR-BV7.1, -BV8α, -BV6.7, -BV5α, -BV13, -BV12, -BV17, -BV3.1 και -BV23 Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.13.

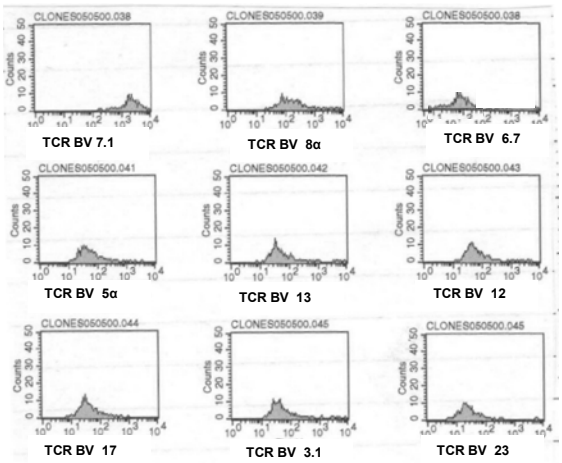
Κλώνος 3



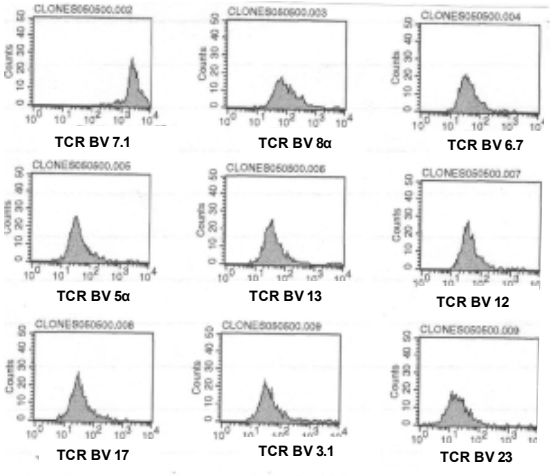
Κλώνος 20



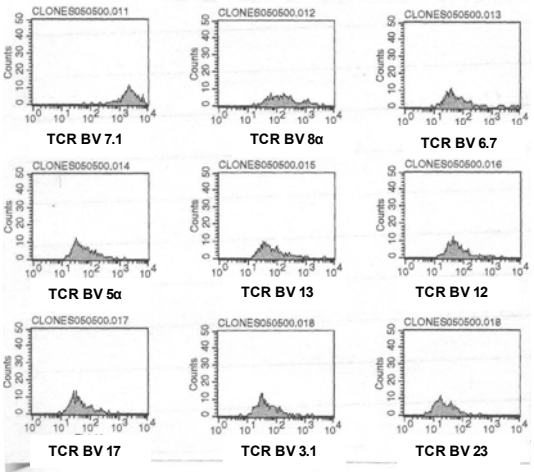
Κλώνος 23



Κλώνος 40



Κλώνος 43

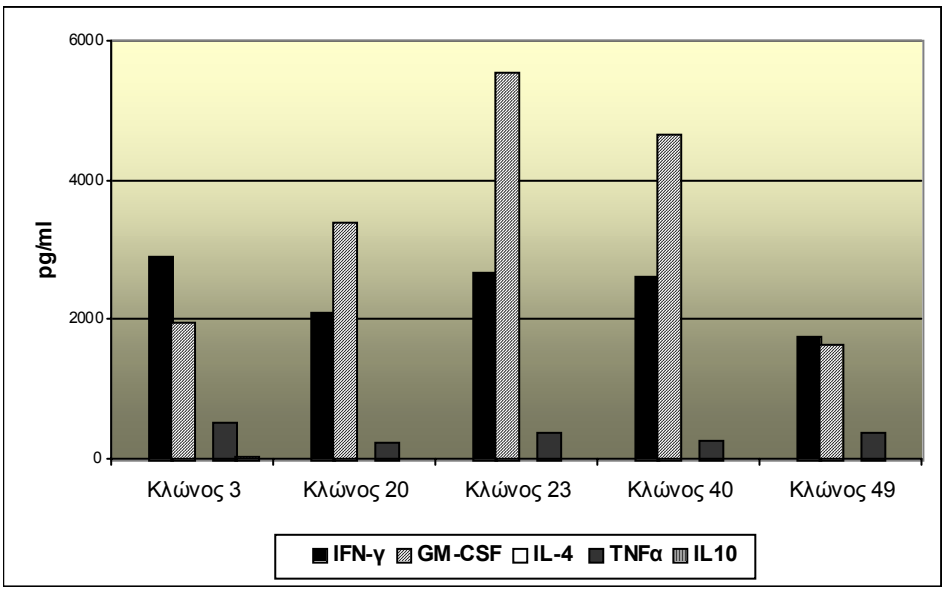


Σχήμα 7.13. Μελέτη των περιοχών υψηλής μεταβλητότητας του υποδοχέα TCR των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικών κλώνων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι μελετούμενοι κλώνοι εκφράζουν τη μεταβλητή περιοχή TCR BV 7.1 με μέση πυκνότητα φθορισμού (mean fluorescence intensity, MFI) 1490-2250, ενώ για όλα τα άλλα αντισώματα, ενάντια στα υπόλοιπα TCR BV, η MFI είναι 30-75, στα επίπεδα δηλαδή των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (MFI 35-71). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αναγνώριση του πεπτιδίου HER-2 (884-899) παρουσιάζεται ευνοημένη στα Τ κύτταρα που φέρουν τους υποδοχείς TCR BV7.1, χωρίς να μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα να έχουμε αδελφούς κλώνους (sister clones), δηλαδή κλώνους που προέκυψαν από το ίδιο κύτταρο. Η περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου αυτού απαιτεί έλεγχο με μεθόδους μοριακής βιολογίας.

7.7. Λειτουργική μελέτη των $CD4^{\pm}$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων

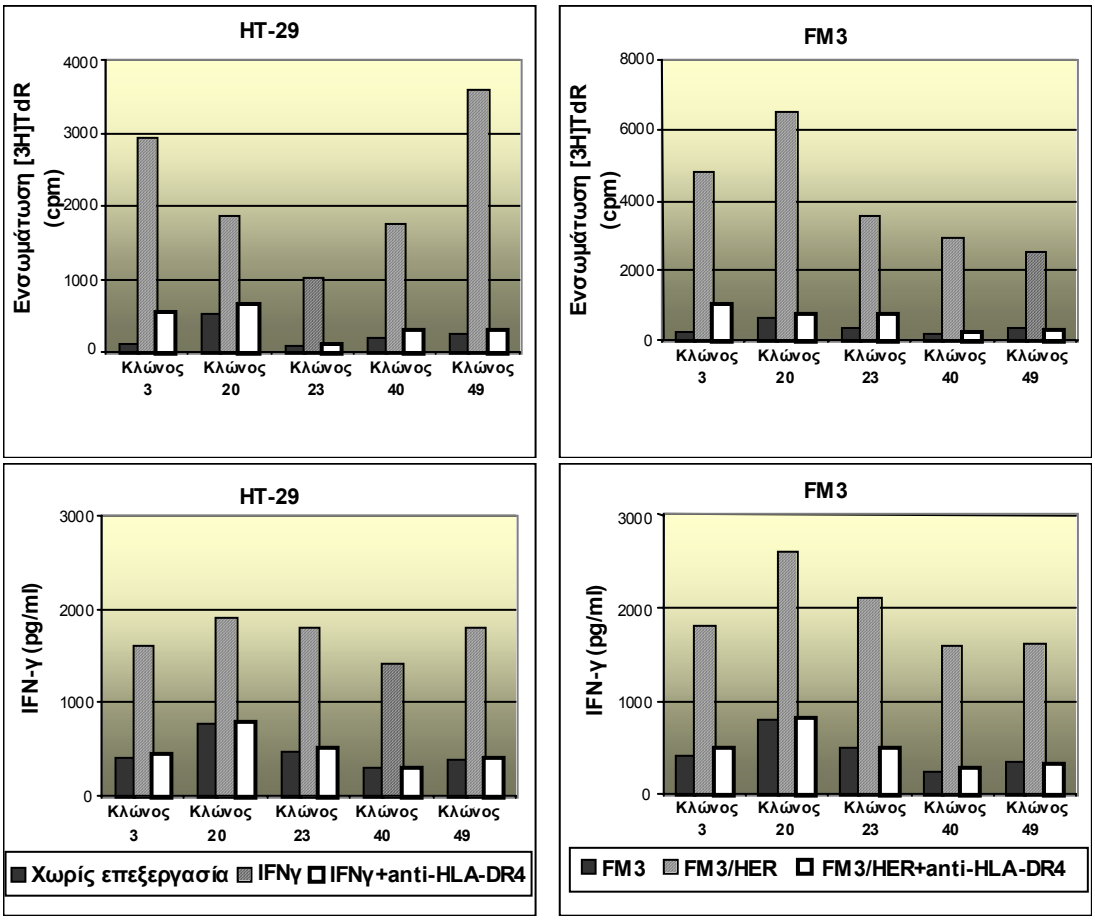
Οι κλώνοι που προέκυψαν εξετάσθηκαν για τις κυτταροκίνες που δύνανται να παράγουν σε απόκριση μετά από διέγερση με DC «φορτωμένα» με το πεπτίδιο HER-2 (884-899). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.14.



Σχήμα 7.14. Παραγωγή κυτταροκινών, όπως ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο ELISA από τους ειδικούς για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^{+}$ λεμφοκυτταρικούς κλώνους.

Η παραγωγή υψηλών ποσών IFN-γ (1750-2910 pg/ml), GM-CSF (1650-5540 pg/ml), καθώς και ποσοτήτων TNF-α (230-510 pg/ml) με τη σύγχρονη απουσία ανιχνεύσιμων επιπέδων IL-4 (7-12 pg/ml) και IL-10 (8-21 pg/ml), δείχνει ότι έχουμε TH1 τύπο ανοσοαπόκρισης, έχουμε δηλαδή βοηθητικά Τ κύτταρα ικανά να παράγουν κυτταροκίνες που επάγουν κυτταρικό τύπο ανοσίας.

Στη συνέχεια, οι $CD4^{+}$ Τ κυτταρικοί κλώνοι ελέγχθηκαν για την ικανότητα να αναγνωρίζουν το πεπτίδιο HER-2 (884-899) στην επιφάνεια κυττάρων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HT-29 (καρκίνου του παχέως εντέρου), η οποία φυσιολογικά εκφράζει HER-2/neu, αλλά όχι μόρια HLA-DR4 στην επιφάνεια. Με την προσθήκη όμως στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας 100 IU/ml IFN-γ μπορεί να επαχθεί η έκφραση των μορίων αυτών. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε η $HLA\text{-}DR4^{+}$ κυτταρική σειρά μελανώματος FM3, η οποία φυσιολογικά δεν εκφράζει HER-2/neu στην επιφάνεια. Η κυτταρική σειρά FM3 τροποποιήθηκε γενετικά, ώστε να εκφράζει την ογκοπρωτεΐνη αυτή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 7.15.

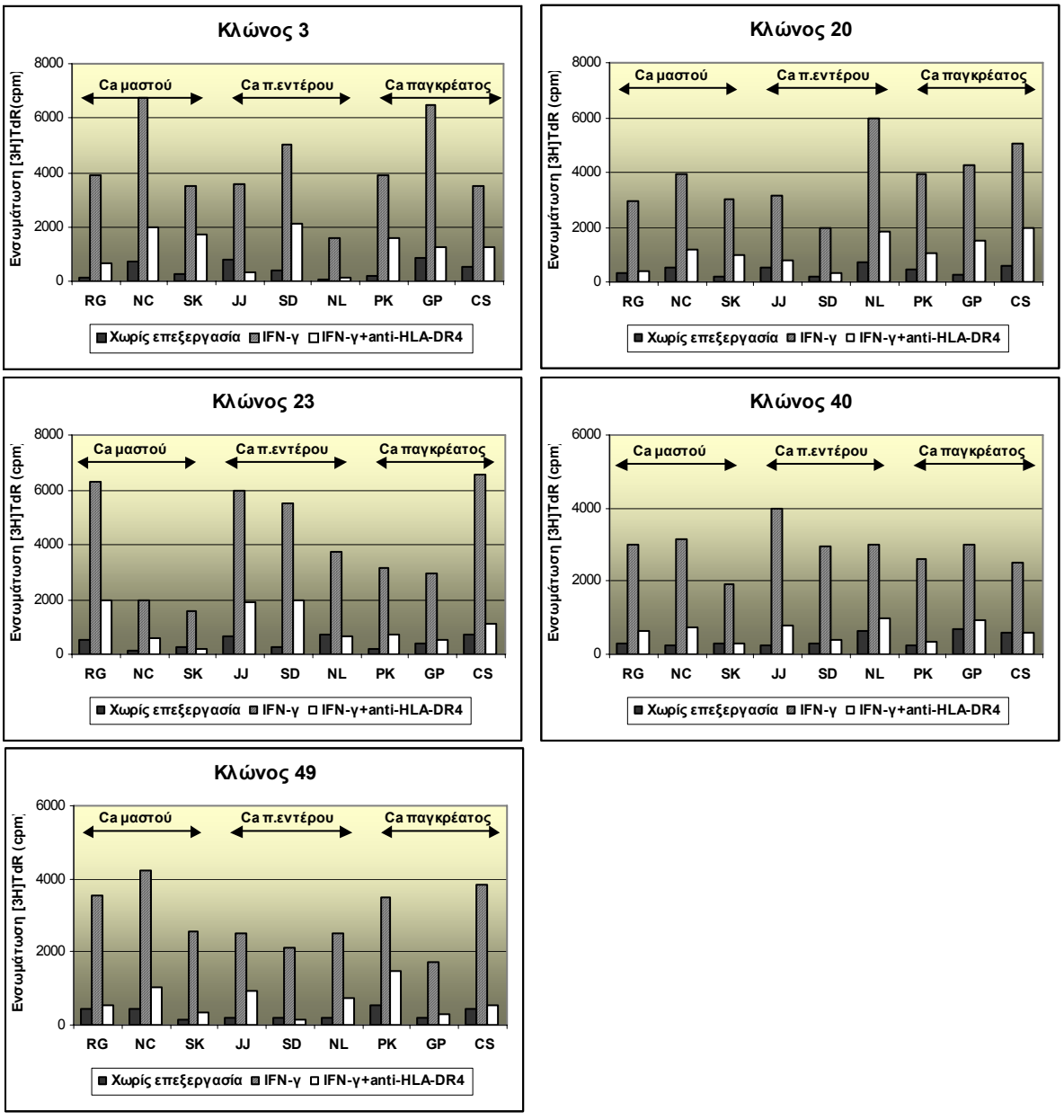


Σχήμα 7.15. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από τους ειδικούς για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικούς κλώνους μετά από επαγωγή με τις κυτταρικές σειρές HT-19 (με ή χωρίς επώαση με IFN-γ για την έκφραση μορίων HLA-τάξης II στην επιφάνεια) και FM3 (μετασχηματισμένη ώστε να εκφράζει HER-2/neu) και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ειδικοί για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ Τ κλώνοι αναγνωρίζουν το πεπτίδιο στην επιφάνεια κυττάρων που εκφράζουν στην ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu σε συνδυασμό με τα μόρια HLA-DR4. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι μελετούμενοι κλώνοι δεν μπορούν να το αναγνωρίσουν αν δεν επαχθεί η έκφραση των μορίων HLA-DR4 με IFN-γ στα HT-29 κύτταρα. Επίσης η προσθήκη αντισώματος ενάντια στο μόριο αυτό αναστέλλει την αναγνώριση τόσο των HT-29, όσο και των FM3/HER κυττάρων.

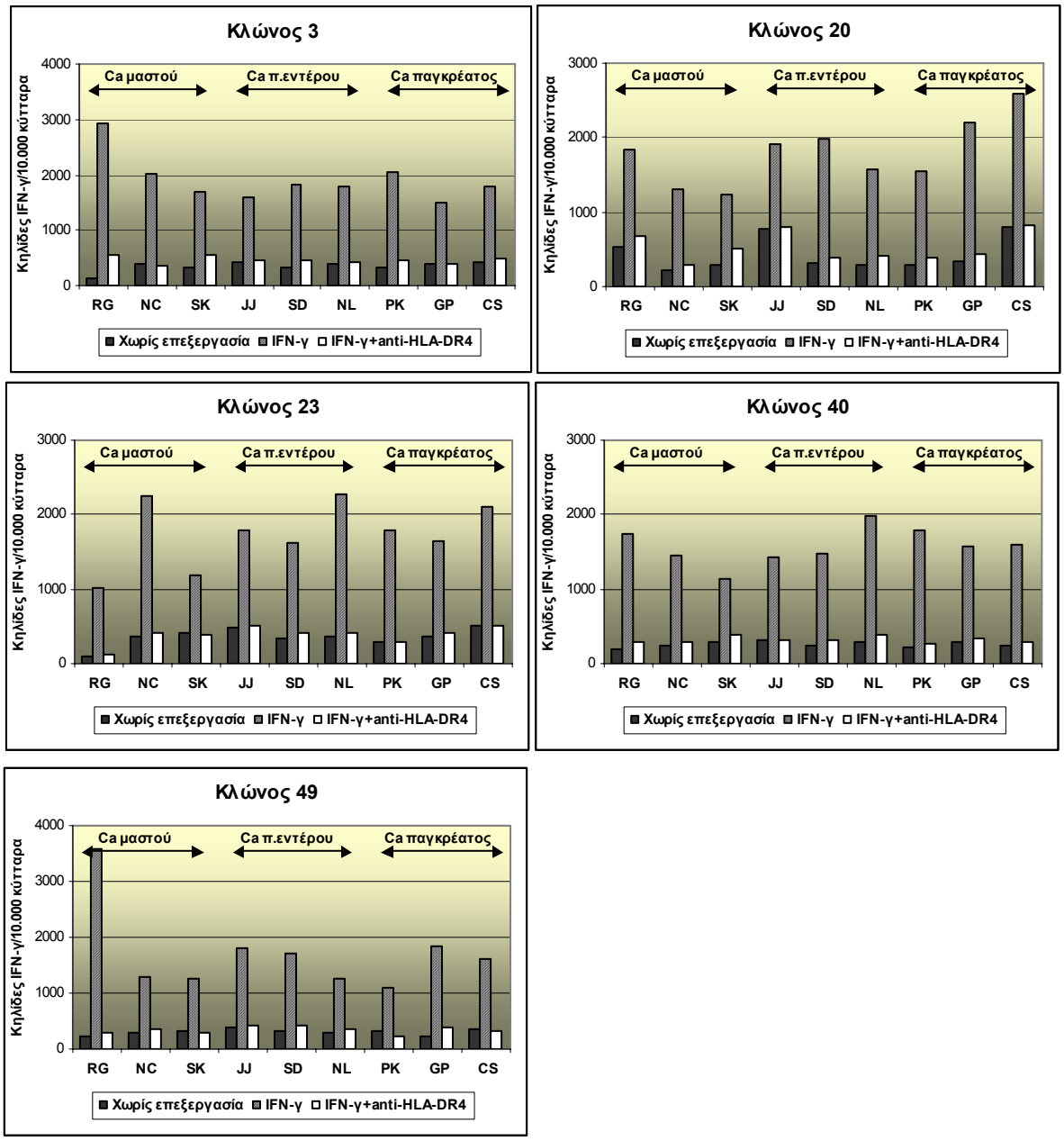
Τέλος, οι απομονωθέντες κλώνοι ελέγχθηκαν για την ικανότητα να αναγνωρίζουν καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από $HLA\text{-}DR4^+$ ασθενείς με μεταστατικούς τύπους καρκίνου. Οι ασθενείς των οποίων τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RG, NC και SK με καρκίνο του μαστού, οι JJ, SD και NL με καρκίνο του παχέως εντέρου και οι ασθενείς PK, GP και CS με καρκίνο του παγκρέατος. Για τον έλεγχο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ως APC καρκινικά κύτταρα από

το ασκιτικό ή το πλευριτικό υγρό των ασθενών, επεξεργασμένα με IFN-γ (όπως τα κύτταρα της σειράς HT-29, στην προηγούμενη παράγραφο) ώστε να επαχθεί η επιφανειακή έκφραση HLA-DR4. Ως καλλιέργειες ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια κύτταρα χωρίς επεξεργασία με IFN-γ, όπως και κύτταρα στα οποία έχει μεν επαχθεί η επιφανειακή έκφραση HLA-DR4, αλλά έχει προστεθεί στην καλλιέργεια αντίσωμα ενάντια στα μόρια αυτά (αντί-HLA-DR4) ώστε να μπλοκαριστεί η σύνδεση του πεπτιδίου με το μόριο MHC. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης παρουσιάζονται στο σχήμα 7.16.



Σχήμα 7.16. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης από τους ειδικούς για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικούς κλώνους μετά από ενεργοποίηση με καρκινικά κύτταρα ασθενών με ή χωρίς επώαση με IFN-γ για την έκφραση μορίων HLA-τάξης II και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.

Τα αποτελέσματα της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας ELISPOT για τον κάθε κλώνο παρουσιάζονται στο σχήμα 7.17.



Σχήμα 7.17. Παραγωγή IFN-γ από τους ειδικούς για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικούς κλώνους μετά από ενεργοποίηση με καρκινικά κύτταρα ασθενών με ή χωρίς επώαση με IFN-γ για την έκφραση μορίων HLA-τάξης II και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.

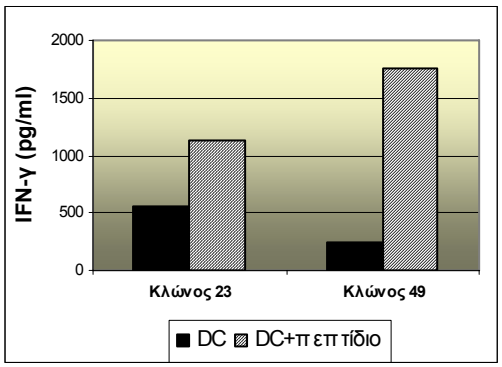
Όπως παρουσιάζεται στα διαγράμματα που προηγήθηκαν, οι κλώνοι $CD4^+$ Τ κυττάρων που απομονώθηκαν, αναγνωρίζουν το πεπτίδιο HER-2 (884-899) επάνω σε καρκινικά κύτταρα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του παχέως εντέρου ή του παγκρέατος (SI = 4.5-17 για την ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και 2.4-26.6 για τη δοκιμασία ELISPOT). Η αναγνώριση αυτή είναι HLA-DR4-

περιοριζόμενη, δεδομένου ότι η έλλειψη επώασης των καρκινικών κυττάρων με IFN-γ ή η προσθήκη αντισώματος αντί-HLA-DR4 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την παραγωγή IFN-γ μέχρι και 90%.

7.8. Λειτουργική μακροβιότητα των $CD4^{\pm}$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων

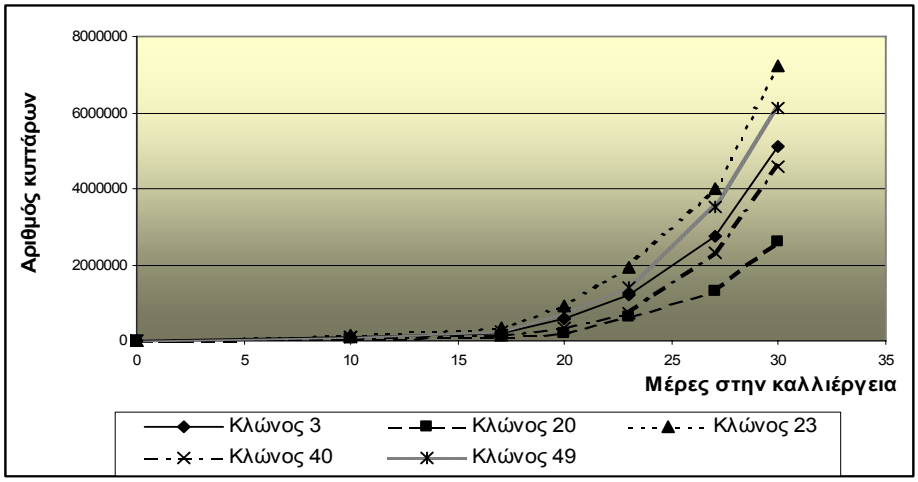
Με απώτερο στόχο την παραγωγή κυττάρων με δυνατότητα χρήσης στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, είναι απαραίτητο οι κλώνοι που απομονώνονται να μπορούν να αυξηθούν σε μεγάλους αριθμούς και να παραμένουν λειτουργικοί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τα πειράματα που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, σχετικά με τη λειτουργικότητα των κλώνων έγιναν σε χρονικό διάστημα έως και 5 μηνών μετά την κλωνοποίηση, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι κλώνοι αυτοί παραμένουν ενεργοί για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Εξάλλου, η λειτουργικότητά τους δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία ψύξης και απόψυξης (σχήμα 7.18).



Σχήμα 7.18. Παραγωγή IFN-γ από 2 ειδικούς για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^{+}$ λεμφοκυτταρικούς κλώνους μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο, μετά από έναν κύκλο ψύξης-απόψυξης.

Όσον αφορά στον αριθμό των κυττάρων που προκύπτουν με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, για τους κλώνους 3, 20, 23, 40 και 49, εκτός από τις δοκιμασίες που ήδη περιγράφηκαν, έγινε επιπλέον μέτρηση των κυττάρων της καλλιέργειας για χρονικό διάστημα ενός μηνός (σχήμα 7.19).



Σχήμα 7.19. Ρυθμός ανάπτυξης των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) $CD4^+$ λεμφοκυτταρικών κλώνων, με εκκίνηση τη φάση της κλωνοποίησης όπου κάθε κλώνος αντιπροσωπεύεται από ένα κύτταρο.

Παρατηρείται ότι μέσα σε ένα μήνα από την κλωνοποίηση, όπου ο κάθε κλώνος αντιπροσωπεύεται από ένα κύτταρο, είναι δυνατό να παραχθεί μεγάλος αριθμός κυττάρων. Στις περιπτώσεις των κλώνων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ο αριθμός αυτός κυμαίνεται από $2.6x10^6$ έως $7.2\ x10^6$ και παρήχθησαν μέσα στο χρονικό διάστημα ενός μηνός. Πρόκειται για κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, σε διάφορες φάσεις πολλαπλασιασμού στις δοκιμασίες που προαναφέρθηκαν, πρόκειται δηλαδή για λειτουργικά κύτταρα, ικανά να πολλαπλασιαστούν ειδικά και να παράγουν κυτταροκίνες ως απάντηση στη σύνδεση του TCR τους με το αντίστοιχο σύμπλοκο πεπτιδίου/μορίου APC.

8. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΕΠΙΤΟΠΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΟΜΕΝΟΥΣ ΑΠΟ $CD4^+$ ΚΑΙ $CD8^+$ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

8.1. Επιλογή νέων επιτόπων με βάση τη δυνατότητα σύνδεσής τους με αλλήλια MHC τάξης II

Ο απώτερος στόχος στην ταυτοποίηση ενός πεπτιδίου από ένα καρκινικό αντιγόνο, είναι η χρήση του στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Δεδομένου ότι η ανοσολογική απάντηση του ειδικού κλάδου του ανοσολογικού συστήματος είναι MHC-περιοριζόμενη, η επιλογή του πεπτιδίου πρέπει να πραγματοποιηθεί με γνώμονα τη συχνότητα των διαφορετικών αλληλίων του MHC στο γενικό πληθυσμό. Ένας επίτοπος που συνδέεται με ένα αλλήλιο MHC το οποίο απαντάται σε μεγάλη μερίδα του πληθυσμού, έχει και την πιθανότητα ευρείας χρήσης σε ανοσοθεραπευτικούς εμβολιασμούς.

Από τα αλλήλια τάξης II του MHC, τα πιο συχνά απαντούμενα είναι τα HLA-DR4, -DR7, -DR11 και -DR15, με συχνότητες 15.8%, 13.4%, 12.6% και 12.1% αντίστοιχα [Muller et al, 2003]. Με βάση τις συχνότητες αυτές, καθώς και την HLA-τυποποίηση των αιμοδοτών του εργαστηρίου μας, αποφασίσθηκε να διερευνηθεί η αλληλουχία της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu για την παρουσία νέων επιτόπων που δύνανται να συνδεθούν με τα αλλήλια HLA-DR4 και HLA-DR11.

Από τους αλγορίθμους ηλεκτρονικών υπολογιστών, οι οποίοι επιτρέπουν την επιλογή υποψήφιων πεπτιδίων από πολυπεπτιδικές αλυσίδες, επιλέχθηκε η βάση δεδομένων συνδετών και πεπτιδικών μοτίβων SYFPEITHI (βλέπε «Υλικά και μέθοδοι»). Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων παρέχει τη δυνατότητα αναγνώρισης επιτόπων που δύνανται να συνδεθούν με επιλεγμένα αλλήλια του MHC και παρουσιάζει τη σχετική ισχύ σύνδεσης. Τα αποτελέσματα δίνονται σε μονάδες ισχύος σύνδεσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή αυτή, τόσο περισσότερο ευνοείται η σύνδεση του πεπτιδίου με το αλλήλιο MHC που τέθηκε σε αναζήτηση στη βάση δεδομένων.

Στη βάση δεδομένων SYFPEITHI εισήχθη η αλληλουχία των 1255 αμινοξέων της πρωτεΐνης HER-2/neu και αναζητήθηκαν όλα τα 15πεπτίδια που δεσμεύονται ισχυρά (ισχύς σύνδεσης μεγαλύτερη των 22 μονάδων) στα αλλήλια HLA-DR4 και HLA-DR11. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 8.1 και 8.2 αντίστοιχα.

Πίνακας 8.1 Δεκαπενταπεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu με ισχύ δέσμευσης για το αλλήλιο HLA-DR4 μεγαλύτερη του 22, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων SYFPEITHI. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζεται η θέση του αμινοξέος έναρξης του πεπτιδίου στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, στη δεύτερη η αλληλουχία του και στην τρίτη στήλη η σχετική ισχύς σύνδεσης με τα μόρια HLA-DR4.

HLA-DRB1*0401

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5	score
70	**S** L S **F** L **Q** **D** I **Q** E V Q G Y V	28
80	**V** Q G **Y** V **L** **I** A **H** N Q V R Q V	28
166	**T** I L **W** K **D** **I** F **H** K N N Q L A	28
966	**R** P R **F** R **E** **L** V **S** E F S R M A	28
983	**P** Q R **F** V **V** **I** Q **N** E D L G P A	28
1109	**L** Q R **Y** S **E** **D** P **T** V P L P S E	28
40	**E** T H **L** D **M** **L** R **H** L Y Q G C Q	26
43	**L** D M **L** R **H** **L** Y **Q** G C Q V V Q	26
59	**N** L E **L** T **Y** **L** P **T** N A S L S F	26
178	**Q** L A **L** T **L** **I** D **T** N R S R A C	26
311	**C** T L **V** C **P** **L** H **N** Q E V T A E	26
350	**L** R E **V** R **A** **V** T **S** A N I Q E F	26
419	**L** P D **L** S **V** **F** Q **N** L Q V I R G	26
455	**L** R S **L** R **E** **L** G **S** G L A L I H	26
544	**C** R V **L** Q **G** **L** P **R** E Y V N A R	26
648	**A** S P **L** T **S** **I** I **S** A V V G I L	26
751	**A** I K **V** L **R** **E** N **T** S P K A N K	26
771	**A** Y V **M** A **G** **V** G **S** P Y V S R L	26
836	**L** E D **V** R **L** **V** H **R** D L A A R N	26
909	**G** V T **V** W **E** **L** M **T** F G A K P Y	26
969	**F** R E **L** V **S** **E** F **S** R M A R D P	26
976	**F** S R **M** A **R** **D** P **Q** R F V V I Q	26
170	**K** D I **F** H **K** **N** N **Q** L A L T L I	22
271	**L** V T **Y** N **T** **D** T **F** E S M P N P	22
286	**E** G R **Y** T **F** **G** A **S** C V T A C P	22
298	**A** C P **Y** N **Y** **L** S **T** D V G S C T	22
378	**P** E S **F** D **G** **D** P **A** S N T A P L	22
408	**G** Y L **Y** I **S** **A** W **P** D S L P D L	22
449	**G** I S **W** L **G** **L** R **S** L R E L G S	22
479	**T** V P **W** D **Q** **L** F **R** N P H Q A L	22
483	**D** Q L **F** R **N** **P** H **Q** A L L H T A	22
518	**G** H C **W** G **P** **G** P **T** Q C V N C S	22
551	**P** R E **Y** V **N** **A** R **H** C L P C H P	22
574	**V** T C **F** G **P** **E** A **D** Q C V A C A	22
613	**I** W K **F** P **D** **E** E **G** A C Q P C P	22
668	**G** V V **F** G **I** **L** I **K** R R Q Q K I	22
736	**K** G I **W** I **P** **D** G **E** N V K I P V	22
832	**G** M S **Y** L **E** **D** V **R** L V H R D L	22
861	**I** T D **F** G **L** **A** R **L** L D I D E T	22
885	**P** I K **W** M **A** **L** E **S** I L R R R F	22

Πίνακας 8.2 Δεκαπενταπεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu με ισχύ δέσμευσης για το αλλήλιο HLA-DR11 μεγαλύτερη του 22, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων SYFPEITHI. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζεται η θέση του αμινοξέος έναρξης του πεπτιδίου στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, στη δεύτερη η αλληλουχία του και στην τρίτη στήλη η σχετική ισχύς σύνδεσης με τα μόρια HLA-DR11.

HLA-DRB1*1101

Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	score
668	**G**	V	V	**F**	G	**I**	L	I	**K**	R	R	Q	Q	K	I	27
836	**L**	E	D	**V**	R	**L**	V	H	**R**	D	L	A	A	R	N	27
949	**I**	D	V	**Y**	M	**I**	M	V	**K**	C	W	M	I	D	S	26
551	**P**	R	E	**Y**	V	**N**	A	R	**H**	C	L	P	C	H	P	25
728	**S**	G	A	**F**	G	**T**	V	Y	**K**	G	I	W	I	P	D	25
80	**V**	Q	G	**Y**	V	**L**	I	A	**H**	N	Q	V	R	Q	V	24
166	**T**	I	L	**W**	K	**D**	I	F	**H**	K	N	N	Q	L	A	24
361	**I**	Q	E	**F**	A	**G**	C	K	**K**	I	F	G	S	L	A	24
422	**L**	S	V	**F**	Q	**N**	L	Q	**V**	I	R	G	R	I	L	24
479	**T**	V	P	**W**	D	**Q**	L	F	**R**	N	P	H	Q	A	L	24
607	**D**	L	S	**Y**	M	**P**	I	W	**K**	F	P	D	E	E	G	24
966	**R**	P	R	**F**	R	**E**	L	V	**S**	E	F	S	R	M	A	24
973	**V**	S	E	**F**	S	**R**	M	A	**R**	D	P	Q	R	F	V	24
6	**L**	C	R	**W**	G	**L**	L	L	**A**	L	L	P	P	G	A	23
298	**A**	C	P	**Y**	N	**Y**	L	S	**T**	D	V	G	S	C	T	23
888	**W**	M	A	**L**	E	**S**	I	L	**R**	R	R	F	T	H	Q	23
142	**L**	R	S	**L**	T	**E**	I	L	**K**	G	G	V	L	I	Q	22
178	**Q**	L	A	**L**	T	**L**	I	D	**T**	N	R	S	R	A	C	22
180	**A**	L	T	**L**	I	**D**	T	N	**R**	S	R	A	C	H	P	22
276	**T**	D	T	**F**	E	**S**	M	P	**N**	P	E	G	R	Y	T	22
397	**L**	Q	V	**F**	E	**T**	L	E	**E**	I	T	G	Y	L	Y	22
732	**G**	T	V	**Y**	K	**G**	I	W	**I**	P	D	G	E	N	V	22

8.2. Διερεύνηση των επιτόπων MHC τάξης II με βάση τη δυνατότητα σύνδεσης των πεπτιδίων που προκύπτουν από αυτά με μόρια MHC τάξης I

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε στη βιβλιογραφία ποια από τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στους πίνακες 8.1 και 8.2 και δύνανται να συνδεθούν ισχυρά με τα μόρια HLA-DR4 και HLA-DR11 έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε in vitro πρωτόκολλα, προκλινικά μοντέλα ή κλινικές μελέτες μέχρι σήμερα. Για το κάθε ένα από τα υπόλοιπα δεκαπενταπεπτίδια, χρησιμοποιώντας την ίδια βάση δεδομένων (SYFPEITHI), αναζητήθηκαν πιθανοί επίτοποι που δύνανται να συνδεθούν με αλλήλια του MHC τάξης I.

Όπως και για τα αλλήλια MHC τάξης II, τα αλλήλια τάξης I επιλέχθηκαν με βάση τη συχνότητα εντοπισμού τους στο γενικό πληθυσμό, καθώς και τη διαθεσιμότητα των HLA-τυποποιημένων αιμοδοτών του εργαστηρίου μας. Κατ' αυτό τον τρόπο, επιλέχθηκε για μελέτη το αλλήλιο HLA-A2, που συναντάται στο 29.9% των ατόμων και είναι το πιο συχνά μελετούμενο αλλήλιο MHC τάξης I, καθώς και το HLA-A26, με συχνότητα εμφάνισης 3.6% [Muller et al, 2003]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 8.3 ως 8.41.

Πίνακας 8.3 Πεπτίδιο HER-2 15_{59}

HLA-A*0201 nonamers			
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9		score
5	T **Y** L P T N A S **L**		18
1	N **L** E L T Y L P **T**		14
2	L **E** L T Y L P T **N**		12
4	L **T** Y L P T N A **S**		12
6	Y **L** P T N A S L **S**		12
3	E **L** T Y L P T N **A**		10
7	L **P** T N A S L S **F**		4
HLA-A*0201 decamers			
4	L **T** Y L P T N A **S** L		21
1	N **L** E L T Y L P **T** N		16
6	Y **L** P T N A S L **S** F		15
2	L **E** L T Y L P T **N** A		8
3	E **L** T Y L P T N **A** S		7
5	T **Y** L P T N A S **L** S		4
HLA-A*0201 octamers			
4	L **T** Y L P T N A		9
HLA-A*26 nonamers			
3	E L T Y L P T N A		12
5	T Y L P T N A S L		11
7	L P T N A S L S F		11
4	L T Y L P T N A S		9
2	L E L T Y L P T N		5
6	Y L P T N A S L S		2
1	N L E L T Y L P T		1
HLA-A*26 decamers			
4	L T Y L P T N A S L		17
3	E L T Y L P T N A S		12
6	Y L P T N A S L S F		10
1	N L E L T Y L P T N		5
5	T Y L P T N A S L S		3

Πίνακας 8.4 Πεπτίδιο HER-2 15_{70}

HLA-A*0201 nonamers			
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9		score
3	S **F** L Q D I Q E **V**		20
7	D **I** Q E V Q G Y **V**		19
1	S **L** S F L Q D I **Q**		12
4	F **L** Q D I Q E V **Q**		12
6	Q **D** I Q E V Q G **Y**		7
5	L **Q** D I Q E V Q **G**		4
2	L **S** F L Q D I Q **E**		3
HLA-A*0201 decamers			
2	L **S** F L Q D I Q **E** V		19
4	F **L** Q D I Q E V **Q** G		14
6	Q **D** I Q E V Q G **Y** V		12
1	S **L** S F L Q D I **Q** E		11
5	L **Q** D I Q E V Q **G** Y		7
3	S **F** L Q D I Q E **V** Q		4
HLA-A*26 nonamers			
6	Q D I Q E V Q G Y		18
7	D I Q E V Q G Y V		15
2	L S F L Q D I Q E		6
3	S F L Q D I Q E V		5
4	F L Q D I Q E V Q		3
1	S L S F L Q D I Q		2
5	L Q D I Q E V Q G		1
HLA-A*26 decamers			
5	L Q D I Q E V Q G Y		14
2	L S F L Q D I Q E V		8
6	Q D I Q E V Q G Y V		5
1	S L S F L Q D I Q E		3
4	F L Q D I Q E V Q G		2
3	S F L Q D I Q E V Q		1

Πίνακας 8.5 Πεπτίδιο HER-2 15_{80}

HLA-A*0201 nonamers

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
7	I **A** H N Q V R Q **V**	20
4	Y **V** L I A H N Q **V**	19
6	L **I** A H N Q V R **Q**	14
5	V **L** I A H N Q V **R**	13
2	Q **G** Y V L I A H **N**	8
1	V **Q** G Y V L I A **H**	5
3	G **Y** V L I A H N **Q**	2

HLA-A*0201 decamers

6	L **I** A H N Q V R **Q** V	26
5	V **L** I A H N Q V **R** Q	15
3	G **Y** V L I A H N **Q** V	12
4	Y **V** L I A H N Q **V** R	8
1	V **Q** G Y V L I A **H** N	6
2	Q **G** Y V L I A H **N** Q	2

HLA-A*0201 octamers

1	V **Q** G Y V L I A	9

HLA-A*26 nonamers

4	Y V L I A H N Q V	11
1	V Q G Y V L I A H	6
3	G Y V L I A H N Q	6
2	Q G Y V L I A H N	5
6	L I A H N Q V R Q	5
7	I A H N Q V R Q V	5
5	V L I A H N Q V R	4

HLA-A*26 decamers

4	Y V L I A H N Q V R	10
6	L I A H N Q V R Q V	9
3	G Y V L I A H N Q V	5
1	V Q G Y V L I A H N	4
5	V L I A H N Q V R Q	4

Πίνακας 8.6 Πεπτίδιο HER-2 15_{142}

HLA-A*0201 nonamers

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
7	I **L** K G G V L I **Q**	20
6	E **I** L K G G V L **I**	19
3	S **L** T E I L K G **G**	17
4	L **T** E I L K G G **V**	17
5	T **E** I L K G G V **L**	13
2	R **S** L T E I L K **G**	9
1	L **R** S L T E I L **K**	2

HLA-A*0201 decamers

3	S **L** T E I L K G **G** V	24
4	L **T** E I L K G G **V** L	15
5	T **E** I L K G G V **L** I	12
6	E **I** L K G G V L **I** Q	12
1	L **R** S L T E I L **K** G	9
2	R **S** L T E I L K **G** G	6

HLA-A*26 nonamers

5	T E I L K G G V L	16
6	E I L K G G V L I	15
3	S L T E I L K G G	10
4	L T E I L K G G V	10
2	R S L T E I L K G	6
7	I L K G G V L I Q	5
1	L R S L T E I L K	1

HLA-A*26 decamers

6	E I L K G G V L I Q	19
4	L T E I L K G G V L	18
1	L R S L T E I L K G	6
5	T E I L K G G V L I	6
3	S L T E I L K G G V	5
2	R S L T E I L K G G	4

Πίνακας 8.7 Πεπτίδιο HER-2 15_{166}

HLA-A*0201 nonamers

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
6	D **I** F H K N N Q **L**	20
2	I **L** W K D I F H **K**	17
1	T **I** L W K D I F **H**	11
7	I **F** H K N N Q L **A**	6
3	L **W** K D I F H K **N**	5
5	K **D** I F H K N N **Q**	3

HLA-A*0201 decamers

2	I **L** W K D I F H **K** N	16
1	T **I** L W K D I F **H** K	14
5	K **D** I F H K N N **Q** L	13
6	D **I** F H K N N Q **L** A	12
3	L **W** K D I F H K **N** N	1
4	W **K** D I F H K N **N** Q	1

HLA-A*0201 octamers

8	F **H** K N N Q L A	9

HLA-A*26 nonamers go to top

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
6	D I F H K N N Q L	26
1	T I L W K D I F H	7
2	I L W K D I F H K	4
3	L W K D I F H K N	4
5	K D I F H K N N Q	4
7	I F H K N N Q L A	1

HLA-A*26 decamers go to top

6	D I F H K N N Q L A	16
5	K D I F H K N N Q L	13
1	T I L W K D I F H K	9
2	I L W K D I F H K N	1
3	L W K D I F H K N N	1

Πίνακας 8.8 Πεπτίδιο HER-2 15_{170}

HLA-A*0201 nonamers

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
2	D **I** F H K N N Q **L**	20
6	K **N** N Q L A L T **L**	16
4	F **H** K N N Q L A **L**	12
7	N **N** Q L A L T L **I**	12
5	H **K** N N Q L A L **T**	11
3	I **F** H K N N Q L **A**	6
1	K **D** I F H K N N **Q**	3

HLA-A*0201 decamers

3	I **F** H K N N Q L **A** L	14
5	H **K** N N Q L A L **T** L	14
6	K **N** N Q L A L T **L** I	14
1	K **D** I F H K N N **Q** L	13
2	D **I** F H K N N Q **L** A	12
4	F **H** K N N Q L A **L** T	10

HLA-A*0201 octamers

4	F **H** K N N Q L A	9

HLA-A*26 nonamers

2	D I F H K N N Q L	26
4	F H K N N Q L A L	11
6	K N N Q L A L T L	11
1	K D I F H K N N Q	4
5	H K N N Q L A L T	4
7	N N Q L A L T L I	4
3	I F H K N N Q L A	1

HLA-A*26 decamers

2	D I F H K N N Q L A	16
1	K D I F H K N N Q L	13
3	I F H K N N Q L A L	10
5	H K N N Q L A L T L	10
4	F H K N N Q L A L T	4
6	K N N Q L A L T L I	4

Πίνακας 8.9 Πεπτίδιο HER-2 15_{178}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
1	Q **L** A L T L I D **T**	20
2	L **A** L T L I D T **N**	15
5	T **L** I D T N R S **R**	15
6	L **I** D T N R S R **A**	14
3	A **L** T L I D T N **R**	11
4	L **T** L I D T N R **S**	11
7	I **D** T N R S R A **C**	2
HLA-A*0201 decamers		
1	Q **L** A L T L I D **T** N	18
5	T **L** I D T N R S **R** A	17
3	A **L** T L I D T N **R** S	12
6	L **I** D T N R S R **A** C	11
4	L **T** L I D T N R **S** R	10
2	L **A** L T L I D T **N** R	8
HLA-A*0201 octamers		
7	I **D** T N R S R A	9
HLA-A*26 nonamers		
4	L T L I D T N R S	8
5	T L I D T N R S R	7
2	L A L T L I D T N	6
6	L I D T N R S R A	6
1	Q L A L T L I D T	5
3	A L T L I D T N R	3
7	I D T N R S R A C	2
HLA-A*26 decamers		
4	L T L I D T N R S R	9
5	T L I D T N R S R A	7
1	Q L A L T L I D T N	5
6	L I D T N R S R A C	5
3	A L T L I D T N R S	1

Πίνακας 8.10 Πεπτίδιο HER-2 15_{180}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
3	T **L** I D T N R S **R**	15
4	L **I** D T N R S R **A**	14
1	A **L** T L I D T N **R**	11
2	L **T** L I D T N R **S**	11
6	D **T** N R S R A C **H**	6
5	I **D** T N R S R A **C**	2
HLA-A*0201 decamers		
3	T **L** I D T N R S **R** A	17
1	A **L** T L I D T N **R** S	12
4	L **I** D T N R S R **A** C	11
2	L **T** L I D T N R **S** R	10
6	D **T** N R S R A C **H** P	4
5	I **D** T N R S R A **C** H	3
HLA-A*0201 octamers		
5	I **D** T N R S R A	9
HLA-A*26 nonamers		
6	D T N R S R A C H	16
2	L T L I D T N R S	8
3	T L I D T N R S R	7
4	L I D T N R S R A	6
1	A L T L I D T N R	3
5	I D T N R S R A C	2
7	T N R S R A C H P	2
HLA-A*26 decamers		
6	D T N R S R A C H P	16
2	L T L I D T N R S R	9
3	T L I D T N R S R A	7
4	L I D T N R S R A C	5
1	A L T L I D T N R S	1
5	I D T N R S R A C H	1

Πίνακας 8.11 Πεπτίδιο HER-2 15_{271}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
1	L **V** T Y N T D T **F**	8
4	Y **N** T D T F E S **M**	8
7	D **T** F E S M P N **P**	7
2	V **T** Y N T D T F **E**	6
3	T **Y** N T D T F E **S**	5
5	N **T** D T F E S M **P**	5
6	T **D** T F E S M P **N**	-2
HLA-A*0201 decamers		
2	V **T** Y N T D T F **E** S	8
3	T **Y** N T D T F E **S** M	7
1	L **V** T Y N T D T **F** E	4
5	N **T** D T F E S M **P** N	4
4	Y **N** T D T F E S M **P**	2
6	T **D** T F E S M P **N** P	-1
HLA-A*26 nonamers		
7	D T F E S M P N P	22
1	L V T Y N T D T F	21
5	N T D T F E S M P	10
2	V T Y N T D T F E	8
4	Y N T D T F E S M	3
6	T D T F E S M P N	2
3	T Y N T D T F E S	1
HLA-A*26 decamers		
1	L V T Y N T D T F E	11
2	V T Y N T D T F E S	8
5	N T D T F E S M P N	8
4	Y N T D T F E S M P	4
3	T Y N T D T F E S M	2
6	T D T F E S M P N P	2

Πίνακας 8.12 Πεπτίδιο HER-2 15_{276}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
6	S **M** P N P E G R **Y**	11
2	D **T** F E S M P N **P**	7
7	M **P** N P E G R Y **T**	7
4	F **E** S M P N P E **G**	5
5	E **S** M P N P E G **R**	1
1	T **D** T F E S M P **N**	-2
HLA-A*0201 decamers		
6	S **M** P N P E G R **Y** T	14
2	D **T** F E S M P N **P** E	7
3	T **F** E S M P N P **E** G	2
4	F **E** S M P N P E **G** R	2
1	T **D** T F E S M P **N** P	-1
HLA-A*26 nonamers		
2	D T F E S M P N P	22
5	E S M P N P E G R	12
6	S M P N P E G R Y	12
1	T D T F E S M P N	2
3	T F E S M P N P E	2
7	M P N P E G R Y T	2
HLA-A*26 decamers		
2	D T F E S M P N P E	22
5	E S M P N P E G R Y	22
1	T D T F E S M P N P	2
3	T F E S M P N P E G	2
6	S M P N P E G R Y T	2

Πίνακας 8.13 Πεπτίδιο HER-2 15_{286}

HLA-A*0201 nonamers		
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
4	Y **T** F G A S C V **T**	13
3	R **Y** T F G A S C **V**	10
7	G **A** S C V T A C **P**	9
5	T **F** G A S C V T **A**	8
6	F **G** A S C V T A **C**	8
2	G **R** Y T F G A S **C**	7
1	E **G** R Y T F G A **S**	-3
HLA-A*0201 decamers		
4	Y **T** F G A S C V **T** A	17
2	G **R** Y T F G A S **C** V	12
5	T **F** G A S C V T **A** C	5
6	F **G** A S C V T A **C** P	5
3	R **Y** T F G A S C **V** T	2
HLA-A*0201 octamers		
1	E **G** R Y T F G A	9
6	F **G** A S C V T A	9
HLA-A*26 nonamers		
1	E G R Y T F G A S	12
4	Y T F G A S C V T	12
6	F G A S C V T A C	6
2	G R Y T F G A S C	2
3	R Y T F G A S C V	2
5	T F G A S C V T A	2
HLA-A*26 decamers		
4	Y T F G A S C V T A	13
1	E G R Y T F G A S C	12
5	T F G A S C V T A C	6
2	G R Y T F G A S C V	1
3	R Y T F G A S C V T	1
6	F G A S C V T A C P	1

Πίνακας 8.14 Πεπτίδιο HER-2 15_{298}

HLA-A*0201 nonamers		
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
6	Y **L** S T D V G S **C**	18
1	A **C** P Y N Y L S **T**	8
2	C **P** Y N Y L S T **D**	8
3	P **Y** N Y L S T D **V**	8
7	L **S** T D V G S C **T**	6
4	Y **N** Y L S T D V **G**	5
5	N **Y** L S T D V G **S**	5
HLA-A*0201 decamers		
6	Y **L** S T D V G S **C** T	16
2	C **P** Y N Y L S T **D** V	11
5	N **Y** L S T D V G **S** C	8
1	A **C** P Y N Y L S **T** D	7
4	Y **N** Y L S T D V **G** S	6
3	P **Y** N Y L S T D **V** G	-3
HLA-A*26 nonamers		
2	C P Y N Y L S T D	6
6	Y L S T D V G S C	6
7	L S T D V G S C T	4
1	A C P Y N Y L S T	3
3	P Y N Y L S T D V	1
5	N Y L S T D V G S	1
HLA-A*26 decamers		
5	N Y L S T D V G S C	7
1	A C P Y N Y L S T D	6
6	Y L S T D V G S C T	2

Πίνακας 8.15 Πεπτίδιο HER-2 15_{311}

HLA-A*0201 nonamers		
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
2	T **L** V C P L H N **Q**	16
6	P **L** H N Q E V T **A**	15
4	V **C** P L H N Q E **V**	13
3	L **V** C P L H N Q **E**	10
7	L **H** N Q E V T A **E**	8
1	C **T** L V C P L H **N**	7
5	C **P** L H N Q E V **T**	6
HLA-A*0201 decamers		
3	L **V** C P L H N Q **E** V	20
6	P **L** H N Q E V T **A** E	12
1	C **T** L V C P L H **N** Q	11
2	T **L** V C P L H N **Q** E	11
5	C **P** L H N Q E V **T** A	10
4	V **C** P L H N Q E **V** T	5
HLA-A*0201 octamers		
7	L **H** N Q E V T A	9
HLA-A*26 nonamers		
3	L V C P L H N Q E	13
1	C T L V C P L H N	9
2	T L V C P L H N Q	9
7	L H N Q E V T A E	5
5	C P L H N Q E V T	1
6	P L H N Q E V T A	1
HLA-A*26 decamers		
1	C T L V C P L H N Q	12
3	L V C P L H N Q E V	11
2	T L V C P L H N Q E	6
6	P L H N Q E V T A E	5
5	C P L H N Q E V T A	1

Πίνακας 8.16 Πεπτίδιο HER-2 15_{350}

HLA-A*0201 nonamers		
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
4	V **R** A V T S A N **I**	13
7	V **T** S A N I Q E **F**	11
2	R **E** V R A V T S **A**	10
1	L **R** E V R A V T **S**	5
5	R **A** V T S A N I **Q**	5
6	A **V** T S A N I Q **E**	5
3	E **V** R A V T S A **N**	4
HLA-A*0201 decamers		
1	L **R** E V R A V T **S** A	11
3	E **V** R A V T S A **N** I	11
6	A **V** T S A N I Q **E** F	11
4	V **R** A V T S A N **I** Q	4
5	R **A** V T S A N I **Q** E	4
2	R **E** V R A V T S **A** N	1
HLA-A*0201 octamers		
3	E **V** R A V T S A	9
HLA-A*26 nonamers		
3	E V R A V T S A N	22
7	V T S A N I Q E F	21
6	A V T S A N I Q E	14
2	R E V R A V T S A	9
5	R A V T S A N I Q	4
1	L R E V R A V T S	1
HLA-A*26 decamers		
6	A V T S A N I Q E F	24
3	E V R A V T S A N I	20
2	R E V R A V T S A N	6
5	R A V T S A N I Q E	6
1	L R E V R A V T S A	5

Πίνακας 8.17 Πεπτίδιο HER-2 15_{361}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
2	Q	**E**	F	A	G	C	K	K	**I**	12
6	G	**C**	K	K	I	F	G	S	**L**	12
5	A	**G**	C	K	K	I	F	G	**S**	8
4	F	**A**	G	C	K	K	I	F	**G**	6
7	C	**K**	K	I	F	G	S	L	**A**	4
1	I	**Q**	E	F	A	G	C	K	**K**	2
HLA-A*0201 decamers										
5	A	**G**	C	K	K	I	F	G	**S**	L	14
4	F	**A**	G	C	K	K	I	F	**G**	S	10
1	I	**Q**	E	F	A	G	C	K	**K**	I	9
6	G	**C**	K	K	I	F	G	S	**L**	A	4
3	E	**F**	A	G	C	K	K	I	**F**	G	1
HLA-A*0201 octamers										
8	K	**K**	I	F	G	S	L	A		9
HLA-A*26 nonamers										
3	E	F	A	G	C	K	K	I	F	18
6	G	C	K	K	I	F	G	S	L	12
2	Q	E	F	A	G	C	K	K	I	5
5	A	G	C	K	K	I	F	G	S	5
1	I	Q	E	F	A	G	C	K	K	2
4	F	A	G	C	K	K	I	F	G	2
7	C	K	K	I	F	G	S	L	A	2
HLA-A*26 decamers										
2	Q	E	F	A	G	C	K	K	I	F	12
3	E	F	A	G	C	K	K	I	F	G	11
5	A	G	C	K	K	I	F	G	S	L	10
4	F	A	G	C	K	K	I	F	G	S	4
6	G	C	K	K	I	F	G	S	L	A	2
1	I	Q	E	F	A	G	C	K	K	I	1

Πίνακας 8.18 Πεπτίδιο HER-2 15_{378}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
7	D	**P**	A	S	N	T	A	P	**L**	15
3	S	**F**	D	G	D	P	A	S	**N**	8
5	D	**G**	D	P	A	S	N	T	**A**	8
4	F	**D**	G	D	P	A	S	N	**T**	7
2	E	**S**	F	D	G	D	P	A	**S**	3
6	G	**D**	P	A	S	N	T	A	**P**	2
HLA-A*0201 decamers										
6	G	**D**	P	A	S	N	T	A	**P**	L	13
4	F	**D**	G	D	P	A	S	N	**T**	A	9
3	S	**F**	D	G	D	P	A	S	**N**	T	8
2	E	**S**	F	D	G	D	P	A	**S**	N	3
5	D	**G**	D	P	A	S	N	T	**A**	P	2
1	P	**E**	S	F	D	G	D	P	**A**	S	-2
HLA-A*0201 octamers										
2	E	**S**	F	D	G	D	P	A		9
6	G	**D**	P	A	S	N	T	A		9
HLA-A*26 nonamers										
7	D	P	A	S	N	T	A	P	L	18
2	E	S	F	D	G	D	P	A	S	16
5	D	G	D	P	A	S	N	T	A	10
3	S	F	D	G	D	P	A	S	N	2
4	F	D	G	D	P	A	S	N	T	2
1	P	E	S	F	D	G	D	P	A	1
6	G	D	P	A	S	N	T	A	P	1
HLA-A*26 decamers										
2	E	S	F	D	G	D	P	A	S	N	16
5	D	G	D	P	A	S	N	T	A	P	10
6	G	D	P	A	S	N	T	A	P	L	8
3	S	F	D	G	D	P	A	S	N	T	2
4	F	D	G	D	P	A	S	N	T	A	2
1	P	E	S	F	D	G	D	P	A	S	1

Πίνακας 8.19 Πεπτίδιο HER-2 15_{408}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
4	Y	**I**	S	A	W	P	D	S	**L**	22
7	A	**W**	P	D	S	L	P	D	**L**	18
2	Y	**L**	Y	I	S	A	W	P	**D**	13
6	S	**A**	W	P	D	S	L	P	**D**	10
3	L	**Y**	I	S	A	W	P	D	**S**	5
5	I	**S**	A	W	P	D	S	L	**P**	5
1	G	**Y**	L	Y	I	S	A	W	**P**	4
HLA-A*0201 decamers										
6	S	**A**	W	P	D	S	L	P	**D**	L	24
3	L	**Y**	I	S	A	W	P	D	**S**	L	16
2	Y	**L**	Y	I	S	A	W	P	**D**	S	14
4	Y	**I**	S	A	W	P	D	S	**L**	P	10
5	I	**S**	A	W	P	D	S	L	**P**	D	5
1	G	**Y**	L	Y	I	S	A	W	**P**	D	2
HLA-A*26 nonamers										
4	Y	I	S	A	W	P	D	S	L	13
7	A	W	P	D	S	L	P	D	L	13
3	L	Y	I	S	A	W	P	D	S	5
6	S	A	W	P	D	S	L	P	D	3
1	G	Y	L	Y	I	S	A	W	P	2
5	I	S	A	W	P	D	S	L	P	1
HLA-A*26 decamers										
3	L	Y	I	S	A	W	P	D	S	L	14
6	S	A	W	P	D	S	L	P	D	L	14
4	Y	I	S	A	W	P	D	S	L	P	5
5	I	S	A	W	P	D	S	L	P	D	1

Πίνακας 8.20 Πεπτίδιο HER-2 15_{419}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
5	S	**V**	F	Q	N	L	Q	V	**I**	19
4	L	**S**	V	F	Q	N	L	Q	**V**	12
3	D	**L**	S	V	F	Q	N	L	**Q**	11
2	P	**D**	L	S	V	F	Q	N	**L**	9
1	L	**P**	D	L	S	V	F	Q	**N**	6
7	F	**Q**	N	L	Q	V	I	R	**G**	6
6	V	**F**	Q	N	L	Q	V	I	**R**	4
HLA-A*0201 decamers										
3	D	**L**	S	V	F	Q	N	L	**Q**	V	20
4	L	**S**	V	F	Q	N	L	Q	**V**	I	13
1	L	**P**	D	L	S	V	F	Q	**N**	L	12
5	S	**V**	F	Q	N	L	Q	V	**I**	R	9
6	V	**F**	Q	N	L	Q	V	I	**R**	G	5
HLA-A*26 decamers										
5	S	V	F	Q	N	L	Q	V	I	R	15
3	D	L	S	V	F	Q	N	L	Q	V	10
1	L	P	D	L	S	V	F	Q	N	L	8
4	L	S	V	F	Q	N	L	Q	V	I	8
6	V	F	Q	N	L	Q	V	I	R	G	5
2	P	D	L	S	V	F	Q	N	L	Q	1
HLA-A*26 nonamers										
5	S	V	F	Q	N	L	Q	V	I	20
2	P	D	L	S	V	F	Q	N	L	9
3	D	L	S	V	F	Q	N	L	Q	8
4	L	S	V	F	Q	N	L	Q	V	6
1	L	P	D	L	S	V	F	Q	N	5
7	F	Q	N	L	Q	V	I	R	G	5
6	V	F	Q	N	L	Q	V	I	R	1

Πίνακας 8.21 Πεπτίδιο HER-2 15_{422}

HLA-A*0201 nonamers			
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9		score
2	S **V** F Q N L Q V **I**		19
6	N **L** Q V I R G R **I**		18
1	L **S** V F Q N L Q **V**		12
7	L **Q** V I R G R I **L**		12
5	Q **N** L Q V I R G **R**		7
4	F **Q** N L Q V I R **G**		6
3	V **F** Q N L Q V I **R**		4
HLA-A*0201 decamers			
6	N **L** Q V I R G R **I** L		20
1	L **S** V F Q N L Q **V** I		13
5	Q **N** L Q V I R G **R** I		10
2	S **V** F Q N L Q V **I** R		9
4	F **Q** N L Q V I R **G** R		7
3	V **F** Q N L Q V I R G		5
HLA-A*26 nonamers			
2	S V F Q N L Q V I		20
7	L Q V I R G R I L		13
1	L S V F Q N L Q V		6
4	F Q N L Q V I R G		5
5	Q N L Q V I R G R		4
6	N L Q V I R G R I		3
3	V F Q N L Q V I R		1
HLA-A*26 decamers			
2	S V F Q N L Q V I R		15
6	N L Q V I R G R I L		9
1	L S V F Q N L Q V I		8
3	V F Q N L Q V I R G		5
4	F Q N L Q V I R G R		4
5	Q N L Q V I R G R I		1

Πίνακας 8.22 Πεπτίδιο HER-2 15_{518}

HLA-A*0201 nonamers			
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9		score
4	W **G** P G P T Q C **V**		15
1	G **H** C W G P G P **T**		7
2	H **C** W G P G P T **Q**		7
7	G **P** T Q C V N C **S**		5
3	C **W** G P G P T Q **C**		4
5	G **P** G P T Q C V **N**		3
6	P **G** P T Q C V N **C**		-1
HLA-A*0201 decamers			
3	C **W** G P G P T Q **C** V		12
5	G **P** G P T Q C V **N** C		5
1	G **H** C W G P G P **T** Q		4
2	H **C** W G P G P T **Q** C		3
4	W **G** P G P T Q C **V** N		2
6	P **G** P T Q C V N **C** S		2
HLA-A*26 nonamers			
7	G P T Q C V N C S		5
2	H C W G P G P T Q		2
3	C W G P G P T Q C		2
1	G H C W G P G P T		1
5	G P G P T Q C V N		1
HLA-A*26 decamers			
6	P G P T Q C V N C S		4
1	G H C W G P G P T Q		2
2	H C W G P G P T Q C		1
3	C W G P G P T Q C V		1
5	G P G P T Q C V N C		1

Πίνακας 8.23 Πεπτίδιο HER-2 15_{544}

HLA-A*0201 nonamers			
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9		score
6	G **L** P R E Y V N **A**		17
3	V **L** Q G L P R E **Y**		16
2	R **V** L Q G L P R **E**		13
4	L **Q** G L P R E Y **V**		13
7	L **P** R E Y V N A **R**		11
5	Q **G** L P R E Y V **N**		5
1	C **R** V L Q G L P **R**		1
HLA-A*0201 decamers			
3	V **L** Q G L P R E **Y** V		23
6	G **L** P R E Y V N **A** R		17
5	Q **G** L P R E Y V **N** A		10
2	R **V** L Q G L P R **E** Y		8
1	C **R** V L Q G L P **R** E		5
4	L **Q** G L P R E Y **V** N		3
HLA-A*0201 octamers			
7	L **P** R E Y V N A		9
HLA-A*26 nonamers			
2	R V L Q G L P R E		14
3	V L Q G L P R E Y		11
7	L P R E Y V N A R		7
1	C R V L Q G L P R		6
5	Q G L P R E Y V N		1
HLA-A*26 decamers			
2	R V L Q G L P R E Y		20
1	C R V L Q G L P R E		8
6	G L P R E Y V N A R		5
5	Q G L P R E Y V N A		1

Πίνακας 8.24 Πεπτίδιο HER-2 15_{551}

HLA-A*0201 nonamers			
Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9		score
6	N **A** R H C L P C **H**		9
3	E **Y** V N A R H C **L**		8
4	Y **V** N A R H C L **P**		7
5	V **N** A R H C L P **C**		4
7	A **R** H C L P C H **P**		3
2	R **E** Y V N A R H **C**		1
1	P **R** E Y V N A R **H**		-3
HLA-A*0201 decamers			
2	R **E** Y V N A R H **C** L		12
4	Y **V** N A R H C L **P** C		8
5	V **N** A R H C L P **C** H		8
6	N **A** R H C L P C **H** P		4
3	E **Y** V N A R H C **L** P		-3
1	P **R** E Y V N A R **H** C		-5
HLA-A*26 nonamers			
3	E Y V N A R H C L		22
4	Y V N A R H C L P		10
6	N A R H C L P C H		4
2	R E Y V N A R H C		1
5	V N A R H C L P C		1
7	A R H C L P C H P		1
HLA-A*26 decamers			
3	E Y V N A R H C L P		14
4	Y V N A R H C L P C		11
2	R E Y V N A R H C L		8
5	V N A R H C L P C H		4

Πίνακας 8.25 Πεπτίδιο HER-2 15_{574}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
4	F	**G**	P	E	A	D	Q	C	**V**	13
7	E	**A**	D	Q	C	V	A	C	**A**	11
1	V	**T**	C	F	G	P	E	A	**D**	7
2	T	**C**	F	G	P	E	A	D	**Q**	6
5	G	**P**	E	A	D	Q	C	V	**A**	4
6	P	**E**	A	D	Q	C	V	A	**C**	3
3	C	**F**	G	P	E	A	D	Q	**C**	2
HLA-A*0201 decamers										
3	C	**F**	G	P	E	A	D	Q	**C**	V	12
6	P	**E**	A	D	Q	C	V	A	**C**	A	10
4	F	**G**	P	E	A	D	Q	C	**V**	A	7
1	V	**T**	C	F	G	P	E	A	**D**	Q	6
2	T	**C**	F	G	P	E	A	D	**Q**	C	3
5	G	**P**	E	A	D	Q	C	V	**A**	C	3
HLA-A*0201 octamers										
1	V	**T**	C	F	G	P	E	A		9
6	P	**E**	A	D	Q	C	V	A		9
8	A	**D**	Q	C	V	A	C	A		9
HLA-A*26 nonamers										
7	E	A	D	Q	C	V	A	C	A	14
1	V	T	C	F	G	P	E	A	D	9
2	T	C	F	G	P	E	A	D	Q	5
3	C	F	G	P	E	A	D	Q	C	2
4	F	G	P	E	A	D	Q	C	V	2
6	P	E	A	D	Q	C	V	A	C	2
HLA-A*26 decamers										
1	V	T	C	F	G	P	E	A	D	Q	8
2	T	C	F	G	P	E	A	D	Q	C	6
6	P	E	A	D	Q	C	V	A	C	A	5
4	F	G	P	E	A	D	Q	C	V	A	2
3	C	F	G	P	E	A	D	Q	C	V	1
5	G	P	E	A	D	Q	C	V	A	C	1

Πίνακας 8.26 Πεπτίδιο HER-2 15_{613}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
2	W	**K**	F	P	D	E	E	G	**A**	8
4	F	**P**	D	E	E	G	A	C	**Q**	5
1	I	**W**	K	F	P	D	E	E	**G**	3
3	K	**F**	P	D	E	E	G	A	**C**	3
7	E	**E**	G	A	C	Q	P	C	**P**	-2
HLA-A*0201 decamers										
1	I	**W**	K	F	P	D	E	E	**G**	A	5
2	W	**K**	F	P	D	E	E	G	**A**	C	4
3	K	**F**	P	D	E	E	G	A	**C**	Q	4
4	F	**P**	D	E	E	G	A	C	**Q**	P	3
6	D	**E**	E	G	A	C	Q	P	**C**	P	1
5	P	**D**	E	E	G	A	C	Q	**P**	C	-2
HLA-A*0201 octamers										
3	K	**F**	P	D	E	E	G	A		9
HLA-A*26 nonamers										
7	E	E	G	A	C	Q	P	C	P	10
6	D	E	E	G	A	C	Q	P	C	8
2	W	K	F	P	D	E	E	G	A	5
3	K	F	P	D	E	E	G	A	C	3
4	F	P	D	E	E	G	A	C	Q	3
5	P	D	E	E	G	A	C	Q	P	3
HLA-A*26 decamers										
6	D	E	E	G	A	C	Q	P	C	P	8
2	W	K	F	P	D	E	E	G	A	C	7
4	F	P	D	E	E	G	A	C	Q	P	3
3	K	F	P	D	E	E	G	A	C	Q	2
5	P	D	E	E	G	A	C	Q	P	C	2

Πίνακας 8.27 Πεπτίδιο HER-2 15_{668}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
7	L	**I**	K	R	R	Q	Q	K	**I**	19
2	V	**V**	F	G	I	L	I	K	**R**	14
6	I	**L**	I	K	R	R	Q	Q	**K**	14
5	G	**I**	L	I	K	R	R	Q	**Q**	12
1	G	**V**	V	F	G	I	L	I	**K**	11
3	V	**F**	G	I	L	I	K	R	**R**	5
4	F	**G**	I	L	I	K	R	R	**Q**	3
HLA-A*0201 decamers										
6	I	**L**	I	K	R	R	Q	Q	**K**	I	24
2	V	**V**	F	G	I	L	I	K	**R**	R	11
5	G	**I**	L	I	K	R	R	Q	**Q**	K	11
1	G	**V**	V	F	G	I	L	I	**K**	R	10
4	F	**G**	I	L	I	K	R	R	**Q**	Q	3
3	V	**F**	G	I	L	I	K	R	**R**	Q	1
HLA-A*26 nonamers										
2	V	V	F	G	I	L	I	K	R	22
1	G	V	V	F	G	I	L	I	K	19
4	F	G	I	L	I	K	R	R	Q	6
5	G	I	L	I	K	R	R	Q	Q	6
3	V	F	G	I	L	I	K	R	R	5
6	I	L	I	K	R	R	Q	Q	K	5
7	L	I	K	R	R	Q	Q	K	I	5
HLA-A*26 decamers										
1	G	V	V	F	G	I	L	I	K	R	20
2	V	V	F	G	I	L	I	K	R	R	18
4	F	G	I	L	I	K	R	R	Q	Q	5
5	G	I	L	I	K	R	R	Q	Q	K	5
6	I	L	I	K	R	R	Q	Q	K	I	5

Πίνακας 8.28 Πεπτίδιο HER-2 15_{728}

HLA-A*0201 nonamers										
Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	score
2	G	**A**	F	G	T	V	Y	K	**G**	15
5	G	**T**	V	Y	K	G	I	W	**I**	13
6	T	**V**	Y	K	G	I	W	I	**P**	11
3	A	**F**	G	T	V	Y	K	G	**I**	10
1	S	**G**	A	F	G	T	V	Y	**K**	9
7	V	**Y**	K	G	I	W	I	P	**D**	2
4	F	**G**	T	V	Y	K	G	I	**W**	1
HLA-A*0201 decamers										
2	G	**A**	F	G	T	V	Y	K	**G**	I	16
1	S	**G**	A	F	G	T	V	Y	**K**	G	10
4	F	**G**	T	V	Y	K	G	I	**W**	I	8
5	G	**T**	V	Y	K	G	I	W	**I**	P	8
6	T	**V**	Y	K	G	I	W	I	**P**	D	5
3	A	**F**	G	T	V	Y	K	G	**I**	W	2
HLA-A*26 nonamers										
5	G	T	V	Y	K	G	I	W	I	15
6	T	V	Y	K	G	I	W	I	P	15
2	G	A	F	G	T	V	Y	K	G	9
7	V	Y	K	G	I	W	I	P	D	3
4	F	G	T	V	Y	K	G	I	W	2
1	S	G	A	F	G	T	V	Y	K	1
HLA-A*26 decamers										
5	G	T	V	Y	K	G	I	W	I	P	16
6	T	V	Y	K	G	I	W	I	P	D	12
1	S	G	A	F	G	T	V	Y	K	G	6
2	G	A	F	G	T	V	Y	K	G	I	4
4	F	G	T	V	Y	K	G	I	W	I	3
3	A	F	G	T	V	Y	K	G	I	W	1

Πίνακας 8.29 Πεπτίδιο HER-2 15_{732}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
7	I **W** I P D G E N **V**	16
1	G **T** V Y K G I W **I**	13
6	G **I** W I P D G E **N**	13
2	T **V** Y K G I W I **P**	11
4	Y **K** G I W I P D **G**	7
5	K **G** I W I P D G **E**	4
3	V **Y** K G I W I P **D**	2
HLA-A*0201 decamers		
6	G **I** W I P D G E **N** V	20
1	G **T** V Y K G I W **I** P	8
3	V **Y** K G I W I P **D** G	7
2	T **V** Y K G I W I **P** D	5
5	K **G** I W I P D G **E** N	5
4	Y **K** G I W I P D **G** E	3
HLA-A*26 nonamers		
1	G T V Y K G I W I	15
2	T V Y K G I W I P	15
5	K G I W I P D G E	6
7	I W I P D G E N V	6
6	G I W I P D G E N	5
4	Y K G I W I P D G	4
3	V Y K G I W I P D	3
HLA-A*26 decamers		
1	G T V Y K G I W I P	16
2	T V Y K G I W I P D	12
5	K G I W I P D G E N	5
6	G I W I P D G E N V	5
3	V Y K G I W I P D G	4

Πίνακας 8.230 Πεπτίδιο HER-2 15_{751}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
4	V **L** R E N T S P **K**	15
1	A **I** K V L R E N **T**	14
3	K **V** L R E N T S **P**	9
5	L **R** E N T S P K **A**	8
2	I **K** V L R E N T **S**	5
6	R **E** N T S P K A **N**	1
7	E **N** T S P K A N **K**	-1
HLA-A*0201 decamers		
4	V **L** R E N T S P **K** A	20
1	A **I** K V L R E N **T** S	12
3	K **V** L R E N T S **P** K	7
2	I **K** V L R E N T **S** P	4
6	R **E** N T S P K A **N** K	3
5	L **R** E N T S P K **A** N	1
HLA-A*0201 octamers		
6	R **E** N T S P K A	9
HLA-A*26 nonamers		
7	E N T S P K A N K	12
3	K V L R E N T S P	11
1	A I K V L R E N T	5
2	I K V L R E N T S	5
4	V L R E N T S P K	4
5	L R E N T S P K A	1
6	R E N T S P K A N	1
HLA-A*26 decamers		
3	K V L R E N T S P K	11
1	A I K V L R E N T S	5
2	I K V L R E N T S P	5
4	V L R E N T S P K A	3
5	L R E N T S P K A N	1

Πίνακας 8.31 Πεπτίδιο HER-2 15_{736}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
3	I **W** I P D G E N **V**	16
5	I **P** D G E N V K **I**	16
2	G **I** W I P D G E **N**	13
4	W **I** P D G E N V **K**	12
7	D **G** E N V K I P **V**	8
1	K **G** I W I P D G **E**	4
6	P **D** G E N V K I **P**	2
HLA-A*0201 decamers		
4	W **I** P D G E N V **K** I	21
2	G **I** W I P D G E **N** V	20
6	P **D** G E N V K I **P** V	9
3	I **W** I P D G E N **V** K	7
5	I **P** D G E N V K **I** P	7
1	K **G** I W I P D G **E** N	5
HLA-A*26 nonamers		
7	D G E N V K I P V	9
6	P D G E N V K I P	7
1	K G I W I P D G E	6
3	I W I P D G E N V	6
2	G I W I P D G E N	5
4	W I P D G E N V K	5
5	I P D G E N V K I	1
HLA-A*26 decamers		
4	W I P D G E N V K I	6
1	K G I W I P D G E N	5
2	G I W I P D G E N V	5
3	I W I P D G E N V K	5
5	I P D G E N V K I P	4
6	P D G E N V K I P V	3

Πίνακας 8.32 Πεπτίδιο HER-2 15_{861}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
1	I **T** D F G L A R **L**	23
5	G **L** A R L L D I **D**	18
4	F **G** L A R L L D **I**	16
2	T **D** F G L A R L **L**	14
7	A **R** L L D I D E **T**	14
6	L **A** R L L D I D **E**	7
HLA-A*0201 decamers		
6	L **A** R L L D I D **E** T	16
1	I **T** D F G L A R **L** L	15
5	G **L** A R L L D I **D** E	13
3	D **F** G L A R L L **D** I	12
4	F **G** L A R L L D **I** D	7
2	T **D** F G L A R L **L** D	4
HLA-A*26 nonamers		
1	I T D F G L A R L	20
2	T D F G L A R L L	14
3	D F G L A R L L D	9
4	F G L A R L L D I	5
5	G L A R L L D I D	5
7	A R L L D I D E T	4
6	L A R L L D I D E	2
HLA-A*26 decamers		
1	I T D F G L A R L L	16
3	D F G L A R L L D I	13
2	T D F G L A R L L D	6
4	F G L A R L L D I D	4
6	L A R L L D I D E T	4
5	G L A R L L D I D E	1

Πίνακας 8.33 Πεπτίδιο HER-2 15_{909}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
6	E **L** M T F G A K **P**	13
2	V **T** V W E L M T **F**	11
1	G **V** T V W E L M **T**	9
7	L **M** T F G A K P **Y**	9
3	T **V** W E L M T F **G**	8
4	V **W** E L M T F G **A**	7
5	W **E** L M T F G A **K**	3
HLA-A*0201 decamers		
3	T **V** W E L M T F **G** A	12
1	G **V** T V W E L M **T** F	10
6	E **L** M T F G A K **P** Y	7
5	W **E** L M T F G A **K** P	6
2	V **T** V W E L M T **F** G	5
4	V **W** E L M T F G **A** K	1
HLA-A*0201 octamers		
5	W **E** L M T F G A	9
HLA-A*26 nonamers		
2	V T V W E L M T F	25
3	T V W E L M T F G	14
1	G V T V W E L M T	13
6	E L M T F G A K P	12
7	L M T F G A K P Y	11
5	W E L M T F G A K	2
HLA-A*26 decamers		
1	G V T V W E L M T F	24
6	E L M T F G A K P Y	20
3	T V W E L M T F G A	13
2	V T V W E L M T F G	12
4	V W E L M T F G A K	2
5	W E L M T F G A K P	2

Πίνακας 8.34 Πεπτίδιο HER-2 15_{920}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
7	I **P** A R E I P D **L**	19
4	Y **D** G I P A R E **I**	13
2	K **P** Y D G I P A **R**	11
6	G **I** P A R E I P **D**	9
1	A **K** P Y D G I P **A**	5
5	D **G** I P A R E I **P**	3
3	P **Y** D G I P A R **E**	1
HLA-A*0201 decamers		
6	G **I** P A R E I P **D** L	24
3	P **Y** D G I P A R **E** I	9
1	A **K** P Y D G I P **A** R	7
2	K **P** Y D G I P A **R** E	5
5	D **G** I P A R E I **P** D	3
4	Y **D** G I P A R E **I** P	2
HLA-A*0201 octamers		
2	K **P** Y D G I P A	9
HLA-A*26 nonamers		
5	D G I P A R E I P	13
7	I P A R E I P D L	12
2	K P Y D G I P A R	6
6	G I P A R E I P D	5
1	A K P Y D G I P A	2
3	P Y D G I P A R E	2
HLA-A*26 decamers		
6	G I P A R E I P D L	16
5	D G I P A R E I P D	14
1	A K P Y D G I P A R	5
2	K P Y D G I P A R E	1

Πίνακας 8.35 Πεπτίδιο HER-2 15_{949}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
5	M **I** M V K C W M **I**	18
4	Y **M** I M V K C W **M**	16
6	I **M** V K C W M I **D**	10
2	D **V** Y M I M V K **C**	8
1	I **D** V Y M I M V **K**	5
3	V **Y** M I M V K C **W**	5
7	M **V** K C W M I D **S**	3
HLA-A*0201 decamers		
4	Y **M** I M V K C W **M** I	20
6	I **M** V K C W M I **D** S	10
5	M **I** M V K C W M **I** D	9
2	D **V** Y M I M V K **C** W	7
3	V **Y** M I M V K C **W** M	6
1	I **D** V Y M I M V **K** C	5
HLA-A*26 nonamers		
2	D V Y M I M V K C	21
7	M V K C W M I D S	11
1	I D V Y M I M V K	8
5	M I M V K C W M I	6
3	V Y M I M V K C W	4
4	Y M I M V K C W M	4
6	I M V K C W M I D	4
HLA-A*26 decamers		
2	D V Y M I M V K C W	22
1	I D V Y M I M V K C	5
4	Y M I M V K C W M I	5
6	I M V K C W M I D S	5
5	M I M V K C W M I D	4

Πίνακας 8.36 Πεπτίδιο HER-2 15_{966}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
7	L **V** S E F S R M **A**	13
6	E **L** V S E F S R **M**	11
3	R **F** R E L V S E **F**	9
2	P **R** F R E L V S **E**	6
5	R **E** L V S E F S **R**	4
HLA-A*0201 decamers		
6	E **L** V S E F S R **M** A	11
1	R **P** R F R E L V **S** E	7
5	R **E** L V S E F S **R** M	6
2	P **R** F R E L V S **E** F	4
3	R **F** R E L V S E **F** S	2
4	F **R** E L V S E F **S** R	2
HLA-A*0201 octamers		
8	V **S** E F S R M A	9
HLA-A*26 nonamers		
3	R F R E L V S E F	16
6	E L V S E F S R M	16
7	L V S E F S R M A	13
2	P R F R E L V S E	9
1	R P R F R E L V S	1
5	R E L V S E F S R	1
HLA-A*26 decamers		
2	P R F R E L V S E F	17
6	E L V S E F S R M A	16
1	R P R F R E L V S E	5
3	R F R E L V S E F S	2
4	F R E L V S E F S R	1
5	R E L V S E F S R M	1

Πίνακας 8.37 Πεπτίδιο HER-2 15_{1028}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
5	T **Y** L P T N A S **L**	18
1	N **L** E L T Y L P **T**	14
2	L **E** L T Y L P T **N**	12
4	L **T** Y L P T N A **S**	12
6	Y **L** P T N A S L **S**	12
3	E **L** T Y L P T N **A**	10
7	L **P** T N A S L S **F**	4
HLA-A*0201 decamers		
4	L **T** Y L P T N A **S** L	21
1	N **L** E L T Y L P **T** N	16
6	Y **L** P T N A S L **S** F	15
2	L **E** L T Y L P T **N** A	8
3	E **L** T Y L P T N **A** S	7
5	T **Y** L P T N A S **L** S	4
HLA-A*0201 octamers		
4	L **T** Y L P T N A	9
HLA-A*26 nonamers		
3	E L T Y L P T N A	12
5	T Y L P T N A S L	11
7	L P T N A S L S F	11
4	L T Y L P T N A S	9
2	L E L T Y L P T N	5
6	Y L P T N A S L S	2
1	N L E L T Y L P T	1
HLA-A*26 decamers		
4	L T Y L P T N A S L	17
3	E L T Y L P T N A S	12
6	Y L P T N A S L S F	10
1	N L E L T Y L P T N	5
5	T Y L P T N A S L S	3

Πίνακας 8.38 Πεπτίδιο HER-2 15_{1109}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
7	D **P** A P G A G G **M**	10
4	F **C** P D P A P G **A**	9
2	G **F** F C P D P A **P**	5
3	F **F** C P D P A P **G**	5
1	Q **G** F F C P D P **A**	4
5	C **P** D P A P G A **G**	3
6	P **D** P A P G A G **G**	1
HLA-A*0201 decamers		
3	F **F** C P D P A P **G** A	9
5	C **P** D P A P G A **G** G	5
2	G **F** F C P D P A **P** G	4
4	F **C** P D P A P G **A** G	3
1	Q **G** F F C P D P **A** P	2
6	P **D** P A P G A G **G** M	2
HLA-A*0201 octamers		
2	G **F** F C P D P A	9
5	C **P** D P A P G A	9
HLA-A*26 nonamers		
7	D P A P G A G G M	10
2	G F F C P D P A P	5
1	Q G F F C P D P A	4
5	C P D P A P G A G	3
3	F F C P D P A P G	1
4	F C P D P A P G A	1
6	P D P A P G A G G	1
HLA-A*26 decamers		
1	Q G F F C P D P A P	5
2	G F F C P D P A P G	4
4	F C P D P A P G A G	3
5	C P D P A P G A G G	2
3	F F C P D P A P G A	1
6	P D P A P G A G G M	1

Πίνακας 8.39 Πεπτίδιο HER-2 15_{1214}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
6	N **L** Y Y W D Q D **P**	10
2	P **A** F D N L Y Y **W**	8
1	S **P** A F D N L Y **Y**	4
3	A **F** D N L Y Y W **D**	4
4	F **D** N L Y Y W D **Q**	3
7	L **Y** Y W D Q D P **P**	3
5	D **N** L Y Y W D Q **D**	1
HLA-A*0201 decamers		
6	N **L** Y Y W D Q D **P** P	10
1	S **P** A F D N L Y **Y** W	8
2	P **A** F D N L Y Y **W** D	4
3	A **F** D N L Y Y W **D** Q	2
4	F **D** N L Y Y W D **Q** D	2
HLA-A*26 nonamers		
1	S P A F D N L Y Y	12
2	P A F D N L Y Y W	10
5	D N L Y Y W D Q D	9
3	A F D N L Y Y W D	1
HLA-A*26 decamers		
5	D N L Y Y W D Q D P	8
1	S P A F D N L Y Y W	5
2	P A F D N L Y Y W D	5
4	F D N L Y Y W D Q D	1

Πίνακας 8.40 Πεπτίδιο HER-2 15_{1234}

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9	score
HLA-A*0201 nonamers		
2	S **T** F K G T P T **A**	18
4	F **K** G T P T A E **N**	8
6	G **T** P T A E N P **E**	6
3	T **F** K G T P T A **E**	2
5	K **G** T P T A E N **P**	2
7	T **P** T A E N P E **Y**	2
HLA-A*0201 decamers		
2	S **T** F K G T P T **A** E	8
6	G **T** P T A E N P **E** Y	8
3	T **F** K G T P T A **E** N	5
5	K **G** T P T A E N **P** E	3
1	P **S** T F K G T P **T** A	2
4	F **K** G T P T A E **N** P	1
HLA-A*0201 octamers		
3	T **F** K G T P T A	9
HLA-A*26 nonamers		
2	S T F K G T P T A	14
7	T P T A E N P E Y	12
6	G T P T A E N P E	8
1	P S T F K G T P T	3
3	T F K G T P T A E	2
5	K G T P T A E N P	2
HLA-A*26 decamers		
6	G T P T A E N P E Y	18
2	S T F K G T P T A E	14
1	P S T F K G T P T A	2
5	K G T P T A E N P E	2
3	T F K G T P T A E N	1

8.3. Αναζήτηση των σημείων κατάτμησης της πρωτεΐνης HER-2/neu από τα πρωτεασώματα

Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SYFPEITHI αφορούν σε υποθετικά πεπτίδια, που προκύπτουν από όλες τις αλληλουχίες 8, 9 και 10 αμινοξέων κάθε δεκαπενταπεπτιδίου που τέθηκε υπό ανάλυση. Για να αξιολογηθούν τα πεπτίδια αυτά πρέπει να είναι γνωστά τα σημεία στα οποία δύναται το πρωτεόσωμα τα κόψει την πρωτεϊνική αλληλουχία, ώστε να προκύψουν πεπτίδια (οκταπεπτίδια, εννιαπεπτίδια και δεκαπεπτίδια) που θα ενωθούν με τα αντίστοιχα μόρια MHC. Για το λόγο αυτό, μέσω του αλγόριθμου PAProC της ίδιας βάσης δεδομένων αναζητήθηκαν τα τμήματα της πρωτεΐνης που προκύπτουν από τη φυσική κατάτμησή της από τα πρωτεασώματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 8.42 έως 8.44.

Πίνακας 8.42 Τα 316 σημεία κατάτμησης της πρωτεΐνης HER-2/neu από το ανθρώπινο πρωτεόσωμα τύπου I (human proteasome type I), όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων PAProC

1	MELAALCRWGLLLALLPPGA
21	AST | QV | CTGTDMK | L | R | LPASP | E
41	T | HLDM | L | RHL | YQ | GC | QVV | QGNL
61	EL | T | Y | LPTNA | SLSF | LQ | DIQEV |
81	QG | Y | V | L | I | A | HNQV | RQV | P | LQ | R | LR
101	IV | RGTQL | FED | NYALA | V | LD | NG
121	DPLN | N | TTPVT | GA | SPGGL | R | EL
141	QL | RSL | TEILK | GGVLIQ | R | NPQ
161	L | C | Y | QDTILW | KDI | FH | KNN | QL | A
181	L | TL | IDTNRSRACHPCSPMCK
201	GSRCWGESSEDCQSL | TRTVC
221	AGGCARCKGPLPTDCCHEQC
241	AAGCTGPKHS | DC | L | ACLHFNH
261	SGI | CELHCPALVTY | N | TD | TFE |
281	S | M | PNP | EGR | YTFGA | SC | VTACP
301	YN | YLSTD | VGSCTLVCPLHNQ
321	EVT | AEDG | TQR | CEKCSKPCAR
341	VCYGLGMEHL | R | EV | RAVTSA | N
361	IQEF | AGC | KKI | FGSLAF | LPES
381	FDGDPAS | N | T | APLQ | P | EQL | QVF
401	E | TLE | EI | TGY | L | Y | ISAWPDSL | P |
421	DLSVFQNLQVI | RGR | ILHNGA |
441	YS | L | TL | QGLGIS | W | LGLRSL | RE
461	LGSGL | ALIHHN | THL | C | F | VHTV
481	P | WDQLFR | NP | HQA | L | LHT | A | NR | P
501	ED | ECVGEGLACHQLCARGHC
521	WGPGPTQ | C | V | NCSQFLRGQ | EC
541	V | EECRVLQGLPREYV | NA | R | HC |
561	L | PCHPECQPQNGS | VT | C | FGPE
581	ADQC | V | ACAHYKDP | PFC | V | ARC
601	PSGVKP | DLSYM | PIW | KFP | D | E | E
621	GACQ | PCPINCTHSCVDLDDK
641	GCPAEQRASPL | TSI | ISA | VVG
661	I | LLVVVLGVVFGI | LI | K | RRQQ
681	KIRKY | TMR | RLLQE | TELV | E | PL |
701	TPSG | A | M | PNQ | A | QM | RIL | KETEL |
721	RKVKVLGSGAFG | T | V | Y | K | GIWI
741	P | DG | ENV | KIPVA | IKV | L | RENTS
761	PKA | NKEI | LD | E | AYV | M | AGVG | SP
781	YV | SR | LLGI | CL | TSTVQLVTQL |
801	M | PYG | C | LLDHVRENR | GRLGSQ |
821	DLLNW | CMQIAKGMSY | L | EDV | R
841	LVHRDLAA | RNV | LVKSPNH | VK
861	I | T | DF | GLAR | LLDIDETEYH | AD
881	GGKV | P | IKWMALE | SIL | R | RRFT
901	HQS | D | VW | SY | GVTVW | EL | MTFG | A |
921	KPYD | GIPAR | EIP | DLLEKGER |
941	LPQP | PICT | IDVYMIMV | K | CW | M
961	IDSE | CRPRFRELVSEF | SRMA |
981	RDPQRFVVIQN | EDLGPASP | L
1001	DSTF | Y | RSL | LEDDDMGDLVDA
1021	E | EY | LV | P | QQ | G | FFCP | DPAPGAG
1041	GMVHH | R | HRSS | ST | RSGGGDL | T
1061	LGLEPSE | E | E | APRSP | LAPSEG
1081	AGSD | VF | DGDLGMGAA | K | GL | Q | S |
1101	L | PTHDPSP | LQ | R | YSED | PTV | P | L
1121	PSE | TDGY | V | AP | L | TCSPQPEYV |
1141	N | Q | P | DV | R | PQP | PSP | R | EGPLPAA |
1161	RPAGA | TLE | R | PKTL | SPGKNGV
1181	VK | D | VF | AF | GG | AV | E | NP | EYL | TPQ
1201	GGAAP | Q | P | HPPP | AF | S | P | AF | D | NL |
1221	YYW | DQ | DPPER | GAPPST | F | K | G | T
1241	PTAE | NP | EYLGLDVPV

Πίνακας 8.43 Τα 334 σημεία κατάτμησης της πρωτεΐνης HER-2/neu από το ανθρώπινο πρωτεόσωμα τύπου II (human proteasome type II), όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων PAProC

1	MELAALCRWGLLLALLP | PGA
21	A | S | TQV | CT | GTDMK | LR | L | PAS | PE |
41	T | HLDM | L | RHL | YQGCQVV | QGNL
61	EL | TY | L | PTNASLS | F | L | QD | IQEV |
81	Q | G | YVLI | AHN | QVRQVPLQR | L | R
101	IVRG | TQL | FEDNYALA | V | L | DNG
121	DPLNNTTPVT | G | A | S | PGGL | REL |
141	QL | RSLTEIL | K | G | GVLIQRNPQ
161	LCYQDTILW | K | D | IFH | KN | N | QLA
181	L | TLIDTNRSRACHPCSPMCK
201	GS | RCWGE | SSEDCQSLTRTVC
221	A | GGCARCKGPLPTDC | CHEQC
241	AAGCTGPKHS | DC | LACLHFNH
261	SGI | CELHCPALVTY | NT | DTFE |
281	S | M | PNP | EG | R | YTFG | A | S | CVTACP
301	YNYLST | DVGS | CT | LVCPLHNQ
321	EVTAEDG | TQR | CEKCSKPCAR
341	VCYGLGMEHL | R | EVRAVTSA | N
361	IQEF | AG | C | KKIFGSLAFL | PE | S |
381	FDGDPASNT | APL | QP | EQL | QVF |
401	E | TL | E | EITG | Y | L | YI | SAW | PDSL | P
421	DL | SVF | Q | NL | QVI | RG | R | ILHNGA |
441	YSL | TL | QGLGISWLGLRSL | RE
461	LGS | GL | ALI | HHNT | HLC | F | VHTV
481	PWDQL | FRNP | HQA | LLHTA | NRP
501	EDECVGEGLA | CH | QLCARGHC
521	WGPGPTQC | V | NC | SQFLRGQ | EC
541	V | EECRVL | QGLPREYVNA | R | HC |
561	LPCHPECQPQNGSVT | C | FGPE
581	ADQCV | ACAHYKDP | PFCV | A | RC
601	PSGVKPDLSYM | PIW | KF | PDE | E
621	GA | C | Q | PCPINCTHSCVDLDDK
641	G | CPAE | QRA | S | PLT | SIISA | VVG |
661	I | LLVVV | L | GVVF | G | ILI | K | RRQQ
681	KIRKYTMRR | LL | QE | TELV | E | PL
701	TPSG | AM | PNQ | A | QM | RIL | KE | TEL |
721	RKVKV | L | GS | GAFGT | V | Y | K | GI | WI
741	PDGE | NV | KIPVAI | KV | L | RENTS
761	PKA | NK | EILD | E | A | YV | M | A | GVG | S | P
781	YV | SR | LLGI | CLTSTVQLVTQL
801	M | PYG | C | LLDHVRENRGR | LGSQ
821	DLLNW | CMQIAKGM | SY | L | EDVR |
841	LVHRDLAA | RNV | LVKS | PNHVK
861	I | T | DF | GLA | R | LLDI | DE | TEYHAD
881	G | GKVP | IKWM | ALE | S | IL | RRRFT
901	HQ | S | DVW | SYGVTV | W | ELMTFG | A |
921	K | PYDGIPAR | EIPDLL | EK | GER |
941	L | PQP | PICT | I | DVYMIMV | KC | W | M
961	IDSE | CRPRFRELVSEF | S | RM | A |
981	RDP | QRFVVI | QNEDLG | PAS | PL
1001	DSTFY | R | SLLEDDDMGDLV | D | A
1021	E | EY | LVP | QQG | F | FCP | DPAPGA | G |
1041	G | MVHH | R | H | RSSSTRSGGGDL | T
1061	LGL | EPSE | E | E | APRS | P | LAPSEG |
1081	AGS | D | VF | DGDLGMGAA | K | GL | Q | S
1101	L | PTHDPSPLQR | YSEDPTVP | L |
1121	PSE | T | DG | Y | V | AP | LTC | S | PQPEY | V |
1141	N | Q | PDVRPQPPSPREG | PLPAA |
1161	RPAGATL | E | RPKTL | S | P | GKNG | V
1181	VK | D | VF | AFG | G | A | V | E | NPEY | L | TPQ
1201	GGAAP | QP | HP | PPAF | S | P | AF | DN | L |
1221	YYWDQ | DPPER | G | A | PPSTF | K | G | T |
1241	PTAE | NP | EY | LGL | DVPV

Πίνακας 8.44 Τα 372 σημεία κατάτμησης της πρωτεΐνης HER-2/neu από το ανθρώπινο πρωτεόσωμα τύπου III (human proteasome type III), όπως προκύπτουν από τη βάση δεδομένων PAProC

1	MELAALCRWGLLLALLP | PGA
21	A | STQV | CTGTDMK | LR | L | PAS | P | E |
41	T | HL | D | ML | RHL | YQ | G | CQVVQGNL
61	EL | TY | L | PTNA | SL | S | F | L | Q | D | IQEV |
81	QG | YVLI | AHN | QV | RQVPLQR | L | R |
101	IV | RGTQL | FEDNYALAVL | DNG
121	DPLNNTTPVT | GA | S | P | GG | L | REL |
141	QL | RSL | TEILKG | GVLIQRNPQ
161	L | CYQDTILW | KD | I | FH | KN | N | QLA
181	L | TLI | DTNRSRACHPCSPMCK
201	GSRCWGE | SSEDCQ | SLTRTV | C
221	AGGCARCKGPLPTDC | C | HEQC
241	AAGCTGPKHS | DC | L | ACLHFNH
261	SGI | CELHCPALVTYNT | DTF | E |
281	S | M | PNP | EG | R | YT | FGA | S | CVTACP
301	YNYLST | D | VGS | CT | LVCPLHNQ
321	E | VTAEDGTQR | CE | KC | SKPCAR
341	VCYGLGME | HL | REV | RAVTSA | N
361	I | QEF | AG | C | KKIFGSLAF | L | PE | S |
381	F | DGDPASNT | APLQ | P | EQL | QVF
401	E | TL | E | EITG | Y | L | YISAW | PDSL | P
421	DLSVF | QNL | QVIRGR | ILHNGA |
441	YSL | TL | QG | LGISW | LG | L | RSL | RE
461	LGSGL | ALI | HHNT | HLC | F | VHTV
481	PWDQL | FR | NP | HQA | LLHT | A | NRP
501	EDECVGEGLA | CH | QLCARGHC
521	WGPGPTQC | V | NCSQFLRGQ | EC
541	V | EECRVL | QGLPREY | V | NA | R | HC |
561	L | PCHPECQPQNGS | VT | C | FGPE
581	ADQC | V | ACAHYKDP | PFCV | A | RC
601	PSGVKPDLSY | M | PIW | KF | PDE | E
621	GA | CQ | PCPINCTHSCVDLDDK
641	G | CPAEQRAS | PL | T | SIISA | VVG
661	I | LLVVVLGVVF | GILI | KRR | QQ
681	KIRKY | TMR | RL | L | QE | TELV | E | PL
701	TP | SG | AM | PNQ | A | QM | RIL | KE | TEL |
721	R | KV | KVL | GS | GAFGT | VY | K | GI | WI
741	PDGE | NV | KIPVAIKVL | RE | NTS
761	PKA | NK | EILD | E | A | YV | M | AGV | GS | P
781	YV | SR | LL | GI | CL | TSTVQLVTQL |
801	MPYG | C | L | LDHVRENRGR | LGSQ
821	DLLNW | CM | QIAKGM | SY | L | ED | V | R |
841	LVHRDLAA | RNV | LVKS | PNHVK
861	I | T | DF | G | LA | R | LL | D | IDE | TEYHAD
881	GGKVPIKWM | A | LE | SI | L | RRRFT
901	HQ | S | DVW | SY | GVTV | W | EL | MTFG | A |
921	K | PYDGIPAR | EI | PDLL | E | K | GER |
941	L | PQP | PICT | I | DVYMI | MV | KC | W | M
961	I | DSE | C | RPRFRELVSEF | S | R | M | A |
981	RDPQR | FV | VI | QN | EDLG | PAS | PL
1001	D | STFY | R | SLLED | DDMGDLV | D | A
1021	E | EY | LVP | QQ | G | FFCP | DPAPGA | G |
1041	G | MVHH | R | H | RSS | ST | RSG | GGDL | T
1061	LGL | EPSE | E | E | APRS | P | LAPSEG |
1081	AGS | DVF | DGDLGMGAA | K | G | L | Q | S |
1101	L | PTHDPSPL | QR | YSEDPTVPL
1121	PSE | T | DG | Y | V | APL | TC | S | PQPEY | V |
1141	N | Q | PDVRPQP | PSPREG | PLPAA |
1161	RPAGATL | E | R | PKTL | S | P | GKNG | V
1181	VKD | VF | AF | G | G | A | V | E | NP | EY | L | T | PQ
1201	G | GAAP | QP | HP | PPAF | S | P | AF | DNL |
1221	YYWDQDPPER | GA | PPSTF | K | G | T |
1241	PTAE | NP | EY | LG | L | DVPV

8.4. Πεπτίδια με δυνατότητα ισχυρής σύνδεσης με τα αλλήλια HLA-DR4, HLA-DR11, HLA-A2 και HLA-A26

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των δύο αλγορίθμων, προκύπτει η ισχύς σύνδεσης των φυσιολογικά προκυπτόντων πεπτιδίων από τους μηχανισμούς παραγωγής και παρουσίασης αντιγόνων του κυττάρου. Για παράδειγμα, για το πεπτίδιο HER 15_{544} αρχικά φαίνεται ότι η ισχύς σύνδεσης των προκυπτόντων πεπτιδίων που μπορούν να δεσμευτούν με τα αλλήλια HLA-A2 και HLA-A26 είναι 22 και 20, αντίστοιχα. Τα πεπτίδια όμως για τα οποία λαμβάνονται αυτές οι τιμές δεν προκύπτουν φυσιολογικά από την κατάτμηση της πρωτεΐνης μέσω του πρωτεασώματος. Αν ληφθούν υπόψη τα πιθανά σημεία τμήσης του δεκαπενταπεπτιδίου, διαπιστώνεται ότι η ισχύς σύνδεσης των φυσιολογικά προκυπτόντων πεπτιδίων στα μελετούμενα αλλήλια του MHC τάξης Ι είναι 10 και 1 αντίστοιχα.

Με την εφαρμογή αυτού του τρόπου αναζήτησης για όλα τα δεκαπενταπεπτίδια που παρουσιάζονται στους πίνακες 8.1 και 8.2 και δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε δημοσιευμένες εργασίες, επιλέχθηκαν σε δύο δεκαπενταπεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu που περιέχουν επιτόπους με υψηλή ισχύ σύνδεσης σε μόρια MHC, τόσο τάξης Ι όσο και τάξης ΙΙ. Πρόκειται για τα:

HER-2 15_{80} με αλληλουχία VQGYVLIAHNQVRQV

HER-2 15_{166} με αλληλουχία TILWKDIFHKNNQLA

Η ισχύς σύνδεσής τους με τα αλλήλια HLA-DR4 και HLA-DR11 είναι 28 και 24 αντίστοιχα και για τα δύο πεπτίδια. Όσον αφορά στα μόρια MHC τάξης Ι, η ισχύς σύνδεσης για το HLA-A2 είναι 26 και 20 αντίστοιχα για το HER-2 15_{80} και το HER-2 15_{166} και 11 και 26 για το HLA-A26.

8.5. Έλεγχος ομολογίας των πεπτιδίων HER-2 15_{80} και HER-2 15_{166} με τμήματα πρωτεϊνών παθογόνων παραγόντων

Για τα πεπτίδια που επιλέχθηκαν με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, διερευνήθηκε αν απαντούν σε βακτηριακές ή ιϊκές συχνά απαντούμενες πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, τα επιλεχθέντα πεπτίδια αναλύθηκαν στον αλγόριθμο της βάσης δεδομένων BLAST, η οποία παρέχει την πληροφορία αν η αμινοξική αλληλουχία που τίθεται υπό έλεγχο απαντά στις πρωτεΐνες που υπάρχουν καταχωρημένες στη βάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες (8.45-8.46).

Πίνακας 8.45 Γνωστές πρωτεΐνες στις οποίες απαντάται η αλληλουχία VQGYVLIAHNQVRQV του πεπτιδίου HER-2 15_{80}

Sequences with E-value WORSE than threshold

NEW gi|4758298|ref|NP_004439.1| v-erb-b2 erythroblastic leukemia vir... 38 0.042 L

NEW gi|28948774|pdb|1N8Z|C Chain C, Crystal Structure Of Extracellul... 38 0.042 S

NEW gi|10181233|gb|AAD56009.2| herstatin [Homo sapiens] 38 0.042 L

NEW gi|27658000|gb|AAO18082.1| v-erb-b2 erythroblastic leukemia vira... 38 0.042

NEW gi|119533|sp|P04626|ERB2_HUMAN Receptor protein-tyrosine kinase ... 38 0.042 L

NEW gi|2575867|dbj|BAA23127.1| erbB-2 [Canis familiaris] 37 0.065

NEW gi|553332|gb|AAA58637.1| HER-2/neu 37 0.089

NEW gi|3913591|sp|Q60553|ERB2_MESAU Receptor protein-tyrosine kinase... 33 0.95

NEW gi|38197688|gb|AAH61863.1| V-erb-b2 erythroblastic leukemia vira... 32 3.6 L

NEW gi|3915663|sp|P06494|ERB2_RAT Receptor protein-tyrosine kinase e... 32 3.6

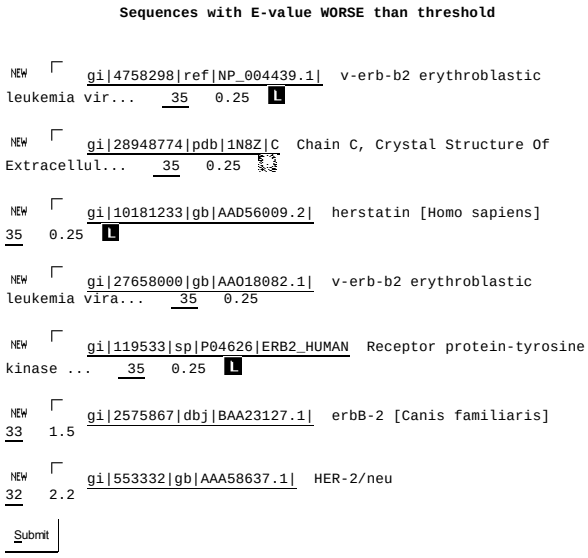
NEW gi|8393325|ref|NP_058699.1| v-erb-b2 erythroblastic leukemia vir... 32 3.6 L

NEW gi|28948771|pdb|1N8Y|C Chain C, Crystal Structure Of The Extrace... 32 3.6 S

NEW gi|22651765|gb|AAM50093.1| neu protooncoprotein [Rattus norvegicus] 32 3.6 L

Submit

Πίνακας 8.46 Γνωστές πρωτεΐνες στις οποίες απαντάται η αλληλουχία TILWKDIFHKNNQLA του πεπτιδίου HER-2 15_{166}



Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 8.45 και 8.46, προκύπτει ότι τα πεπτίδια που επιλέχθηκαν δεν αντιστοιχούν σε γνωστές βακτηριακές ή ιϊκές πρωτεΐνες.

9. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ HER-2 (80-94) ΚΑΙ HER-2 (166-180) ΤΗΣ ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HER-2/neu ΑΠΟ $CD4^+$ ΚΑΙ $CD8^+$ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

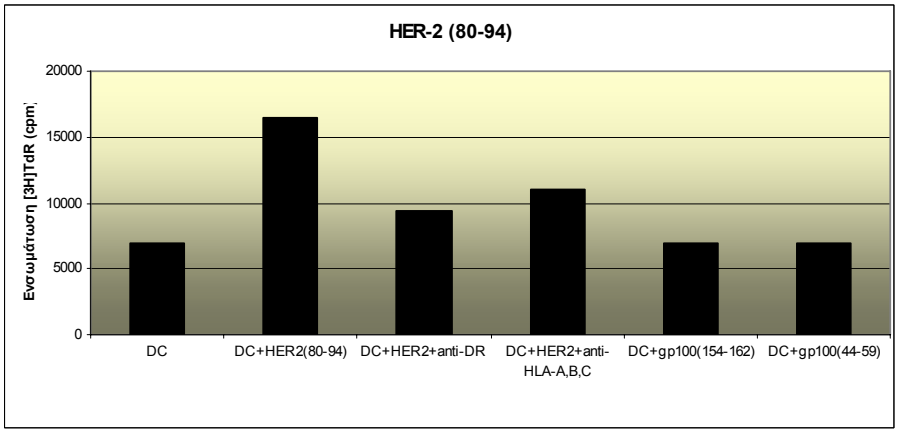
9.1. Δημιουργία Τ λεμφοκυτταρικών σειρών ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180)

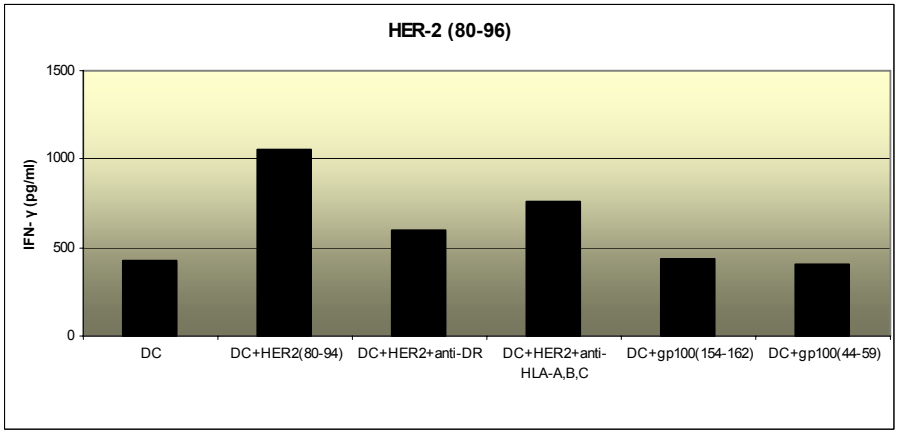
Για τη δημιουργία Τ λεμφοκυτταρικών σειρών ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180), χρησιμοποιήθηκαν PBMC υγιών δοτών με τυποποίηση HLA αντιγόνων αντίστοιχα για το HER-2 (80-94) HLA-A2, -A32, -B35, -B51, -DR11, -DQ7, -DR52 και για το HER-2 (166-180) HLA-A26, -A11, -B51, -B18, -DR4, -DR11, -DQ7, -DR52, -DR53. Μέρος των PBMC χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή DC, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι». Την έβδομη ημέρα προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας TNF-α, ταυτόχρονα με το αντίστοιχο πεπτίδιο σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Αυτή η διαφοροποίηση σε σχέση με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε στην ενότητα 7, οφείλεται στο γεγονός ότι δεν είναι επιθυμητή μόνο η δέσμευση των πεπτιδίων στα επιφανειακά μόρια MHC των DC, αλλά και η ενδοκύττωσή και εισαγωγή τους στην οδό επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνων, διαδικασία που δεν μπορεί να γίνει μετά την ωρίμανση των DC. Τα ώριμα DC που παρήχθησαν με αυτό τον τρόπο ελέγχθηκαν για την έκφραση των επιφανειακών μορίων CD40, CD80, CD83, CD86 και HLA-DR και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση PBMC του ίδιου δότη σε αναλογία 10 PBMC: 1 DC σε μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα, τοποθετώντας 100.000 κύτταρα ανά θέση μικροπλάκας, σε 200 μl βασικού θρεπτικού υλικού ανά θέση. Την τρίτη ημέρα από την ενεργοποίηση αφαιρέθηκαν 100 μl υπερκειμένου από κάθε θέση μικροπλάκας και προστέθηκε ίσος όγκος βασικού θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 40 IU/ml IL-2.

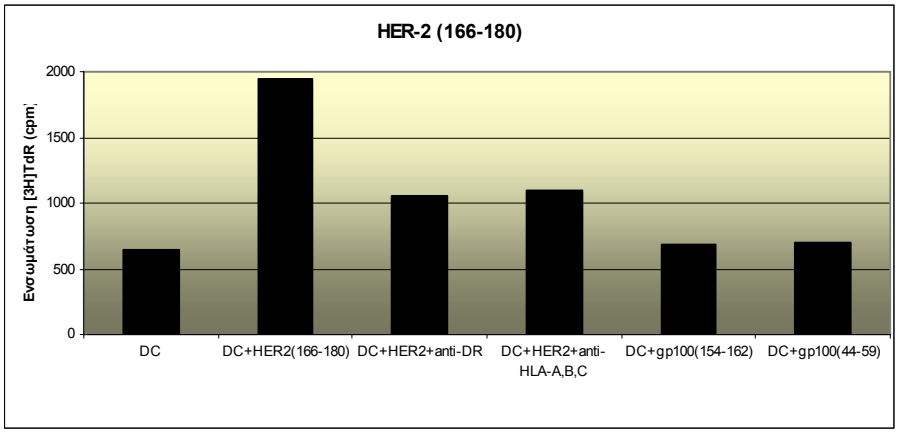
Ακολούθησαν 3 επαναληπτικές ενεργοποιήσεις με υποδιπλασιαζόμενη συγκέντρωση πεπτιδίου, δηλαδή 25 μg/ml, 12 μg/ml και 6 μg/ml, σε χρονικά διαστήματα 7-10 ημερών μεταξύ των ενεργοποιήσεων. Η επιλογή του χρόνου για την επανενεργοποίηση των κυττάρων εξαρτήθηκε από την κατάσταση διέγερσης αυτών, όπως αναλύεται στην ενότητα 7.1. Την τρίτη ημέρα από κάθε ενεργοποίηση αφαιρέθηκαν 100 μl υπερκειμένου από κάθε θέση μικροπλάκας και προστέθηκε ίσος όγκος βασικού θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 40 IU/ml IL-2.

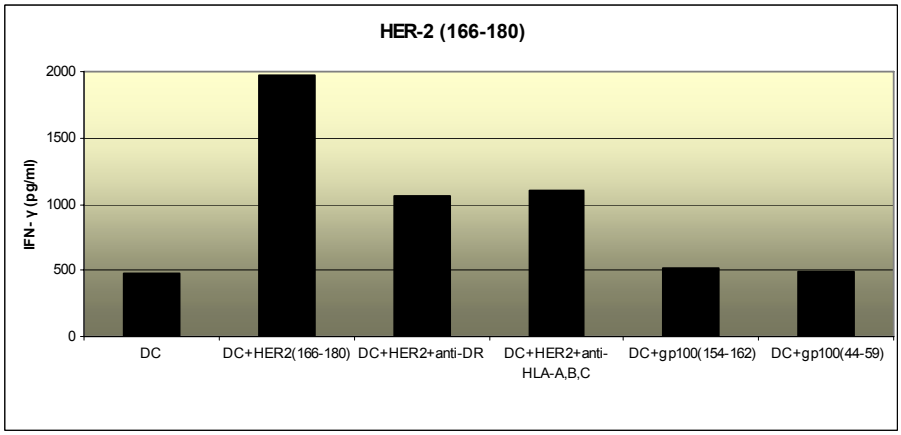
Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που προαναφέρθηκε, μετά από 4 ενεργοποιήσεις προέκυψαν καλλιέργειες Τ κυττάρων, η οποίες, σε απάντηση σε αυτόλογα DC «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο, πολλαπλασιάζονταν με σχετικά έντονο ρυθμό [SI 2.3 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 3.1 για το HER-2 (166-180)]. Επιπρόσθετα, οι απαντήσεις αυτές αναστέλλονταν μερικά από την προσθήκη στην καλλιέργεια μονοκλωνικού αντισώματος ενάντια στα μόρια HLA-DR [52% για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 46% για το HER-2 (166-180)] ή ενάντια στα μόρια HLA-A, -B, -C [37% για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 44% για το HER-2 (166-180)]. Η παρατήρηση ότι η προσθήκη αντι-HLA-DR μονοκλωνικού αντισώματος αναστέλλει μόνο μερικά την απάντηση στο πεπτίδιο, όπως επίσης ότι το ίδιο συμβαίνει και με την προσθήκη αντι-HLA-A, -B, -C μονοκλωνικού αντισώματος, εξηγείται από γεγονός ότι τα πεπτίδια που αναγνωρίζονται από $CD4^+$ Τ κύτταρα εμπεριέχουν και επιτόπους που αναγνωρίζονται από $CD8^+$ Τ κύτταρα και οι οποίοι δύνανται να προκύψουν από την κατάτμηση του αρχικού δεκαπενταπεπτιδίου από το πρωτεόσωμα. Με την επώαση συνεπώς των DC με τα δεκαπενταπεπτίδια κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους, στην επιφάνειά τους δεν υπάρχουν μόνο τα πεπτίδια αυτά, αλλά και οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα $CD8^+$ Τ κύτταρα, οι οποίοι παρουσιάζονται μέσω των μορίων MHC τάξης Ι και προκύπτουν από την επεξεργασία του δεκαπενταπεπτιδίου της καλλιέργειας από τα πρωτεοσώματα. Η ειδικότητα για τα μελετούμενα πεπτίδια επιβεβαιώνεται περαιτέρω από την αδυναμία απάντησης σε καλλιέργεια με την προσθήκη DC που φέρουν στην επιφάνειά τους ανοσογονικά πεπτίδια προερχόμενα από την πρωτεΐνη gp100, που δύνανται να δεσμευθούν τόσο από μόρια MHC τάξης Ι, όσο και τάξης ΙΙ και να αναγνωριστούν αντίστοιχα από $CD8^+$ και $CD4^+$ Τ κύτταρα (cpm στα επίπεδα των καλλιεργειών με μη «φορτωμένα» DC). Τα πεπτίδια της πρωτεΐνης gp100 είναι τα (44-59) και (154-162).

Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και η εκτίμηση των επιπέδων της IFN-γ στο υπερκείμενο των αντίστοιχων καλλιεργειών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.1.



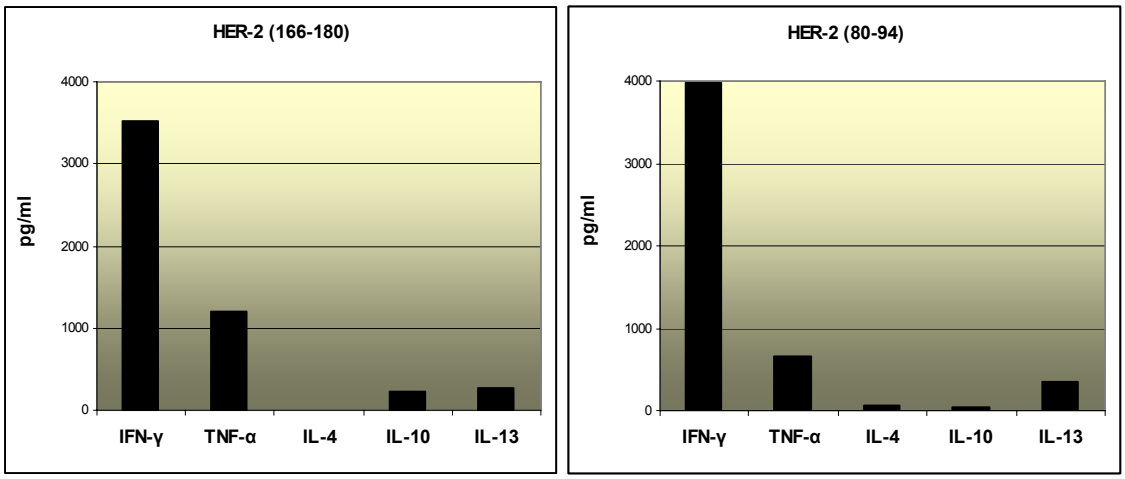






Σχήμα 9.1. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από PBMC υγιούς δότη μετά από 4 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.

Στη συνέχεια οι καλλιέργειες αυτές ελέγχθηκαν για την παραγωγή κυτταροκινών κατόπιν επαγωγής με αυτόλογα DC επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο. Παρατηρήθηκε πολύ υψηλή παραγωγή IFN-γ [3593 και 3520 pg/ml αντίστοιχα για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180)], μέτρια παραγωγή TNF-α [650 και 1210 pg/ml αντίστοιχα για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180)], και χαμηλά επίπεδα IL-4, IL-10 και IL-13 [συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 7 έως 324 pg/ml]. Τα είδη και οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων κυτταροκινών υποδεικνύουν ότι η ανοσοαπόκριση είναι τύπου TH1, έχουμε δηλαδή τα βοηθητικά Τ κύτταρα που εμπεριέχονται στις καλλιέργειες είναι ικανά να παράγουν κυτταροκίνες που επάγουν ανοσία κυτταρικού τύπου. Τα ποσά των κυτταροκινών αυτών εκτιμήθηκαν στο υπερκείμενο καλλιέργειας 100.000 κυττάρων, σε 200 μl θρεπτικού υλικού, σε 24 ώρες. Η έκκριση κυτταροκινών από τα κύτταρα των δύο καλλιεργειών παρουσιάζεται στο σχήμα 9.2.

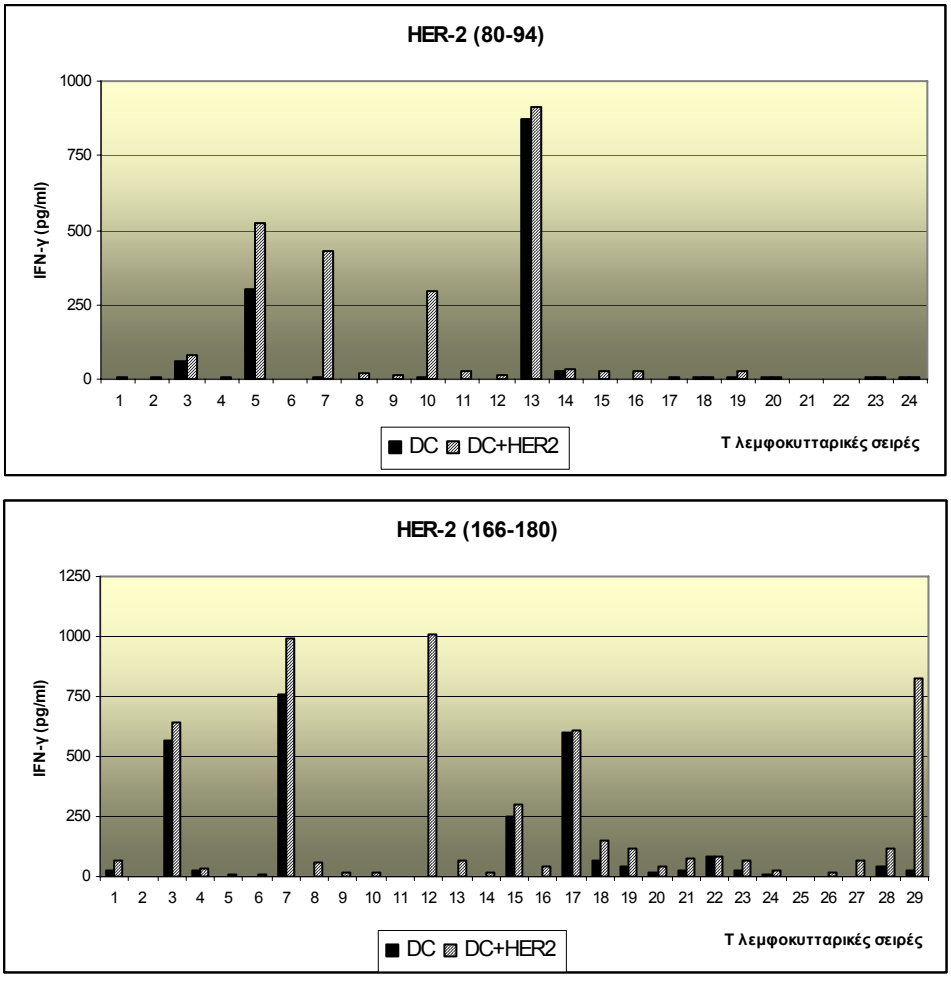


Σχήμα 9.2. Παραγωγή κυτταροκινών από PBMC υγιούς δότη μετά από 4 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC επωασμένα με τα αναφερόμενα πεπτίδια.

9.2. Δημιουργία $CD4^{\pm}$ και $CD8^{\pm}$ Τ λεμφοκυτταρικών σειρών ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) και τους επιτόπους HER-2 (85-93) και HER-2 (171-179) που εμπεριέχονται σε αυτά.

Με στόχο να μελετηθούν πιο λεπτομερειακά οι απαντήσεις των Τ κυττάρων στα εξεταζόμενα πεπτίδια, έγινε προσπάθεια απομόνωσης $CD4^{+}CD8^{-}$ και $CD4^{-}CD8^{+}$ λεμφοκυττάρων από τις καλλιέργειες που έδωσαν θετικές απαντήσεις στην επαγωγή με DC που έφεραν στην επιφάνειά τους τα αντίστοιχα πεπτίδια. Για το σκοπό αυτό, δείγματα των αρχικών καλλιεργειών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

διαμοιράστηκαν σε μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα, με συχνότητα τοποθέτησης 0.5 κύτταρα ανά θέση μικροπλάκας, χρησιμοποιώντας βασικό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 0.75 μg/ml PHA, το οποίο περιείχε 100.000/ml αλλογενών PBMC επεξεργασμένα με μιτομικίνη C ως τροφοδοτική στιβάδα. Με τη διαδικασία αυτή απομονώθηκε πληθώρα κυτταρικών σειρών, οι οποίες αρχικά εξετάσθηκαν για ειδικότητα στα αντίστοιχα πεπτίδια με την ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA. Για το σκοπό αυτό, κάθε θέση μικροπλάκας, διαιρέθηκε σε δύο θέσεις, οι οποίες περιείχαν ίσο αριθμό κυττάρων. Στη μία από αυτές προστέθηκαν αυτόλογα DC επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο και στην άλλη μη επωασμένα αυτόλογα DC. Τα υπερκείμενα των μικροκαλλιεργειών συλλέχθηκαν και εξετάσθηκαν ως προς τη συγκέντρωση της IFN-γ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.3.



Σχήμα 9.3. Παραγωγή IFN-γ μετά από επαγωγή με DC επωασμένα με την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu, λεμφοκυτταρικών σειρών προερχόμενων από PBMC μετά από 4 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια,.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ELISA για την ικανότητα ειδικής παραγωγής IFN-γ κατόπιν επαγωγής με DC «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο, δείχνουν ότι οι λεμφοκυτταρικές σειρές με αύξοντα αριθμό (όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 9.3) 5, 7 και 10 είναι ειδικές για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) (SI = 1.8, 86 και 49 αντίστοιχα) και με αύξοντα αριθμό 7, 12 και 29 για το πεπτίδιο HER-2 (166-180) (SI = 1.4, 231 και 33 αντίστοιχα). Τα διαγράμματα δείχνουν επίσεις ότι η κυτταρική σειρά 13 του πεπτιδίου HER-2 (80-94) και οι σειρές 3, 15 και 17 του HER-2 (166-180) παράγουν υψηλά ποσά IFN-γ, αλλά το SI σε σχέση με τα μη «φορτωμένα» DC είναι πολύ χαμηλό. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μη ειδική παραγωγή IFN-γ, πιθανά λόγω του γεγονότος ότι τα κύτταρα είναι ακόμα πολύ ενεργοποιημένα από την επίδραση της PHA.

Στη συνέχεια οι κυτταρικές σειρές που επιλέχθηκαν, εξετάσθηκαν ως προς το αν αποτελούνται από $CD4^+$ ή $CD8^+$ λεμφοκύτταρα. Ο έλεγχος αυτός έγινε με κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1. Ανάλυση του φαινοτύπου των ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-280) ως προς την παρουσία βοηθητικών και κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων

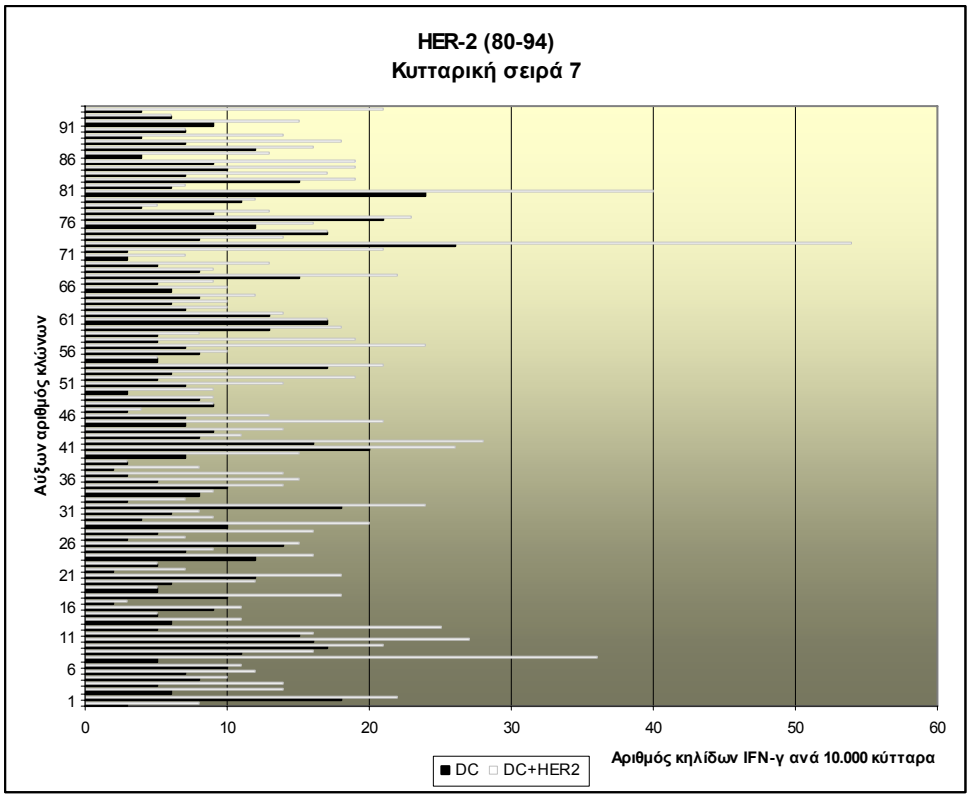
	$CD4^+CD8^-$	$CD4^-CD8^+$	$CD4^+CD8^+$	$CD4^-CD8^-$
HER-2 (80-94)				
Σειρά 5	66%	12%	2%	20%
Σειρά 7	97%	0%	0.9%	2.1%
Σειρά 10	0%	64%	0.1%	35.9%
HER-2 (166-180)				
Σειρά 7	6%	35%	7%	52%
Σειρά 12	1.7%	94%	1%	3.3%
Σειρά 29	77%	6%	3%	14%

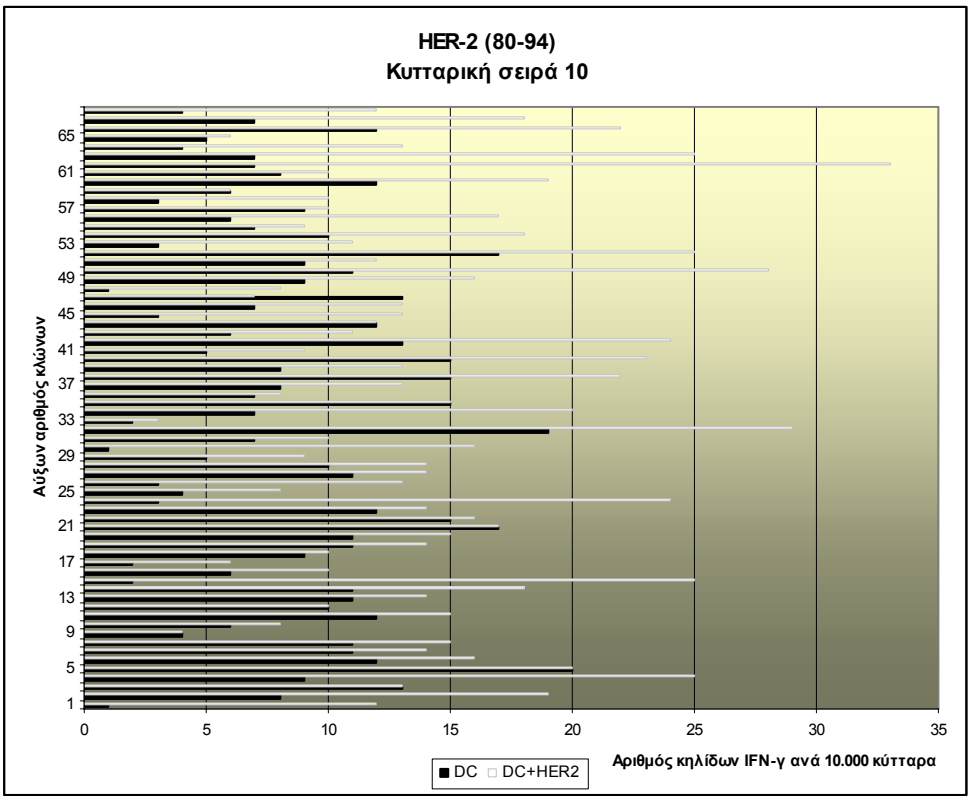
Τα διπλά αρνητικά κύτταρα αντιστοιχούν στον πληθυσμό των απενεργοποιημένων LCL που χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση, τον οποίο δεν έχει υπερκαλύψει ακόμη ο πολλαπλασιασμός των δραστικών ενεργοποιημένων κυττάρων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν για κάθε πεπτίδιο υφίσταται από μία κυτταρική σειρά που αποτελείται κύρια από $CD4^+CD8^-$ κύτταρα [την 7 για το HER-2 (80-94) και την 29 για το HER-2 (166-180)], από μία που αποτελείται κύρια από $CD4^-CD8^+$ κύτταρα (τις 10 και 12 αντίστοιχα) και από μία σειρά που περιέχει υψηλή αναλογία και από τα δύο είδη κυττάρων [την 5 για το HER-2 (80-94) και την 7 για το HER-2 (166-180)].

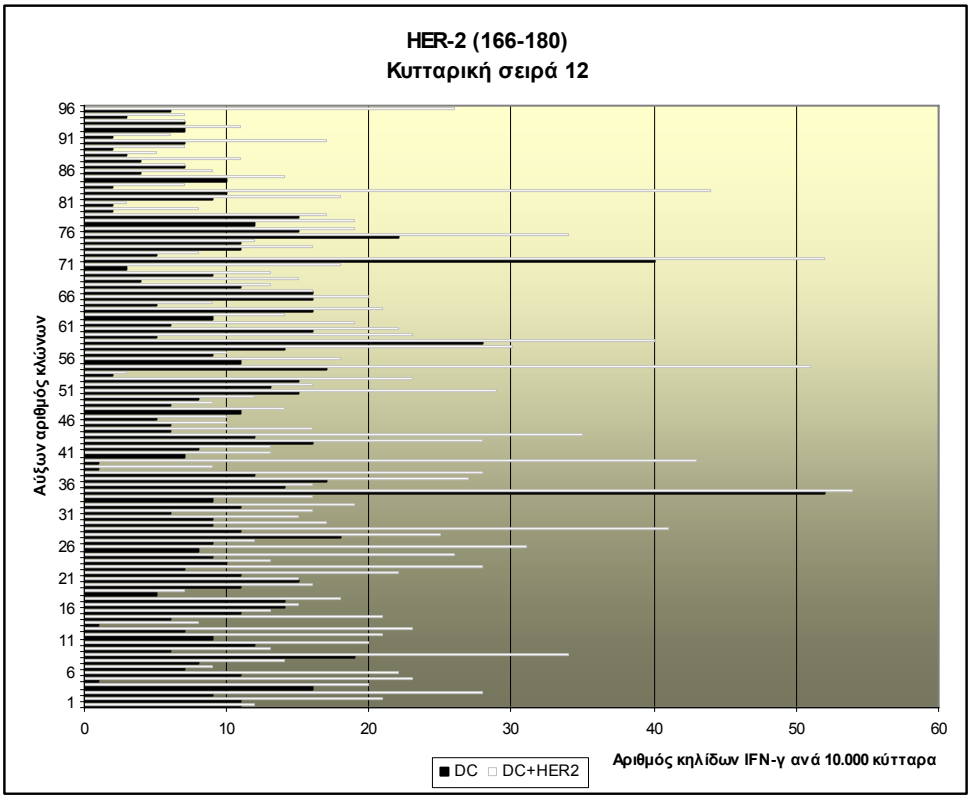
9.3. Δημιουργία κλώνων Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) και τους επιτόπους HER-2 (85-93) και HER-2 (171-179) που εμπεριέχονται σε αυτά.

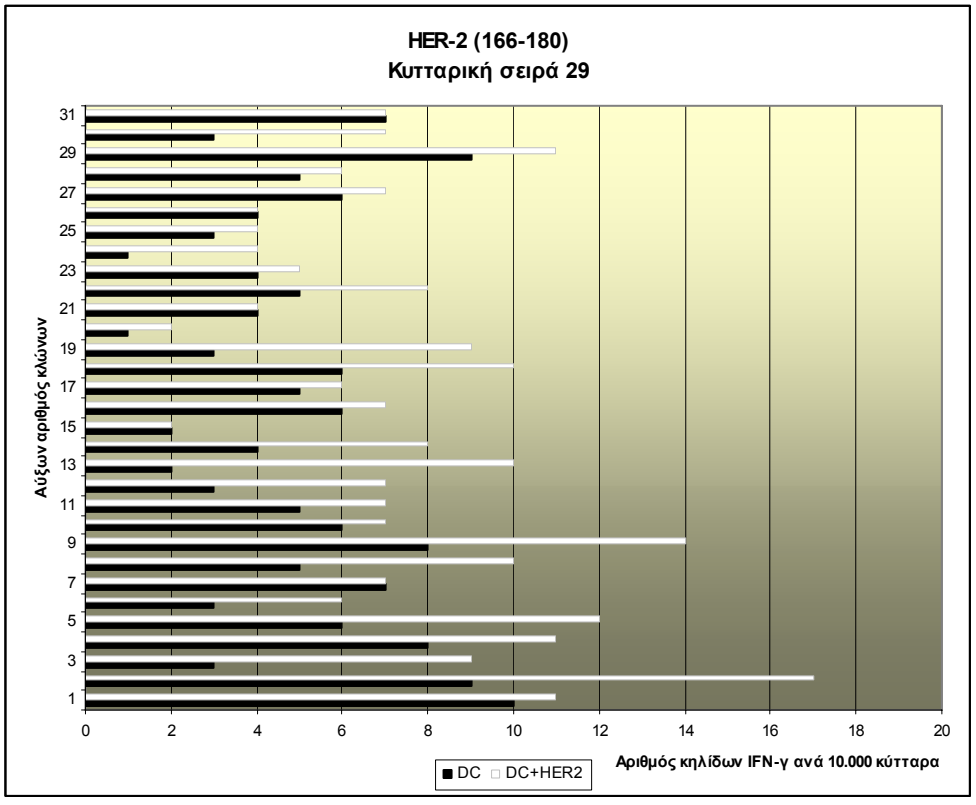
Αφού επιλέχθηκε από μία λεμφοκυτταρική σειρά που αποτελείται ως επί το πλείστον από $CD4^+CD8^-$ ή $CD4^-CD8^+$ Τ κύτταρα [δηλαδή οι Τ λεμφοκυτταρικές σειρές 7 και 10 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και οι 12 και 29 για το HER-2 (166-180)], έγινε κλωνοποίηση αυτών με σκοπό τη δημιουργία κλώνων ειδικών για τα αντίστοιχα πεπτίδια. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των λεμφοκυτταρικών σειρών στην ενότητα 9.2, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα τώρα τοποθετούνται με συχνότητα 0.1 κύτταρα ανά θέση μικροπλάκας. Όταν αναπτυχθούν οι κλώνοι των Τ λεμφοκυττάρων, ο πληθυσμός των κυττάρων κάθε θέσης της μικροπλάκας διαιρείται σε δύο θέσεις που περιέχουν τον ίδιο αριθμό κυττάρων, οι οποίες επωάζονται με DC «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο ή με μη «φορτωμένα» DC. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε μικροπλάκες ELISPOT για IFN-γ και εκτιμάται ο αριθμός των κυττάρων που εκκρίνουν IFN-γ σε απάντηση στην αναγνώριση του πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα σχήματα 9.4 και 9.5.





Σχήμα 9.4. Παραγωγή κηλίδων IFN-γ από τους λεμφοκυτταρικούς κλώνους που προέκυψαν από τις αναφερόμενες ειδικές για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) λεμφοκυτταρικές σειρές μετά από επαγωγή με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με τα συγκεκριμένο πεπτίδιο.





Σχήμα 9.5. Παραγωγή κηλίδων IFN-γ από τους λεμφοκυτταρικούς κλώνους που προέκυψαν από τις αναφερόμενες ειδικές για το πεπτίδιο HER-2 (166-180) λεμφοκυτταρικές σειρές μετά από επαγωγή με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με τα συγκεκριμένο πεπτίδιο.

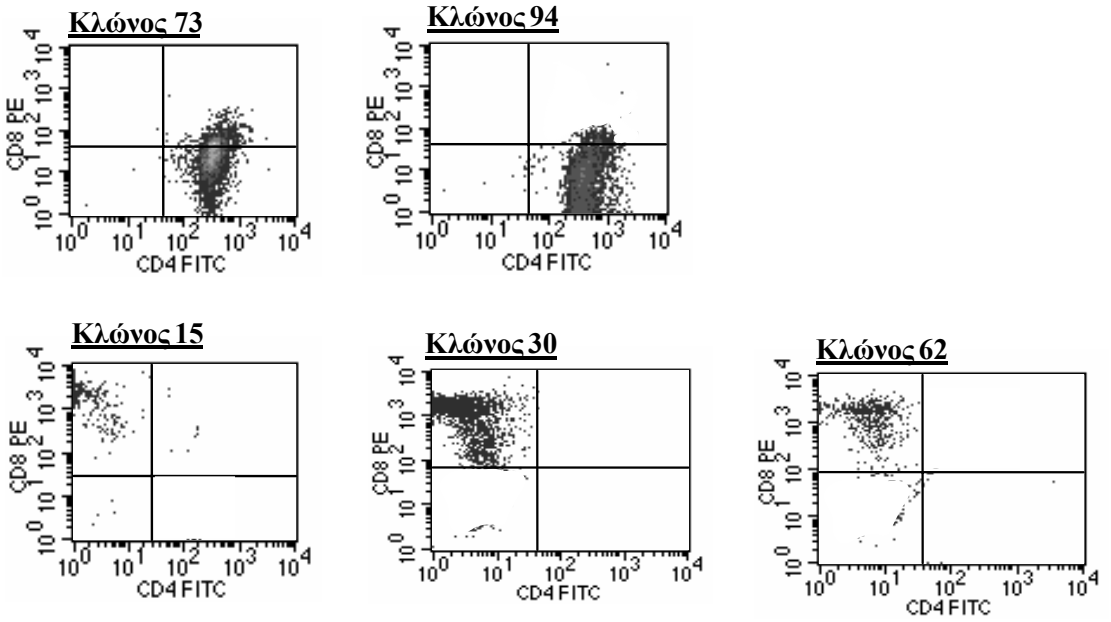
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ELISPOT, θεωρήθηκαν ειδικές για το αντίστοιχο πεπτίδιο τις κηλίδες IFN-γ, όταν ο αριθμός των κηλίδων που μετρήθηκε ανά 10^4 κύτταρα στις μικροκαλλιέργειες που περιείχαν DC «φορτωμένα» με πεπτίδιο ήταν μεγαλύτερος του αριθμού των κηλίδων στην αντίστοιχη μικροκαλλιέργεια που περιείχε μη «φορτωμένα» DC συν το διπλάσιο της σταθερής απόκλισης του συνόλου των μικροκαλλιεργειών με μη «φορτωμένα» DC. Με τον τρόπο αυτό, αναγνωρίστηκαν ως θετικοί 16 $CD4^+$ και 10 $CD8^+$ κλώνοι για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 6 $CD4^+$ και 17 $CD8^+$ κλώνοι για το πεπτίδιο HER-2 (166-180). Οι κλώνοι αυτοί είναι οι No. 8, 13, 29, 36, 37, 42, 45, 52, 57, 58, 73, 81, 86, 89, 90 και 94 της $CD4^+$ κυτταρικής σειράς 7 και οι No. 1, 2, 4, 15, 30, 32, 42, 50, 62, 67 της $CD8^+$ κυτταρικής σειράς 10 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94). Αντίστοιχα, για το πεπτίδιο HER-2 (166-180), θετικοί είναι οι $CD4^+$ κλώνοι No. 2, 3, 8, 9, 13 και 19 της σειράς 29 και οι No. 3, 9, 13, 15, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 40, 55, 58, 60, 71, 83 και 96 της $CD8^+$ κυτταρικής σειράς 12.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια αύξησης του αριθμού των κυττάρων των απομονωθέντων ειδικών για τα εξεταζόμενα πεπτίδια κλώνων, μέσω της μη ειδικής επαγωγής με PHA. Συγκεκριμένα, οι κλώνοι καλλιεργήθηκαν σε βασικό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 0.75 μg/ml PHA και 500.000/ml αλλογενή PBMC επεξεργασμένα με μιτομικίνη C. Οι κλώνοι που αναπτύχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ήταν οι ακόλουθοι: για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) οι No. 73 και 94 της $CD4^+$ κυτταρικής σειράς 7 και οι No. 15, 30 και 62 της $CD8^+$ σειράς 10. Αντίστοιχα για το πεπτίδιο HER-2 (166-180), αυξήθηκαν ικανοποιητικά για περαιτέρω μελέτη οι κλώνοι No. 3 και 13 της $CD4^+$ σειράς 29 και ο κλώνος No. 40 της $CD8^+$ κυτταρικής σειράς 12.

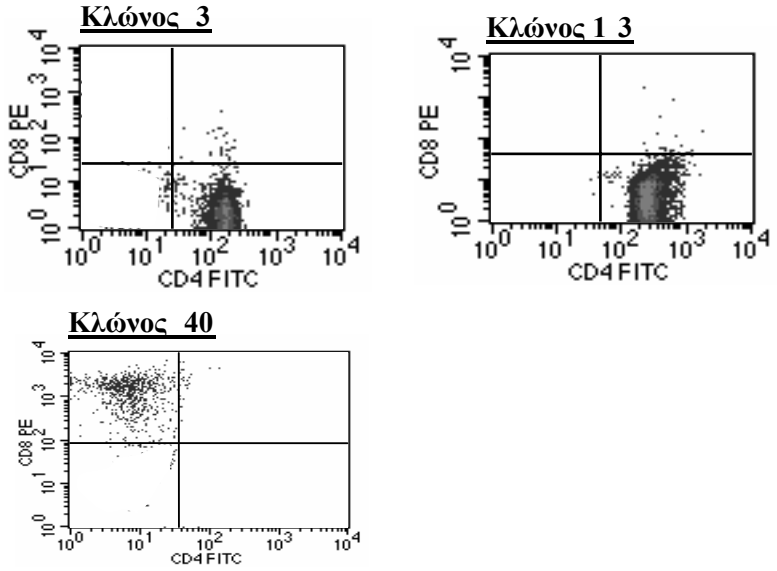
9.4. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων.

Με σκοπό τη φαινοτυπική ανάλυση των κλώνων που απομονώθηκαν, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής για την επιβεβαίωση ότι πρόκειται για $CD4^+$ ή $CD8^+$ Τ κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.6.

HER-2 (80-94)



HER-2 (166-180)



Σχήμα 9.6. Φαινοτυπική ανάλυση των ειδικών για τα αναφερόμενα πεπτίδια λεμφοκυτταρικών κλώνων ως προς τα επιφανειακά μόρια CD4 και CD8.

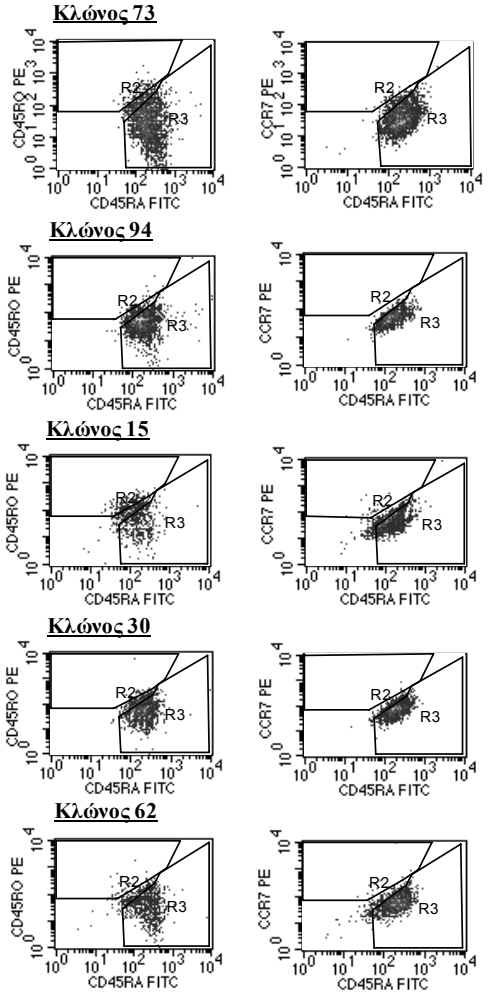
Από τα γραφήματα της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκε ότι οι κλώνοι No. 73 και 94, ειδικοί για το πεπτίδιο HER-2 (80-94), και οι κλώνοι No. 3 και 13 ειδικοί για το πεπτίδιο HER-2 (166-180) δεν περιλαμβάνουν καθόλου $CD4^-CD8^+$ κύτταρα, ενώ αποτελούνται στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από κύτταρα $CD4^+CD8^-$ (αντίστοιχα 92%, 97%, 94% και 99%) με μικρή αναλογία $CD4^+CD8^+$ κυττάρων (7%, 1.9%, 1% και 0.2% αντίστοιχα). Αντίθετα, οι κλώνοι No. 15, 30 και 62, ειδικοί για το

πεπτίδιο HER-2 (80-94) και ο No. 40 ειδικός για το πεπτίδιο HER-2 (166-180), αποτελούνται κύρια από κύτταρα $CD4^{-}CD8^{+}$ (99%, 98%, 97% και 98% αντίστοιχα) με μικρή αναλογία διπλά θετικών $CD4^{+}CD8^{+}$ κυττάρων (αντίστοιχα 0.8%, 0%, 0% και 0.2%).

Στη συνέχεια, εξετάσθηκε αν οι κλώνοι που απομονώθηκαν αποτελούνταν από δραστικά κύτταρα ή κύτταρα μνήμης, καθώς και αν τα τελευταία είναι κεντρικά ή δραστικά κύτταρα μνήμης. Τα γραφήματα της κυτταρομετρίας ροής και οι πίνακες των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στα σχήματα 9.7 και 9.8.

HER-2 (80-94)

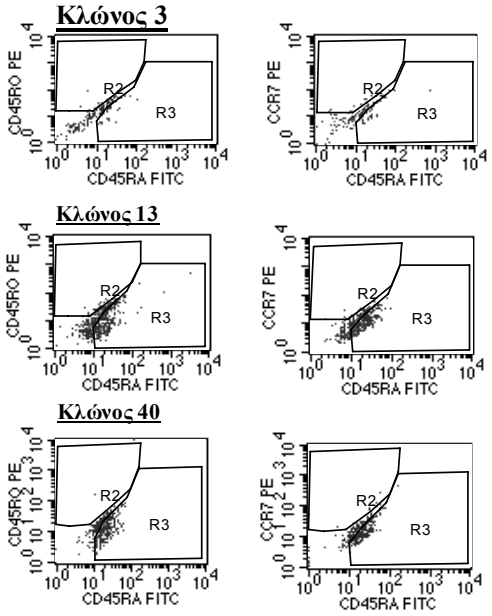
Κλώνος	% CD45RA	%CD45RO	%CCR7
73	82	12.2	0.4
94	97	0.2	0.0
15	89	6.3	0.1
30	98	0.2	0.0
62	97	0.3	0.1



Σχήμα 9.7. Παρουσία των μορίων CD45RA, CD45RO και CCR7 στην επιφάνεια των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) λεμφοκυτταρικών κλώνων.

HER-2 (166-180)

Κλώνος	% CD45RA	%CD45RO	%CCR7
3	52	1.1	1.0
13	69	1.1	0.1
40	71	0.0	0.1

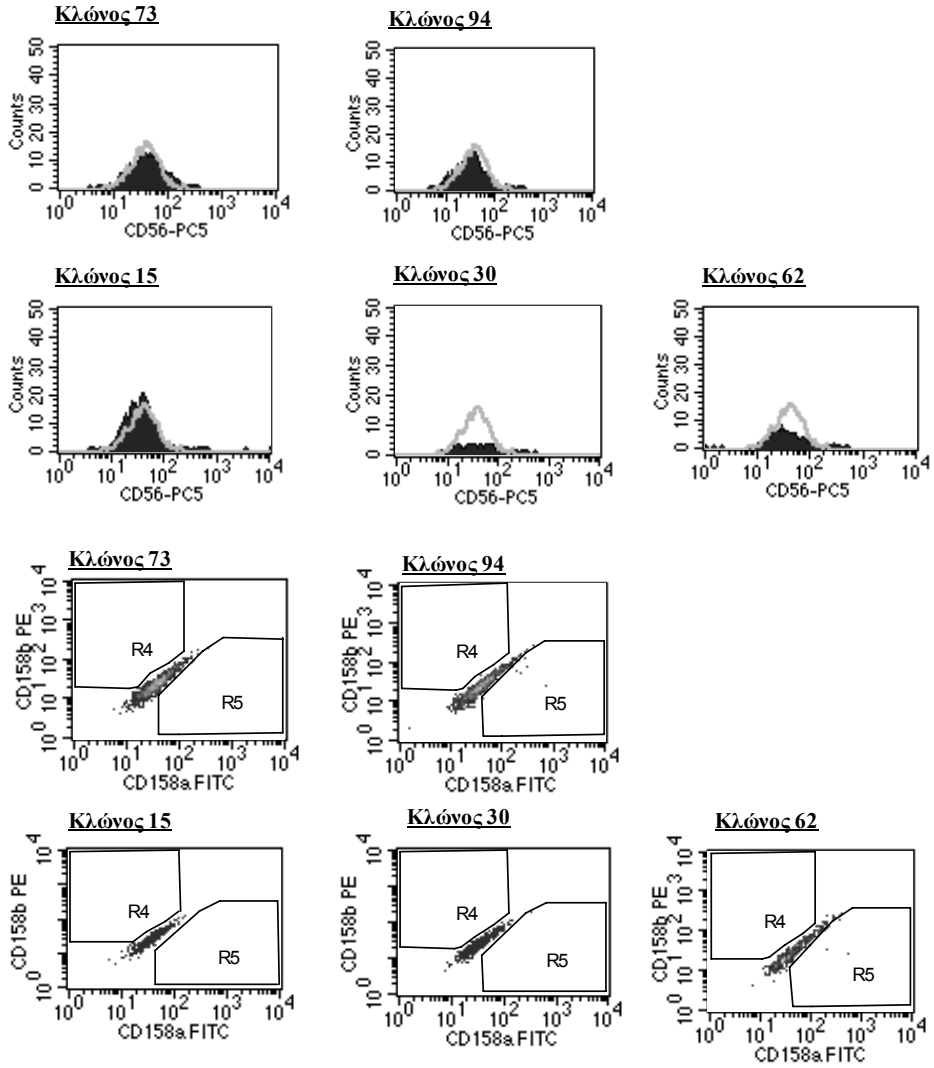


Σχήμα 9.8. Παρουσία των μορίων CD45RA, CD45RO και CCR7 στην επιφάνεια των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (166-180) λεμφοκυτταρικών κλώνων.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όλοι οι μελετούμενοι κλώνοι, εκτός των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) No. 15 και 73 κλώνων, εκφράζουν την ισομορφή CD45 RA και όχι την CD45RO του επιφανειακού μορίου CD45, γεγονός που σημαίνει ότι πρόκειται για δραστικά κύτταρα και όχι για κύτταρα μνήμης. Με το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο, παράγονται κυρίως δραστικά Τ λεμφοκύτταρα, όπως διαπιστώθηκε και στην ενότητα 7 για το πεπτίδιο HER-2 (844-899). Παρόλα αυτά, στους κλώνους No. 15 και 73, παρατηρήθηκε και η ύπαρξη μικρού ποσοστού (6.3 και 12.2% αντίστοιχα) $CD45RO^+$ κυττάρων, δηλαδή ένα μικρό ποσοστό κυττάρων μνήμης. Δεδομένου ότι πρόκειται για $CD8^+$ και $CD4^+$ κυτταρικούς κλώνους αντίστοιχα, δεν μπορεί να αποδοθεί η διαφορά σε διαφορετική συμπεριφορά των δύο κατηγοριών κυττάρων. Πιθανά κάποια κύτταρα να βρίσκονταν σε διαφορετική κατάσταση διέγερσης τη στιγμή της ενεργοποίησης και το γεγονός αυτό να οδήγησε σε απόκτηση διαφορετικού φαινοτύπου. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όλοι οι κλώνοι είναι αρνητικοί για το μόριο CCR7, πράγμα που υποδεικνύει ότι δεν έχουν την τάση να κατευθυνθούν προς τους λεμφαδένες, αλλά αντίθετα, δύνανται να κατευθυνθούν στους περιφερικούς ιστούς και εκεί να επιτελέσουν τη λειτουργική τους δράση.

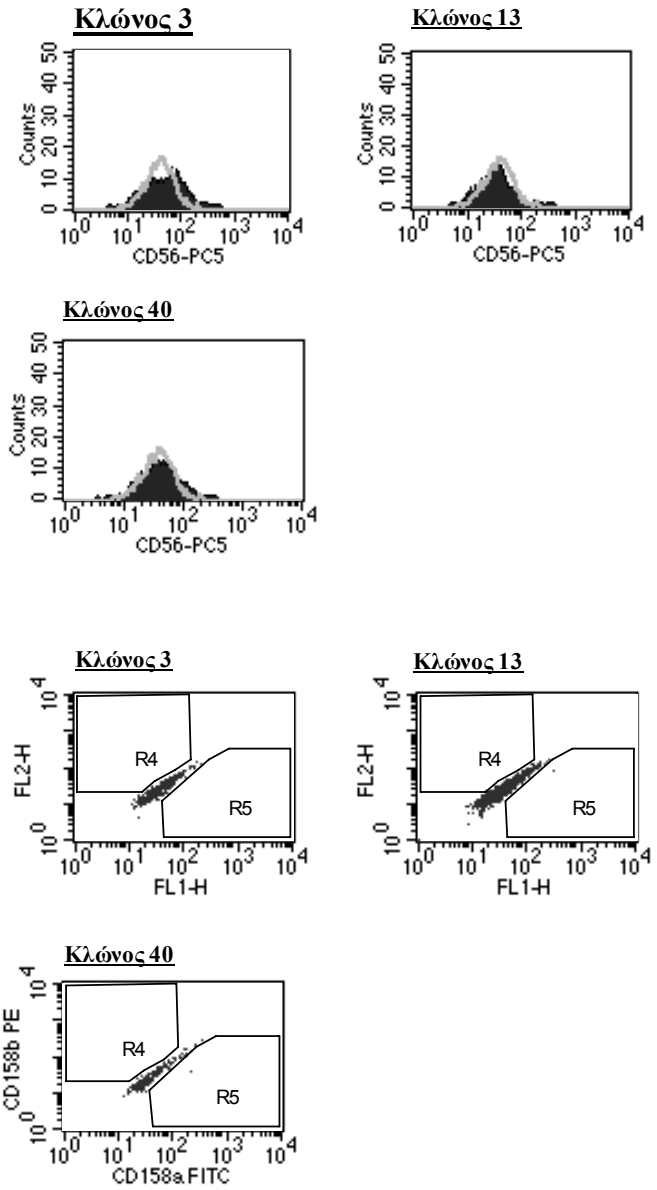
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν οι κλώνοι εκφράζουν το επιφανειακό μόριο CD56, αν δηλαδή πρόκειται για NKT κύτταρα, καθώς και αν εκφράζουν τους ανασταλτικούς υποδοχείς KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) CD158a και

CD158b, οι οποίοι εμφανίζονται στην κυτταρική μεμβράνη ορισμένων NK και NKT κυττάρων, καθώς και μικρής ομάδας Τ λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα (γραφήματα κυτταρομετρίας ροής και πίνακες αποτελεσμάτων) παρουσιάζονται στα σχήματα 9.9 και 9.10.



Κλώνος	%CD56	%CD158a	%CD158b
73	0.0	0.0	0.0
94	0.1	0.1	0.0
15	0.2	0.0	0.0
30	0.1	0.0	0.0
62	0.1	0.1	0.0

Σχήμα 9.9. Παρουσία των μορίων CD56, CD158a και CD158b στην επιφάνεια των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) λεμφοκυτταρικών κλώνων. Με το σκούρο χρώμα απεικονίζεται το δείγμα ελέγχου (αντίσωμα χωρίς ειδικότητα για το συγκεκριμένο μόριο) και με την ανοικτόχρωμη γραμμή το δείγμα με το αντίσωμα ενάντια στο εξεταζόμενο επιφανειακό μόριο.



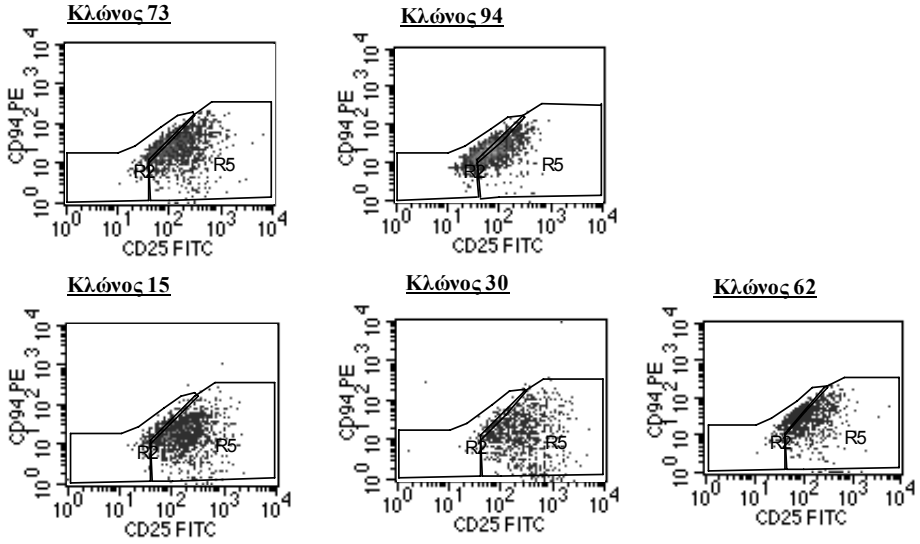
Κλώνος	%CD56	%CD158a	%CD158b
3	020	0.0	0.0
13	0.1	0.0	0.0
40	0.0	0.1	0.0

Σχήμα 9.10. Παρουσία των μορίων CD56, CD158a και CD158b στην επιφάνεια των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (166-180) λεμφοκυτταρικών κλώνων. Με το σκούρο χρώμα απεικονίζεται το δείγμα ελέγχου (αντίσωμα χωρίς ειδικότητα για το συγκεκριμένο μόριο) και με την ανοικτόχρωμη γραμμή το δείγμα με το αντίσωμα ενάντια στο εξεταζόμενο επιφανειακό μόριο.

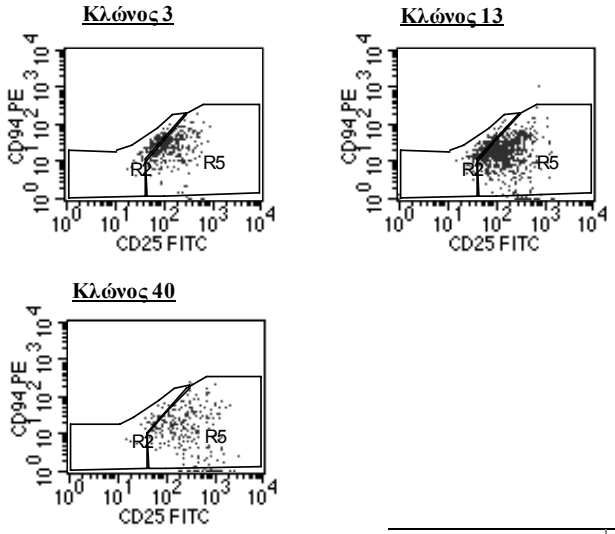
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κανένας από τους μελετούμενους κλώνους δεν παρουσιάζει το επιφανειακό μόριο CD56, δηλαδή δεν πρόκειται για NKT κύτταρα. Επίσης, δεν εμφανίζουν τους ανασταλτικούς υποδοχείς KIR CD158a και CD158b.

Εκτός από τους KIR ένας άλλος υποδοχέας που δύναται να μεταβιβάσει ανασταλτικά σήματα είναι το επιφανειακό μόριο CD94, η παρουσία του οποίου εξετάσθηκε στα κύτταρα των μελετούμενων κλώνων. Τέλος, ελέγχθηκε η επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα της IL-2, CD25, προκειμένου να εκτιμηθεί η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων των μελετούμενων κλώνων με τη χρήση IL-2, όπως απαντάται σε πολλά κλινικά πρωτόκολλα. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής (γραφήματα και πίνακες τιμών) για τα δύο αυτά μόρια δείχνουν ότι οι μελετούμενοι κλώνοι παρουσιάζουν υψηλή έκφραση CD25 και συνεπώς είναι δεκτικοί σε ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό με την επίδραση IL-2, ενώ δεν εκφράζουν καθόλου CD94 (σχήμα 9.11).

HER-2 (80-94)



HER-2 (166-180)



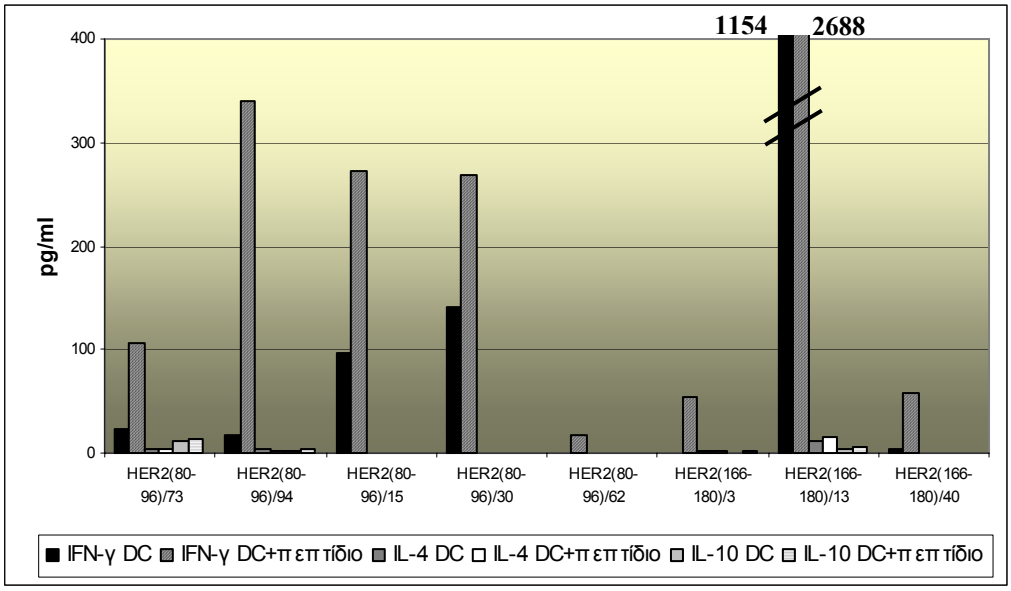
Κλώνος	%CD25	%CD94
HER-2 (80-94)		
73	89	0.0
94	68	0.0
15	96	0.1
30	97	0.1
62	89	0.0
HER-2 (166-180)		
3	71	0.0
13	91	0.0
40	90	0.0

Σχήμα 9.11. Παρουσία των μορίων CD25 και CD94 στην επιφάνεια των ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) λεμφοκυτταρικών κλώνων.

9.5. Λειτουργική ανάλυση των Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν τα κύτταρα των κλώνων που απομονώθηκαν είναι λειτουργικά, μελετήθηκε το φάσμα των κυτταροκινών που παράγεται σαν αποτέλεσμα της διέγερσής τους με το αντίστοιχο πεπτίδιο, καθώς και η ικανότητά τους να σκοτώνουν κύτταρα-στόχους, τα οποία φέρουν στην επιφάνεια το κατάλληλο αντιγόνο.

Αρχικά, οι κλώνοι επήχθησαν με αυτόλογα DC επωασμένα και μη επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο σε συγκέντρωση 50 μg/ml, συλλέχθηκε το υπερκείμενο της καλλιέργειας και εξετάσθηκε για την παραγωγή των κυτταροκινών IFN-γ, IL-4 και IL-10. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.12.

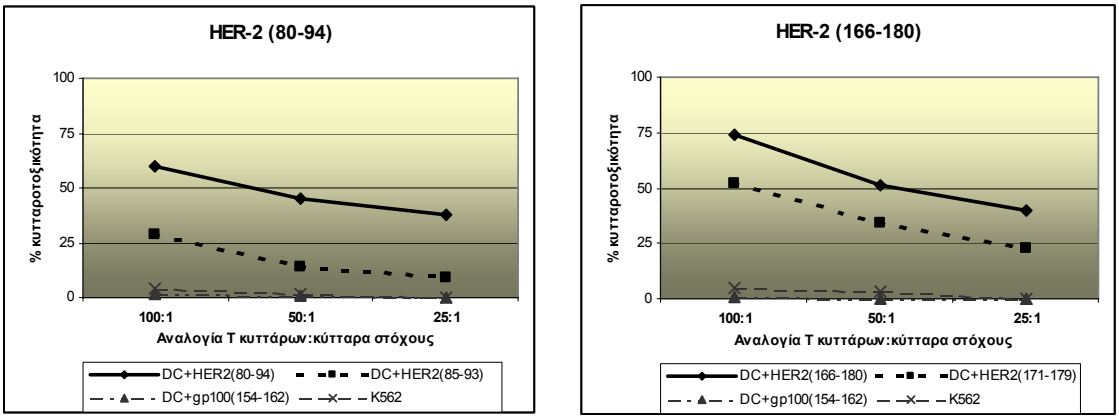


Σχήμα 9.12. Παραγωγή κυτταροκινών από τους ειδικούς για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) λεμφοκυτταρικούς κλώνους.

Διαπιστώθηκε ότι όλοι οι μελετούμενοι κλώνοι, σε απάντηση στην επαγωγή με DC «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο, παράγουν υψηλά ποσά IFN-γ. Τα επίπεδα IL-4 και IL-10, για τους $CD4^+$ Τ κλώνους, παραμένουν πολύ χαμηλά. Τα υψηλά επίπεδα IFN-γ, σε συνδυασμό με την πολύ μικρή έκκριση των άλλων δύο κυτταροκινών από τους κλώνους βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, υποδεικνύουν ανοσολογική απάντηση κυτταρικού τύπου.

Στη συνέχεια, οι $CD8^+$ Τ λεμφοκυτταρικοί κλώνοι [No. 15, 30 και 62 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και No. 40 για το HER-2 (166-180)] ελέγχθηκαν για την ικανότητα λύσης αυτόλογων DC επωασμένων και μη επωασμένων με το αντίστοιχο

πεπτίδιο σε συγκέντρωση 50 μg/ml. Για τις μελέτες κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα αρχικά δεκαπενταπεπτίδια, όσο και οι επίτοποι των μορίων MHC τάξης I που εμπεριέχονται σε αυτά και δύνανται να συνδεθούν ισχυρά με τα αλλήλια MHC που φέρει ο αντίστοιχος δότης PBMC, δηλαδή το εννιαπεπτίδιο HER-2 (85-93) για το δεκαπενταπεπτίδιο HER-2 (80-94) και το HER-2 (171-179) για το δεκαπενταπεπτίδιο HER-2 (166-180). Ως αρνητικές καλλιέργειες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αυτόλογα DC επωασμένα με το μη σχετικό πεπτίδιο gp100 (154-162), καθώς και η κυτταρική σειρά K562, ώστε να αποκλειστεί μη ειδική κυτταροτοξική δράση οφειλόμενη σε ενεργοποίηση από κυτταροκίνες (Lymphokine-Activated Killing activity: LAK activity). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 9.13.



Σχήμα 9.13. Κυτταροτοξική δράση των ειδικών για τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180) λεμφοκυτταρικών κλώνων ενάντια σε αυτόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια και στην κυτταρική σειρά K562.

Τα διαγράμματα της κυτταροτοξικότητας υποδηλώνουν ότι τα $CD8^+$ Τ κύτταρα αναγνωρίζουν τόσο το αρχικό πεπτίδιο που προστέθηκε στην καλλιέργεια, όσο και το εννιαπεπτίδιο που θεωρήθηκε ως ο πιο πιθανός επίτοπος για αναγνώριση. Το γεγονός ότι η λυτική δράση των κυττάρων είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούνται ως στόχοι τα αρχικά δεκαπενταπεπτίδια, υποδεικνύει ότι η τμήση τους από τα πρωτεασώματα δεν παράγει μόνο τα εννιαπεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, αλλά και άλλους επιτόπους, ικανούς να αναγνωριστούν αποτελεσματικά από τα $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα.

10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑΣ CD4+ ΚΑΙ CD8+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΩΝ

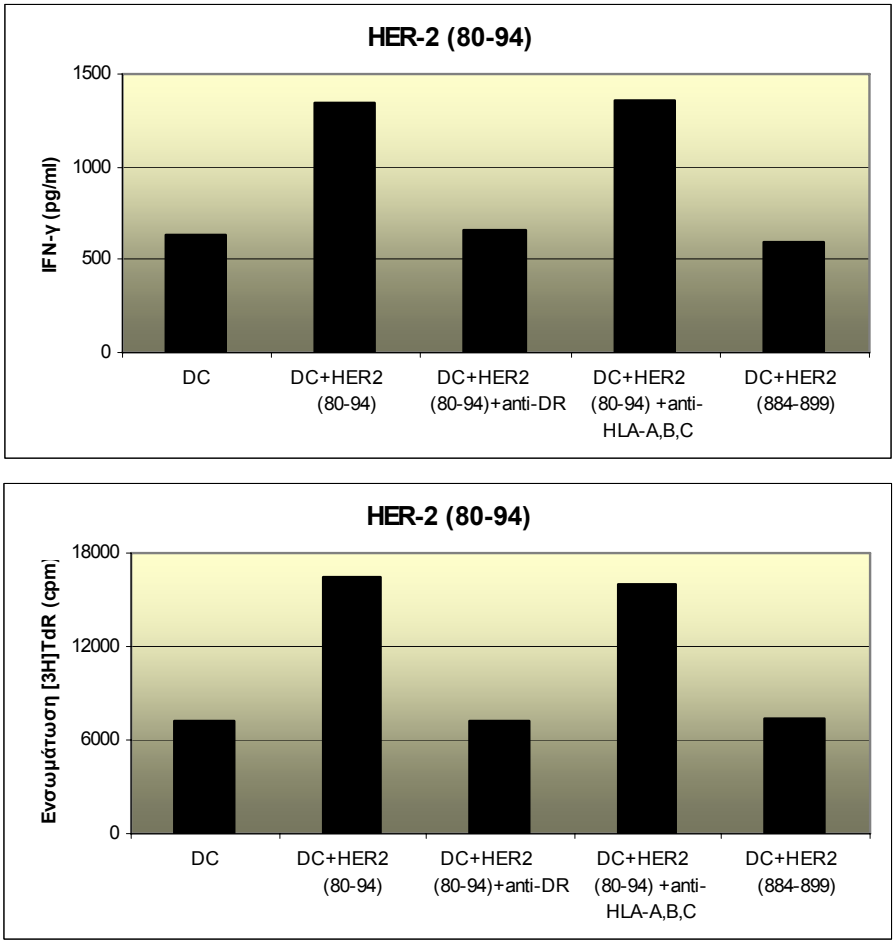
10.1. Επαγωγή βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για το επιθυμητό πεπτίδιο

Για τη μελέτη της συνεργασίας των βοηθητικών και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτίδια HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180), τα οποία, όπως περιγράψαμε στην ενότητα 9, περιέχουν επιτόπους που δύνανται να συνδεθούν με μόρια MHC τάξης I και τάξης II και, συνεπώς, μπορούν να αναγνωριστούν τόσο από $CD4^+$ όσο και από $CD8^+$ Τ κύτταρα. Λαμβανομένης υπόψη της ισχύος σύνδεσης των επιτόπων των συγκεκριμένων πεπτιδίων με τα διαφορετικά αλλήλια του MHC, για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα PBMC υγιών δοτών με τυποποίηση Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας HLA-A2, -A32, -B35, -B51, -DR11, -DQ7, HLA-DR52 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και HLA-A26, -A11, -B51, -B18, -DR4, -DR11, -DQ7, -DR52, -DR53 για το πεπτίδιο HER-2 (166-180).

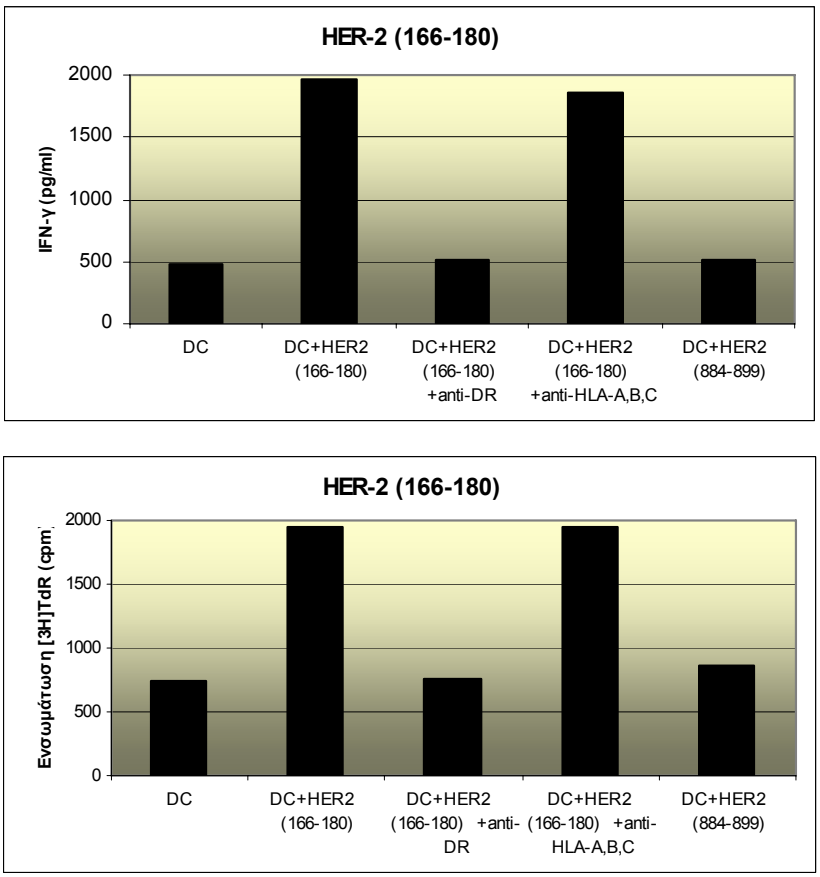
Αρχικά, από τα PBMC των χρησιμοποιούμενων αιμοδοτών απομονώθηκαν με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια $CD14^+$ Τ κύτταρα, τα οποία διαφοροποιήθηκαν σε DC (βλέπε κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι»). Τα DC αυτά επωάστηκαν 4 ώρες με 50 μg/ml του αντίστοιχου πεπτιδίου και χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων, απομονωμένων από τα PBMC με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. Αναλυτικότερα, σε μικροπλάκες 96 θέσεων κοίλου πυθμένα διαμοιράστηκαν 100.000 $CD4^+$ Τ κύτταρα και 10.000 DC ανά θέση μικροπλάκας, σε 200 μl βασικού θρεπτικού υλικού. Την τρίτη ημέρα αφαιρέθηκαν 100 μl υπερκειμένου από κάθε θέση της μικροπλάκας και προστέθηκαν 100 μl βασικού θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 40 IU/ml IL-2. Ακολούθησαν 2 επανενεργοποιήσεις σε χρονικά διαστήματα 7-10 ημερών με υποδιπλασιαζόμενη συγκέντρωση πεπτιδίου και η καλλιέργεια ελέγχθηκε για ειδικότητα στο χρησιμοποιούμενο πεπτίδιο.

Συγκεκριμένα, τα $CD4^+$ Τ κύτταρα παρήγαγαν υψηλά ποσά IFN-γ και εμφάνιζαν έντονο πολλαπλασιασμό σαν απάντηση στην παρουσίαση του αντίστοιχου πεπτιδίου από τα αυτόλογα DC [SI 1.7 και 2.3 αντίστοιχα για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 4.1 και 2.6 αντίστοιχα για το HER-2 (166-180)]. Η αντίδρασή τους αυτή περιοριζόταν από την προσθήκη στην καλλιέργεια αντί-HLA-DR αντισώματος (έως 92%), ενώ η προσθήκη αντί -HLA-A, B, C αντισώματος δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την παραγωγή IFN-γ. Τέλος, η ειδικότητα των $CD4^+$ Τ κυττάρων για τα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια

επιβεβαιώθηκε με την παρουσίαση από τα αυτόλογα DC του ανοσογονικού πεπτιδίου HER-2 (884-899), που παρουσιάζει αυξημένη ισχύ σύνδεσης με τα αλλήλια MHC που φέρουν οι χρησιμοποιούμενοι αιμοδότες, η οποία δεν επέφερε ενεργοποίηση των $CD4^+$ Τ κυττάρων. Όλα τα παραπάνω παρουσιάζονται στα σχήματα 10.1 και 10.2.



Σχήμα 10.1. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) $CD4^+$ λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με το συγκεκριμένο πεπτίδιο και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.



Σχήμα 10.2. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και παραγωγή IFN-γ από ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (166-180) $CD4^+$ λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση με αυτόλογα DC «φορτωμένα» ή μη «φορτωμένα» με το συγκεκριμένο πεπτίδιο και τη χρήση αντισωμάτων ελέγχου.

10.2. Ευαισθητοποίηση κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων παρουσία και απουσία των βοηθητικών $CD4^{\pm}$ κυττάρων

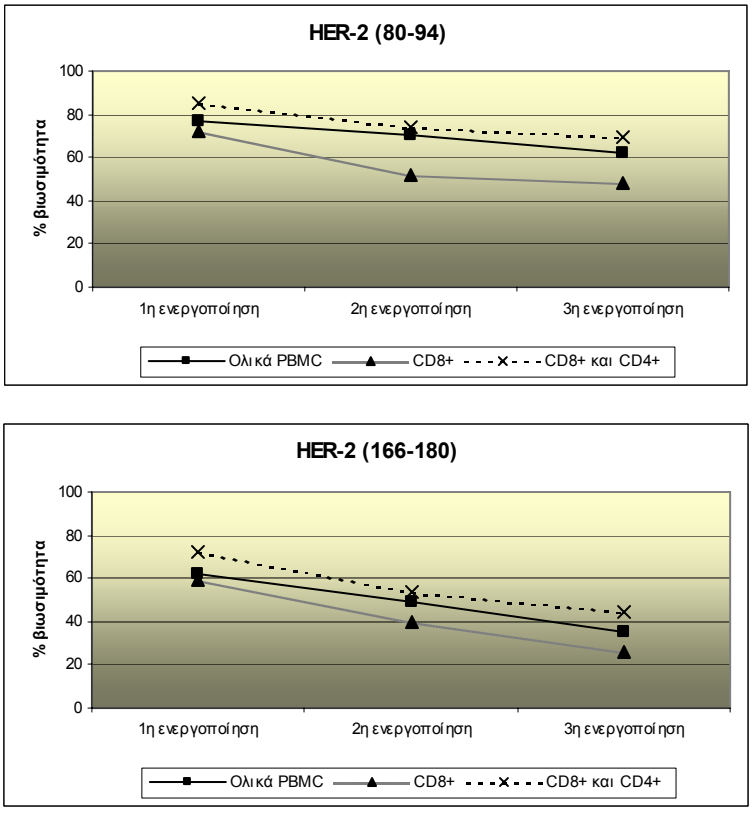
Για τη διερεύνηση της επίδρασης των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων στην ευαισθητοποίηση των $CD8^+$ κυττάρων, έγινε ενεργοποίηση των τελευταίων απουσία βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, παρουσία αθώων $CD4^+$ Τ κυττάρων που δύνανται να αναγνωρίσουν το πεπτίδιο, καθώς και της ειδικής για το πεπτίδιο $CD4^+$ Τ κυτταρικών σειρών, τη δημιουργία της οποίας περιγράψαμε στην προηγούμενη παράγραφο.

Αναλυτικά, DC καθενός από τους δύο χρησιμοποιούμενους στη μελέτη αυτή αιμοδότες επωάστηκαν με 50 μg/ml του αντίστοιχου πεπτιδίου και χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση τριών διαφορετικών καλλιεργειών. Η πρώτη περιείχε ολικά PBMC του αντίστοιχου δότη, τα οποία περιλαμβάνουν τόσο $CD4^+$ όσο και $CD8^+$ αθώα Τ κύτταρα, πολύ μικρό ποσοστό των οποίων φέρει TCR ειδικό για το πεπτίδιο που χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση. Η δεύτερη αποτελείτο από απομονωμένα με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια $CD8^+$ κύτταρα (καθαρότητα μεγαλύτερη από 98%) και η τρίτη από τα απομονωμένα $CD8^+$ Τ κύτταρα και $CD4^+$ κύτταρα ειδικά για το

χρησιμοποιούμενο πεπτίδιο, τα οποία παρήχθησαν όπως περιγράφηκε στην ενότητα. 10.1. Η αναλογία $CD8^+/CD4^+$ κυττάρων στην τελευταία καλλιέργεια ήταν 1/1. Μετά από 3 ενεργοποιήσεις στο θρεπτικό υλικό και τις συγκεντρώσεις των πεπτιδίων που περιγράφηκαν στην ενότητα 10.1 για την ενεργοποίηση των $CD4^+$ Τ κυττάρων, απομονώθηκαν με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια τα $CD8^+$ Τ κύτταρα από κάθε καλλιέργεια και ελέγχθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων, η ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών, καθώς και η ικανότητα κυτταροτοξικής δράσης.

Βιωσιμότητα των $CD8^+$ κυττάρων μετά την πρώτη, την δεύτερη και την τρίτη ενεργοποίηση

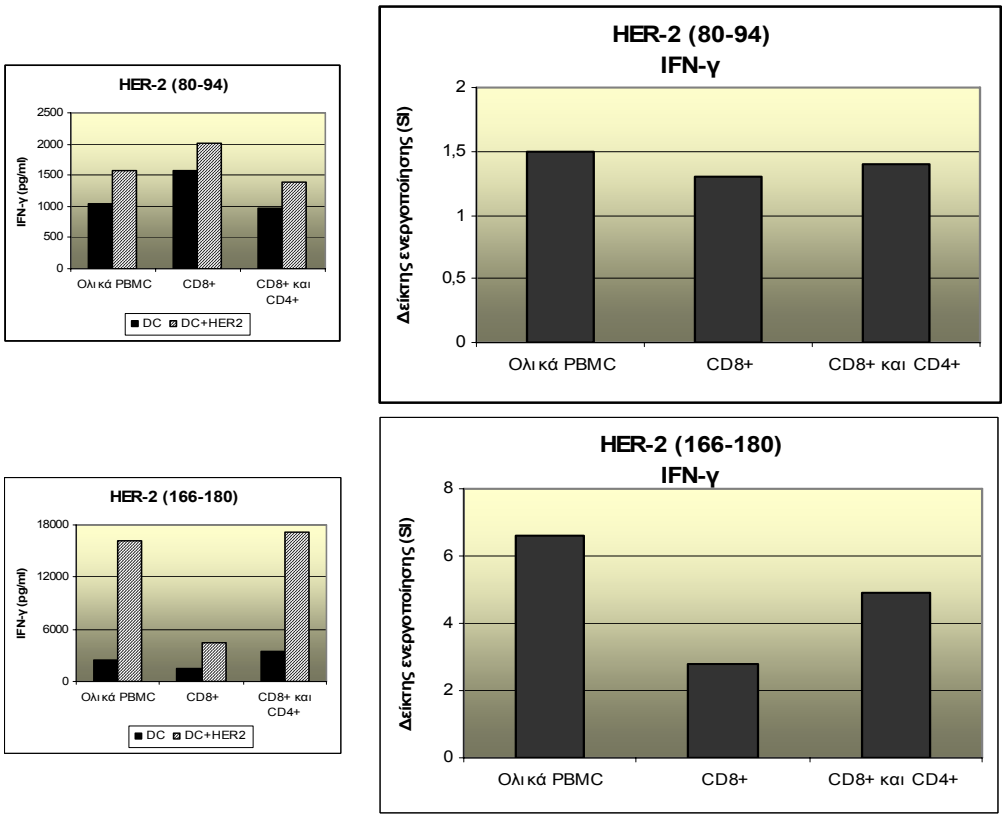
Η παρουσία $CD4^+$ Τ κυττάρων κατά την ευαισθητοποίηση, καθώς και τις επόμενες ενεργοποιήσεις των $CD8^+$ κυττάρων οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας μέχρι και 126%. Επιπλέον, η βιωσιμότητα παρουσιάζεται μεγαλύτερη στις καλλιέργειες που περιέχουν τις ειδικές για το αντίστοιχο πεπτίδιο $CD4^+$ Τ κυτταρικές σειρές σε σχέση με αυτές που ξεκίνησαν με ολικά PBMC, τα οποία περιείχαν αθώα βοηθητικά λεμφοκύτταρα (σχήμα 10.3).



Σχήμα 10.3. Βιωσιμότητα των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων που προκύπτουν από 3 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια από αρχικές καλλιέργειες PBMC, απομονωμένων αθώων $CD8^+$ κυττάρων ή αθώων $CD8^+$ και ειδικών για κάθε πεπτίδιο $CD4^+$ κυττάρων.

Παραγωγή IFN-γ από τα $CD8^+$ κύτταρα κατόπιν της επαγωγής τους με αυτόλογα DC επωασμένα και μη επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο

Η παραγωγή IFN-γ από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα αυξάνεται μέχρι και 236% με την παρουσία βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα η παραγωγή IFN-γ παρουσιάζεται ενισχυμένη στις καλλιέργειες που ξεκίνησαν από ολικό πληθυσμό PBMC. Αυτό το παρατηρούμε συγκρίνοντας για κάθε πεπτίδιο το δείκτη ενεργοποίησης [1.5 έναντι 1.4 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 6.6 έναντι 4.9 για το πεπτίδιο HER-2 (166-180)], όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 10.4.

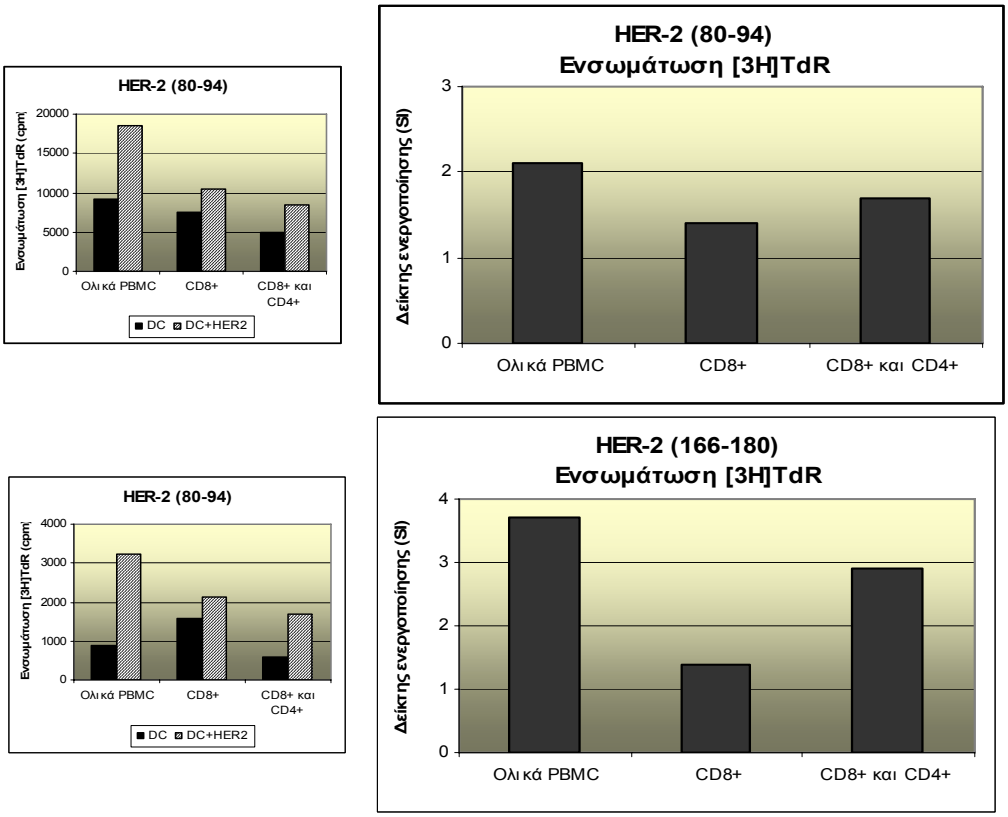


Σχήμα 10.4. Παραγωγή IFN-γ και αντίστοιχοι δείκτες ενεργοποίησης από $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα που προκύπτουν από 3 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια από αρχικές καλλιέργειες PBMC, απομονωμένων αθώων $CD8^+$ κυττάρων ή αθώων $CD8^+$ και ειδικών για κάθε πεπτίδιο $CD4^+$ κυττάρων.

Επαγωγή πολλαπλασιασμού των $CD8^+$ κυττάρων με αυτόλογα DC επωασμένα και μη επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο

Ο πολλαπλασιασμός των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, όταν στην καλλιέργεια περιέχονται και $CD4^+$ Τ κύτταρα, αυξάνεται μέχρι 264%. Η συμπεριφορά των $CD8^+$ Τ κυττάρων ως προς τον πολλαπλασιασμό είναι διαφορετική ανάλογα με την παρουσία ειδικών για το αντίστοιχο πεπτίδιο ή αθώων βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Αυτό φαίνεται από τη σύγκριση του δείκτη ενεργοποίησης [2.1

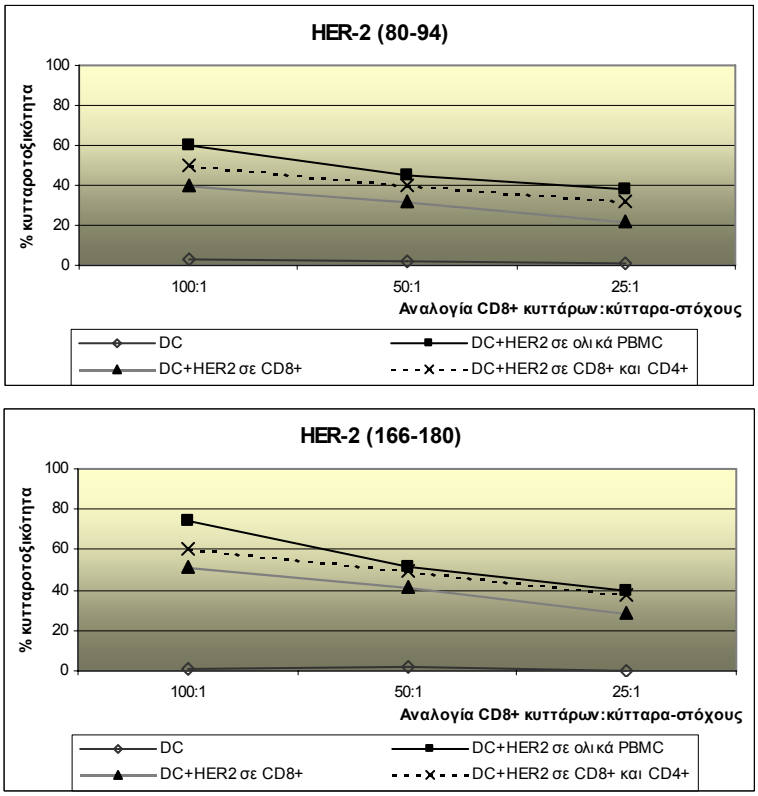
έναντι 1.7 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 3.7 έναντι 2.9 για το πεπτίδιο HER-2 (166-180)], όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 10.5.



Σχήμα 10.5. Ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης και αντίστοιχοι δείκτες ενεργοποίησης από $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα που προκύπτουν από 3 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια από αρχικές καλλιέργειες PBMC, απομονωμένων αθώων $CD8^+$ κυττάρων ή αθώων $CD8^+$ και ειδικών για κάθε πεπτίδιο $CD4^+$ κυττάρων.

Κυτταρολυτική δράση των $CD8^+$ κυττάρων ενάντια σε αυτόλογα DC που φέρουν στην επιφάνειά τους το αντίστοιχο πεπτίδιο

Όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα των CTL παρουσία ή απουσία βοηθητικών Τ κυττάρων, αυτή ακολουθεί το πρότυπο των προηγούμενων διεργασιών και παρουσιάζεται αυξημένη (έως και 173%) παρουσία $CD4^+$ Τ κυττάρων. Όσον αφορά στην παρουσία αθώων ή ειδικών για το πεπτίδιο $CD4^+$ Τ κυττάρων, όπως και στην παραγωγή IFN-γ και τον πολλαπλασιασμό, είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση που ο πληθυσμός εκκίνησης ήταν ολικά PBMC [στην αναλογία $CD8^+$/DC 100:1, 60% έναντι 50% για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 74% έναντι 60% για το πεπτίδιο HER-2 (166-180)], όπως φαίνεται στο σχήμα 10.6.

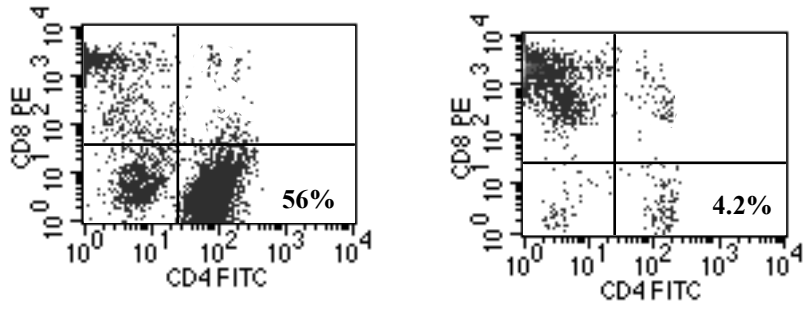


Σχήμα 10.6. Κυτταροτοξική δράση των $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων που προκύπτουν από 3 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με τα αναφερόμενα πεπτίδια από αρχικές καλλιέργειες PBMC, απομονωμένων αθώων $CD8^+$ κυττάρων ή αθώων $CD8^+$ και ειδικών για κάθε πεπτίδιο $CD4^+$ κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, διαπιστώνεται ότι ενώ η βιωσιμότητα παρουσιάζεται αυξημένη κατά την παρουσία των ειδικών κυτταρικών σειρών, οι λειτουργικές απαντήσεις των κυτταροτοξικών κυττάρων παρουσιάζονται ενισχυμένες στις καλλιέργειες που εκκίνησαν από ολικό πληθυσμό PBMC. Η αποτελεσματικότερη ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων παρουσία αθώων $CD4^+$ κυττάρων έναντι ειδικών για το χρησιμοποιούμενο πεπτίδιο $CD4^+$ Τ κυτταρικών σειρών που εντοπίζεται στη συγκεκριμένη μελέτη, θα μπορούσε να αποδοθεί στον μεγαλύτερο αριθμό των βοηθητικών κυττάρων στην πρώτη περίπτωση. Ο μεγαλύτερος αριθμός βοηθητικών κυττάρων διαφοροποιεί την αναλογία $CD4^+$/DC κατά τη διάρκεια των ενεργοποιήσεων, καθώς επίσης και τη συγκέντρωση των παραγόμενων από αυτά κυτταροκινών. Διαφοροποιείται δηλαδή αφενός ο βαθμός αλληλεπίδρασης των $CD4^+$ κυττάρων με τα DC, απαραίτητος για την ενεργοποίηση των τελευταίων και την αποτελεσματική παρουσίαση των πεπτιδίων στα $CD8^+$ κύτταρα, καθώς και το μικροπεριβάλλον της ανοσολογικής δραστηριότητας. Τα ποσοστά των $CD4^+$ Τ κυττάρων μετά τη δεύτερη ενεργοποίηση με το πεπτίδιο HER-2 (80-94) παρουσιάζονται στο σχήμα 10.7, όπου παρατηρείται το

αυξημένο ποσοστό των $CD4^+$ κυττάρων στην καλλιέργεια που άρχισε με ολικά PBMC.

Ολικά PBMC $CD8^+$ και $CD4^+$

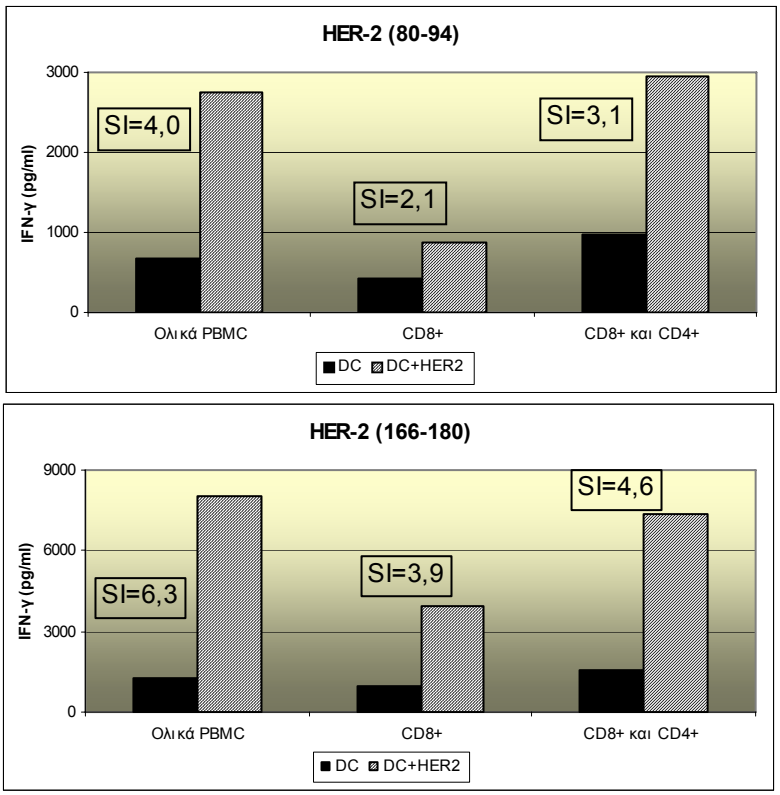


Σχήμα 10.7. Αναλογία $CD4^+$ και $CD8^+$ λεμφοκυττάρων που προκύπτουν μετά από 2 ενεργοποιήσεις με αυτόλογα DC «φορτωμένα» με το πεπτίδιο HER-2 (80-94) από αρχικές καλλιέργειες PBMC, ή αθώων $CD8^+$ και ειδικών για το πεπτίδιο $CD4^+$ κυττάρων.

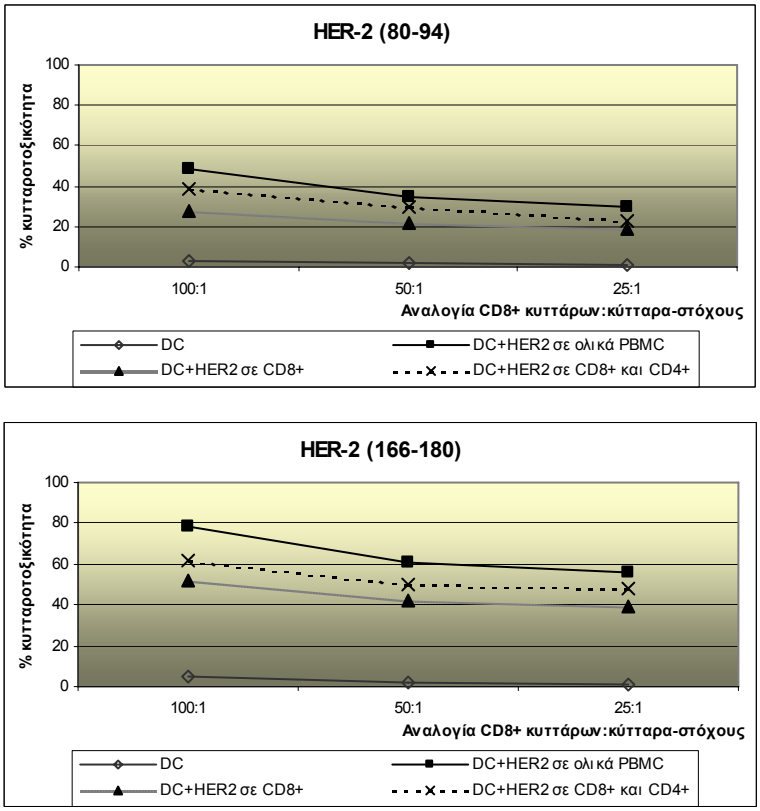
10.3. Ρυθμιστική δράση των $CD4^+$ κυττάρων κατά το μη ειδικό πολλαπλασιασμό των ειδικών για τα πεπτίδια κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων

Για τον έλεγχο της διατήρησης της λειτουργικότητας των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά από μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (διαδικασία απαραίτητη για την απόκτηση μεγάλου αριθμού κυττάρων, ώστε να έχουν τη δυνατότητα πιθανής χρήσης σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα), μετά την τέταρτη ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με αυτόλογα DC, επήχθη μη ειδικός για αντιγόνο πολλαπλασιασμός με την επίδραση PHA.

Μετά από χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων και εφόσον ο πληθυσμός των κυττάρων είχε παρουσιάσει αύξηση τουλάχιστον 20 φορές, έγινε επανέλεγχος της ικανότητας παραγωγής κυτταροκινών και της κυτταρολυτικής δράσης σε απάντηση στην επίδραση αυτόλογων DC επωασμένων με το αντίστοιχο πεπτίδιο. Για τις δοκιμασίες που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός απομονωμένων $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων από τις αντίστοιχες καλλιέργειες με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα σχήματα 10.8 και 10.9.



Σχήμα 10.8. Παραγωγή IFN-γ από τα $CD8^+$ λεμφοκύτταρα κατόπιν της επαγωγής τους με αυτόλογα DC επωασμένα και μη επωασμένα με το αντίστοιχο πεπτίδιο



Σχήμα 10.9. Κυτταρολυτική δράση των $CD8^+$ λεμφοκυττάρων ενάντια σε αυτόλογα DC που φέρουν στην επιφάνειά τους το αντίστοιχο πεπτίδιο

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ρυθμιστική δράση των $CD4^+$ Τ κυττάρων διατηρείται κατά την περίοδο του μη ειδικού πολλαπλασιασμού των $CD8^+$ λεμφοκυττάρων. Παρουσία των $CD4^+$ κυττάρων, τα κυτταροτοξικά κύτταρα παρήγαγαν μεγαλύτερα ποσά IFN-γ και είχαν αυξημένη ικανότητα κυτταρολυτικής δράσης, όπως φαίνεται από τη σύγκριση του δείκτη ενεργοποίησης για την παραγωγή IFN-γ [4.0 και 3.1, αντίστοιχα για την προσθήκη αθώων και ειδικών για το πεπτίδιο $CD4^+$ Τ κυττάρων, έναντι 2.1 για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 6.3 και 4.6 έναντι 3.9 για το πεπτίδιο HER-2 (166-180)], καθώς και των ποσοστών κυτταροτοξικότητας [στην αναλογία $CD8^+$/DC 100:1, 49% και 35% έναντι 30% για το πεπτίδιο HER-2 (80-94) και 78% και 61% έναντι 56% για το πεπτίδιο HER-2 (166-180)]. Επίσης, η διαφορά της λειτουργικότητας των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων ανάμεσα στην καλλιέργεια που προήλθε από τον ολικό πληθυσμό PBMC και αυτής που προήλθε από την ανάμιξη $CD8^+$ λεμφοκυττάρων και κυττάρων ειδικής για το αντίστοιχο πεπτίδιο σειράς $CD4^+$ Τ κυττάρων ακολουθεί το πρότυπο που παρατηρήθηκε στην προηγούμενη ενότητα για την ευαισθητοποίηση και ενεργοποίηση των $CD8^+$ κυττάρων.

Σημαντική δυσκολία στο χειρισμό των καλλιεργειών με μεικτούς πληθυσμούς $CD4^+$ και $CD8^+$ κυττάρων κατά το μη ειδικό πολλαπλασιασμό τους με PHA, αποτελεί ο μεγαλύτερος ρυθμός πολλαπλασιασμού των βοηθητικών λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την ανάγκη πραγματοποίησης μεγάλης κλίμακας καλλιεργειών για την απομόνωση ικανού αριθμού $CD8^+$ Τ κυττάρων.

11. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ CD8$^+$ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΗΣ ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HER-2/neu ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ

11.1 Συλλογή και ταξινόμηση δειγμάτων από ασθενείς με επιθηλιακούς όγκους θετικούς και αρνητικούς για την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu

Από τους ασθενείς που πήραν μέρος στη μελέτη αυτή, έγινε λήψη περιφερικού αίματος και απομονώθηκαν τα PBMC, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συχνοτήτων των ειδικών CTL για συγκεκριμένα πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu. Από τα PBMC έγινε επίσης διαφοροποίηση σε DC που χρησιμοποιήθηκαν ως APC, καθώς και τυποποίηση των αντιγόνων HLA (για όλες τις διαδικασίες βλέπε «Υλικά και μέθοδοι»). Από τους ίδιους ασθενείς έγινε λήψη ασκητικού ή πλευριτικού υγρού ή τμήματος όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επιφανειακής έκφρασης της πρωτεΐνης HER-2/neu, καθώς και ως APC, όπου απαιτήθηκε. Ο μέσος χρόνος από την τελευταία χημειοθεραπεία των ασθενών ήταν 6 μήνες.

Αρχικά, τα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν εξετάσθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την επιφανειακή έκφραση HER-2/neu. Προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά τα επίπεδα έκφρασης της HER-2/neu στις κυτταρικές σειρές SKBR-3, MCF-7 και MDA-231. Υψηλή (+++) θεωρήθηκε η έκφραση HER-2/neu, όταν η μέση ένταση φθορισμού (MFI) ήταν στα επίπεδα της έκφρασης στην επιφάνεια των κυττάρων SKBR-3, μέση (++) στα επίπεδα των MCF-7 και χαμηλή (+) στα επίπεδα των MDA-231. Με βάση την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$.

Στη συνέχεια έγινε τυποποίηση των αντιγόνων HLA-A και οι ασθενείς χωρίστηκαν περαιτέρω σε HLA-A2, HLA-A3 και HLA-A26, ομόζυγους ή ετερόζυγους. Οι ασθενείς που δεν ενέπιπταν σε κάποια από τις πιο πάνω κατηγορίες δεν κατέστη εφικτό να οργανωθούν σε ομάδες με αριθμό ατόμων που δύναται να δώσει στατιστικά επεξεργάσιμα αποτελέσματα και συνεπώς δε χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή.

Με βάση τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$, HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^-$, HLA-A3$^+$ HER-2/neu$^+$, HLA-A3$^+$ HER-

2/neu$^-$, HLA-A26$^+$ HER-2/neu$^+$ και HLA-A26$^+$ HER-2/neu$^-$. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στους πίνακες 11.1 έως 11.6.

Πίνακας 11. 1. Ασθενείς HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$

Αύξων αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος καρκίνου	Στάδιο	HLA-A	Έκφραση HER-2/neu
1	57	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	+
2	56	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A2	++
3	63	Α	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	+
4	79	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	+++
5	55	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	+± [β]
6	45	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2, -A3	++
7[α]	47	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	+
8	58	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	++±
9	69	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	++
10	72	Α	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	+
11	64	Α	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	++
12	55	Θ	Μαστού	II	HLA-A2	++
13	50	Θ	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	+
14	38	Θ	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	++±
15	45	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	+±
16	44	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A2	++
17	62	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	+
18	53	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	++
19	75	Α	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	+++
20	65	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	++
21[α]	47	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	+
22	56	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	+
23[α]	39	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	++±
24	45	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	+++
25	32	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A2	+++
26	75	Α	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	++
27	65	Α	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	+
28	52	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	++
29[α]	57	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	++±
30	39	Α	Πνεύμονα	III	HLA-A2	++
31	47	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	+±
32	46	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	+±
33	52	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	++
34	73	Α	Πνεύμονα	III	HLA-A2	+++
35	60	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	++
36	54	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	++
37	72	Θ	Πνεύμονα	III	HLA-A2	+++
38	51	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	+
39[α]	37	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	++
40	59	Θ	Πνεύμονα	III	HLA-A2	+±
41	45	Α	Παχ.εντέρου	IV	HLA-A2	++
42	70	Θ	Παχ.εντέρου	IV	HLA-A2	+++
43	63	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	++
44	52	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	++±
45	57	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A2	+±
46	79	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	++
47	72	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	+++
48	53	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	+±

[α] Ασθενής ομόζυγος για το συγκεκριμένο αλλήλιο MHC

[β] Το σύμβολο ± τοποθετείται όπου η MFI των καρκινικών κυττάρων ήταν ανάμεσα στις MFI των χρησιμοποιούμενων για τον καθορισμό των επιπέδων έκφρασης της HER-2/neu κυτταρικών σειρών

Πίνακας 11.2. Ασθενείς HLA-A2^{+} HER-2/neu^{-}

Αύξων αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος καρκίνου	Στάδιο	HLA-A	Έκφραση HER-2/neu
1	57	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
2	73	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2, -A3	-
3	63	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
4	72	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
5	55	Α	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	-
6	39	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A2	-
7	64	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	-
8	54	Α	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	-
9	57	Θ	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	-
10	65	Α	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	-
11	75	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
12	63	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	-
13	57	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
14	48	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	-
15^{α}	75	Α	Πνεύμονα	III	HLA-A2	-
16	63	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	-
17^{α}	79	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
18	37	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	-
19	45	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	-
20	59	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	-
21	49	Α	Παχ.εντέρου	III	HLA-A2	-
22	62	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A2	-
23	73	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
24	60	Α	Πνεύμονα	III	HLA-A2	-
25	35	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	-
26	42	Α	Colorectal	IV	HLA-A2	-
27	70	Θ	Μαστού	III	HLA-A2	-
28	62	Α	Προστάτη	IV	HLA-A2	-
29^{α}	63	Θ	Πνεύμονα	IV	HLA-A2	-
30	48	Θ	Πνεύμονα	III	HLA-A2	-
31	52	Θ	Μαστού	IV	HLA-A2	-
32^{α}	57	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A2	-
33	64	F	Ωοθηκών	III	HLA-A2	-

^{α} Ασθενής ομόζυγος για το συγκεκριμένο αλλήλιο MHC

Πίνακας 11.3. Ασθενείς HLA-A3^{+} HER-2/neu^{+}

Αύξων αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος καρκίνου	Στάδιο	HLA-A	Έκφραση HER-2/neu
1	57	Θ	Μαστού	III	HLA-A3, -A26	+++
2^{α}	62	Θ	Μαστού	IV	HLA-A3	++
3	75	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A3	++
4	67	Α	Πνεύμονα	IV	HLA-A3	+±
5	59	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A3	++
6	39	Θ	Πνεύμονα	IV	HLA-A3, A26	+
7	62	Α	Προστάτη	IV	HLA-A3	+
8	75	Θ	Μαστού	III	HLA-A3	+++
9	68	Θ	Μαστού	III	HLA-A3	+±
10 (Νο6 σε πιν.1)	45	Θ	Μαστού	IV	HLA-A3, -A2	++

^{α} Ασθενής ομόζυγος για το συγκεκριμένο αλλήλιο MHC

Πίνακας 11.4. Ασθενείς HLA-A3^{+} HER-2/neu^{-}

Αύξων αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος καρκίνου	Στάδιο	HLA-A	Έκφραση HER-2/neu
1	72	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A3	-
2	57	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A3	-
3	59	Θ	Μαστού	III	HLA-A3	-
4	65	Α	Πνεύμονα	III	HLA-A3	-
5	47	Α	Προστάτη	III	HLA-A3	-
6	59	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A3	-
7	75	Θ	Μαστού	III	HLA-A3	-
8 (No2 σε πιν.2)	73	Θ	Μαστού	IV	HLA-A3, -A2	-

Πίνακας 11.5. Ασθενείς HLA-A26^{+} HER-2/neu^{+}

Αύξων αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος καρκίνου	Στάδιο	HLA-A	Έκφραση HER-2/neu
1[α]	62	Θ	Μαστού	IV	HLA-A26	++
2	79	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A26	+±
3	78	Θ	Ωοθηκών	IV	HLA-A26	++
4	65	Α	Πνεύμονα	III	HLA-A26	++±
5	47	Α	Παχ.εντέρου	III	HLA-A26	+
6	49	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A26	++
7	57	Θ	Μαστού	IV	HLA-A26	+++
8 (No1 σε πιν. 3)	57	Θ	Μαστού	III	HLA-A3, -A26	+++
9 (No.6 σε πιν.3)	39	Θ	Πνεύμονα	IV	HLA-A3, A26	+

[α] Ασθενής ομόζυγος για το συγκεκριμένο αλλήλιο MHC

Πίνακας11. 6. Ασθενείς HLA-A26^{+} HER-2/neu^{-}

Αύξων αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Φύλο	Τύπος καρκίνου	Στάδιο	HLA-A	Έκφραση HER-2/neu
1	69	Θ	Μαστού	IV	HLA-A26	-
2	75	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A26	-
3	73	Θ	Ωοθηκών	III	HLA-A26	-
4	59	Θ	Μαστού	IV	HLA-A26	-
5	38	Μ	Προστάτη	IV	HLA-A26	-
6	39	Μ	Πνεύμονα	III	HLA-A26	-
7	67	Μ	Παχ.εντέρου	III	HLA-A26	-

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν PBMC υγιών αιμοδοτών ως δείγματα ελέγχου. Τα χαρακτηριστικά αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 11.7.

Πίνακας 11.7. Υγιείς δότες

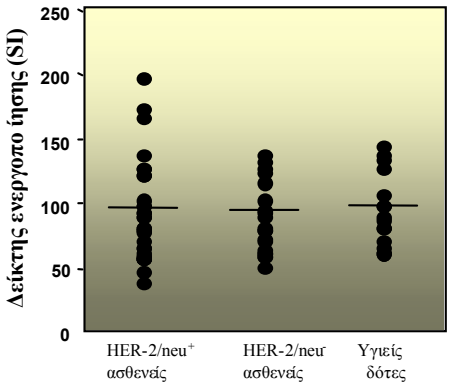
Αύξων αριθμός δότη	Ηλικία	Φύλο	HLA-A
1	45	Θ	HLA-A2
2	51	Θ	HLA-A2
3	27	Α	HLA-A2
4	35	Α	HLA-A2
5	49	Θ	HLA-A2
6	56	Θ	HLA-A2
7	67	Α	HLA-A2
8	26	Θ	HLA-A2
9	32	Θ	HLA-A2
10	46	Α	HLA-A2
11	47	Θ	HLA-A2
12	62	Θ	HLA-A2
13	61	Α	HLA-A2
14	55	Θ	HLA-A2
15	58	Θ	HLA-A2
16	32	Θ	HLA-A3
17	29	Α	HLA-A3
18	34	Α	HLA-A3
19	50	Α	HLA-A3
20	48	Θ	HLA-A3
21	28	Θ	HLA-A3
22	24	Α	HLA-A3
23	31	Θ	HLA-A26
24	38	Α	HLA-A26
25	37	Θ	HLA-A26
26	42	Α	HLA-A26
27	48	Θ	HLA-A26
28	46	Α	HLA-A26
29	38	Α	HLA-A26

11.2. Υπολογισμός της συχνότητας CTL ειδικών για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu σε ασθενείς με επιθηλιακούς τύπους καρκίνου και σε υγιείς δότες.

Η απάντηση των λεμφοκυττάρων των ασθενών και των υγιών δοτών σε όλες τις δοκιμασίες της ενότητας αυτής έγιναν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISPOT. Η επιλογή της μεθόδου αυτής έγινε λόγω (i) της υψηλής ευαισθησίας της, δεδομένου ότι οι συχνότητες που αναμένονται είναι πολύ μικρές, (ii) της ιδιότητάς της να ανιχνεύει λειτουργικά κύτταρα, δεδομένου ότι συχνά αναφέρονται στην περιοχή του όγκου ειδικά Τ κύτταρα τα οποία όμως είναι ανεργικά και (iii) λόγω του γεγονότος ότι δύναται να εφαρμοστεί σε μικρό αριθμό κυττάρων, δεδομένου ότι συχνά οι ασθενείς με καρκίνο παρουσιάζουν χαμηλές συγκεντρώσεις λευκών αιμοσφαιρίων.

Αρχικά εξετάσθηκε η ικανότητα των λεμφοκυττάρων των ασθενών να αντιδρούν σε σήματα ενεργοποίησης (immunocompetence), ώστε να αποκλειστεί πιθανό ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα λόγω ανέργειας. Ο έλεγχος αυτός

πραγματοποιήθηκε με τη μη ειδική διέγερση των λεμφοκυττάρων με PHA και τη σύγκριση των απαντήσεων με την αντίδραση των κυττάρων των υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 11.1, όπου παρατηρούμε ότι οι μέσες τιμές του δείκτη ενεργοποίησης για τις τρεις ομάδες δεν διαφέρουν σημαντικά (p=0.1).



Σχήμα 11.1. Δείκτης ενεργοποίησης των PBMC ασθενών με HER-2/neu^{+} και HER-2/neu^{-} όγκους και υγιών ατόμων μετά από μη ειδική διέγερση με PHA με τη χρήση της δοκιμασίας ELISPOT.

Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών και των υγιών δοτών ο αριθμός των ειδικών λεμφοκυτταρικών κλώνων για τα πεπτίδια HER-2 (369-377), (435-443), (665-673), (689-697), (777-785) και (952-960). Τα πεπτίδια HER-2 (369-377), HER-2 (435-443), HER-2 (665-673), HER-2 (689-697) και HER-2 (952-960) είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία για την ικανότητα σύνδεσής τους με το μόριο HLA-A2 και την επαγωγή ανοσολογικής αντίδρασης. Επιπρόσθετα, το πεπτίδιο HER-2 (369-377) εμπεριέχεται στην αλληλουχία πεπτιδίου που έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινική δοκιμή εμβολίων για τον καρκίνο [Knutson et al, 2001]. Το πεπτίδιο HER-2 (777-785) είναι ένα νέο πεπτίδιο που περιέχει περιοχές πρόσδεσης στο μόριο HLA-A2. Η αναζήτηση συνεπώς ειδικών λεμφοκυτταρικών κλώνων για τα πεπτίδια αυτά σε ασθενείς με καρκίνο δύναται να συμβάλει στην επιλογή των κατάλληλων πεπτιδίων για συμμετοχή σε πρωτόκολλα εμβολιασμού.

Για την αναζήτηση των συχνοτήτων των ειδικών CTL για τα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια, τα PBMC των ασθενών και των υγιών δοτών διαμοιράστηκαν 500.000/θέση μικροπλάκας σε μικροπλάκες 96 θέσεων επίπεδου πυθμένα. Για κάθε πεπτίδιο χρησιμοποιήθηκε μία τετράδα θέσεων της μικροπλάκας, στην οποία προστέθηκαν 50.000 DC επωασμένα με 50 μg/ml του αντίστοιχου πεπτιδίου, σε βασικό θρεπτικό υλικό. Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες με «μη φορτωμένα» DC, ενώ ως θετικά δείγματα

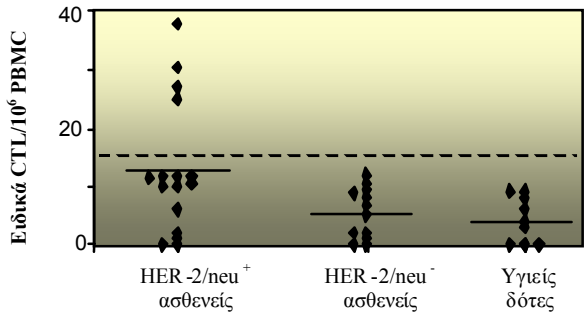
ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μικροκαλλιέργειες με την προσθήκη 5 μg/ml PHA στο θρεπτικό υλικό. Την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας αφαιρέθηκαν 100 μl υπερκειμένου ανά θέση μικροπλάκας και προστέθηκε ίσος όγκου βασικού θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες επανενεργοποιήθηκαν την έβδομη μέρα με την ίδια διαδικασία όπως στην πρώτη ενεργοποίηση και 24 ώρες μετά μεταφέρθηκαν σε μικροπλάκες ELISPOT της εταιρίας Biosource όπου υπολογίσθηκε ο αριθμός των κυττάρων που παρήγαγαν IFN-γ (βλέπε «Υλικά και μέθοδοι»).

Ο αριθμός των ειδικών για το κάθε πεπτίδιο CTL, υπολογίσθηκε αφαιρώντας το μέσο αριθμό κηλίδων των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (θέσεις με μη «φορτωμένα» DC) συν 2 φορές την τυπική απόκλιση αυτού από το μέσο αριθμό των κηλίδων που μετρήθηκαν στο κάθε δείγμα (θέσεις με DC «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο). Ο αριθμός των ειδικών για κάθε πεπτίδιο CTL εκφράστηκε σε αριθμό κυττάρων ανά 10^6 PBMC. Ως ασθενείς με θετική συχνότητα για ένα πεπτίδιο, θεωρήσαμε τους HER-2/neu$^+$ ασθενείς των οποίων η συχνότητά για το πεπτίδιο αυτό ήταν μεγαλύτερη της μέσης συχνότητας των HER-2/neu$^-$ ασθενών και των υγιών δοτών για το συγκεκριμένο πεπτίδιο συν δύο φορές την τυπική απόκλιση αυτής.

Λόγω περιορισμού του αριθμού των κυττάρων, μόνο για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) μελετήθηκαν οι συχνότητες σε όλες τις ομάδες ασθενών. Για τα υπόλοιπα πεπτίδια, στη στατιστική μελέτη ήταν δυνατό να συμπεριλάβουμε μόνο τους HLA-A2$^+$ ασθενείς,

Πεπτίδιο HER-2 (369-377)

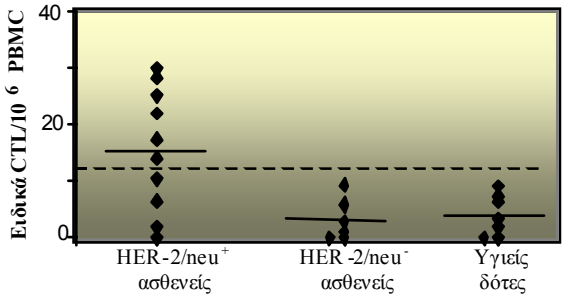
Για την ανίχνευση των συχνοτήτων του πεπτιδίου αυτού σε άτομα HLA-A2$^+$, χρησιμοποιήθηκαν PBMC από τους HER-2/neu$^+$ ασθενείς με αύξοντα αριθμό 1-16 του πίνακα 11.1, τους HER-2/neu$^-$ ασθενείς με αύξοντα αριθμό 1-12 του πίνακα 11.2 και τους υγιείς δότες 1-10 του πίνακα 11.7. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα του σχήματος 11.2.



Σχήμα 11.2. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A2$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες. Με διακεκομμένη γραμμή σημειώνεται η ελάχιστη συχνότητα ειδικών Τ κυττάρων για να θεωρηθεί ένας δότης ότι δίνει θετική απάντηση, ενώ με συνεχείς γραμμές σημειώνεται η μέση τιμή των συχνοτήτων ανά ομάδα αιμοδοτών

Στο διάγραμμα παρατηρήθηκε ότι 4 στους 16, δηλαδή το 25% των μελετούμενων HER-2/neu$^+$ ασθενών παρουσιάζουν CTL ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) και μάλιστα με συχνότητες 25.1-37.7 κύτταρα ανά 10^6 PBMC. Η μέση συχνότητα εμφάνισης ειδικών για το πεπτίδιο Τ κυττάρων στους ασθενείς αυτούς είναι $30/10^6$ PBMC, η οποία παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.001$) από τη μέση συχνότητα των υπόλοιπων HER-2/neu$^+$ ασθενών ($7.1/10^6$ PBMC), των HER-2/neu$^-$ ασθενών ($5.5/10^6$ PBMC) και των υγιών δοτών ($4.8/10^6$ PBMC).

Όσον αφορά στα HLA-A3$^+$ άτομα (HER-2/neu$^+$ ασθενείς: 1-9 στον πίνακα 11.3, HER-2/neu$^-$ ασθενείς: 1-7 στον πίνακα 11.4 και υγιείς δότες: 16-22 στον πίνακα 11.7), τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με όμοιο τρόπο στο σχήμα 11.3.

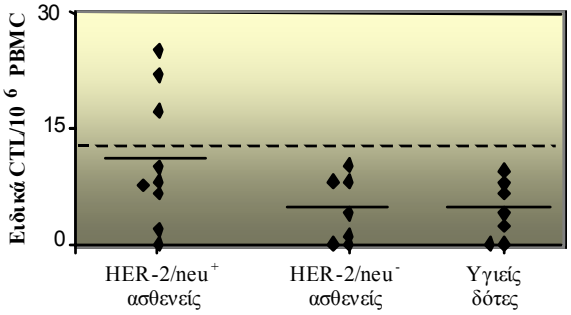


Σχήμα 11.3. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A3$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

Η πλειονότητα των HER-2/neu$^+$ HLA-A3$^+$ ασθενών παρουσιάζει προϋπάρχουσα κυτταρική ανοσία ενάντια στο πεπτίδιο HER-2 (369-377). Όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω διάγραμμα, 6 στους 10 HER-2/neu$^+$ HLA-A3$^+$ ασθενείς

εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα ειδικών CTL για το συγκεκριμένο πεπτίδιο, με συχνότητες που κυμαίνονται από 13.9 έως 29.9 ειδικά κύτταρα ανά 10^6 PBMC. Διαπιστώθηκε ότι η μέση συχνότητα των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL στους αντιδρώντες HER-2/neu$^+$ ασθενείς είναι 22.7/10^6 PBMC, η διαφορά της οποίας, σε σχέση με τη μέση τιμή των συχνοτήτων των μη αντιδρώντων HER-2/neu$^+$ ασθενών, των HER-2/neu$^-$ ασθενών και των υγιών δοτών (4.7/10^6 PBMC, 4.5/10^6 PBMC και 4.1/10^6 PBMC αντίστοιχα), είναι στατιστικά σημαντική ($p<0.001$).

Τέλος, οι συχνότητες των ειδικών CTL κυττάρων για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) στους HLA-A26$^+$ δότες (HER-2/neu$^+$ ασθενείς: 1-9 στον πίνακα 11.5, HER-2/neu$^-$ ασθενείς: 1-7 στον πίνακα 11.6 και υγιείς δότες: 23-29 στον πίνακα 11.7), παρουσιάζεται στο διάγραμμα του σχήματος 11.4.



Σχήμα 11.4. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A26$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

Το διάγραμμα δείχνει ότι το 30% των HLA-A26$^+$ ασθενών που υπερεκφράζουν την ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu εμφανίζουν αυξημένες συχνότητες CTL για το πεπτίδιο HER-2 (369-377). Οι συχνότητες εμφάνισης των ειδικών για το συγκεκριμένο πεπτίδιο Τ κυτταροτοξικών κυττάρων κυμαίνεται από 16.3 έως 25.1 ανά 10^6 PBMC. Η μέση τιμή των συχνοτήτων των ειδικών για το πεπτίδιο CTL αυτών των HER-2/neu$^+$ ασθενών είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p<0.001$) από τις μέσες τιμές των συχνοτήτων των υπόλοιπων HER-2/neu$^+$ ασθενών, των HER-2/neu$^-$ ασθενών και των υγιών δοτών (21.4 κύτταρα ανά 10^6 PBMC, 5.7/10^6 PBMC, 4.5/10^6 PBMC και 4.4/10^6 PBMC αντίστοιχα).

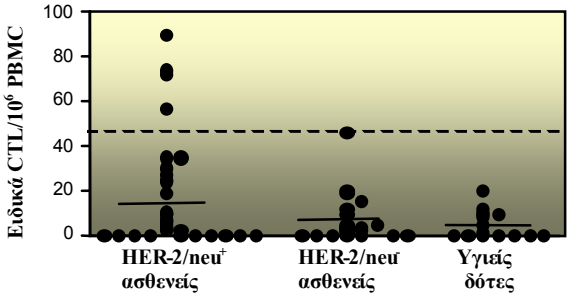
Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις μέσες τιμές των συχνοτήτων των ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL στο σύνολο των HER-2/neu$^+$ ασθενών, σε σχέση

με τους HER-2/neu$^-$ ασθενείς της αντίστοιχης ομάδας, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντικές διαφορές: $p<0.05$ για τους HLA-A2$^+$ ασθενείς, $p<0.01$ για τους HLA-A3$^+$ ασθενείς και $p<0.05$ για τις ομάδες των HLA-A26$^+$ ασθενών.

Για την ανίχνευση των συχνοτήτων των υπόλοιπων πεπτιδίων, χρησιμοποιήθηκαν PBMC από τους HER-2/neu$^+$ ασθενείς 17-48 του πίνακα 11.1, τους HER-2/neu$^-$ ασθενείς 13-33 του πίνακα 11.2 και τους υγιείς δότες 1-15 του πίνακα 11.7. Όπως δηλαδή προαναφέρθηκε, για τα υπόλοιπα πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν μόνο HLA-A2$^+$ αιμοδότες, για να υπάρχει δυνατότητα στατιστικής μελέτης, λόγω περιορισμένου αριθμού απομονούμενων PBMC από το περιφερικό αίμα των ασθενών.

Πεπτίδιο HER-2 (435-443)

Σχετικά με το συγκεκριμένο πεπτίδιο, οι συχνότητες των ειδικών CTL κυττάρων στους HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενείς με θετικές συχνότητες κυμαίνονται από 57/10^6 PBMC έως 90/10^6 PBMC και αντιστοιχούν σε 4 από τους 32 ασθενείς που ελέγχθηκαν (ποσοστό 12.5%). Η μέση τιμή των συχνοτήτων στους ασθενείς αυτούς (73.3/10^6 PBMC), διαφέρει σημαντικά από τις μέσες τιμές των συχνοτήτων των μη αντιδρώντων HER-2/neu$^+$ ασθενών (9.3/10^6 PBMC), των HER-2/neu$^-$ ασθενών (5.9/10^6 PBMC) και των υγιών δοτών (5.0/10^6 PBMC). Για όλες αυτές τις διαφορές έχουμε $p<0.001$. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο σχήμα 11.5.

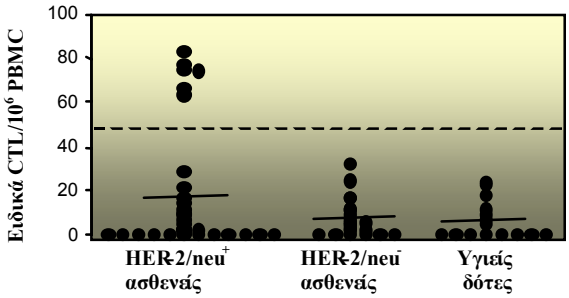


Σχήμα 11.5. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (435-443) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A2$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

Πεπτίδιο HER-2 (665-673)

Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (665-673) CTL ανιχνεύθηκαν σε 6 από τους 32 HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενείς που μελετήθηκαν, ποσοστό που αντιστοιχεί στο

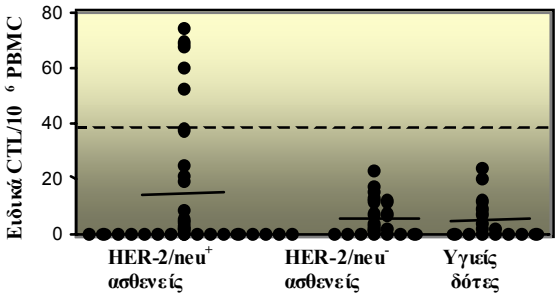
18.8%. Οι συχνότητες των ειδικών για το συγκεκριμένο πεπτίδιο CTL στους ασθενείς αυτούς κυμαίνονταν από 64/10^6 PBMC έως 83.7/10^6 PBMC με μέση τιμή 73.8/10^6 PBMC. Η διαφορά της μέσης τιμής των συχνοτήτων στους ασθενείς αυτούς ήταν στατιστικά σημαντική ($p<0.001$) από τη μέση τιμή των HER-2/neu$^+$ ασθενών με συχνότητες στο αρνητικό επίπεδο (5.3/10^6 PBMC), των HER-2/neu$^-$ ασθενών (7.6/10^6 PBMC) και των υγιών δοτών (6.5/10^6 PBMC). Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στο διάγραμμα του σχήματος 11.6.



Σχήμα 11.6. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (3665-673) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A2$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

Πεπτίδιο HER-2 (689-697)

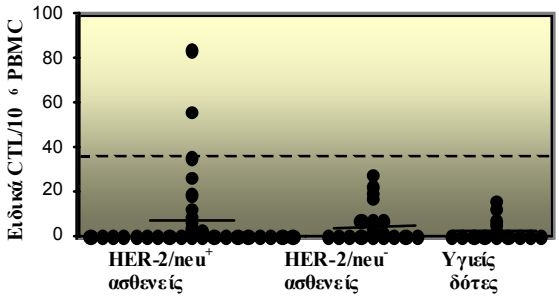
Το 15.6% των HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$ μελετούμενων ασθενών (5 στους 32), εμφάνιζε ειδικά CTL για το πεπτίδιο HER-2 (689-697). Οι συχνότητες αυτών ήταν 52/10^6 PBMC ως 74.3/10^6 PBMC. Η μέση τιμή των ειδικών για το συγκεκριμένο πεπτίδιο CTL στους ασθενείς αυτούς ήταν 64.5/10^6 PBMC. Η διαφορά της από τη μέση τιμή των μη αντιδρώντων HER-2/neu$^+$ ασθενών, των HER-2/neu$^-$ ασθενών και των υγιών δοτών παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική ($p<0.001$, με τιμές 4.7/10^6 PBMC, 5.7/10^6 PBMC και 5.3/10^6 PBMC αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στο διάγραμμα του σχήματος 11.7.



Σχήμα 11.7. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (689-697) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A2$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

Πεπτίδιο HER-2 (777-795)

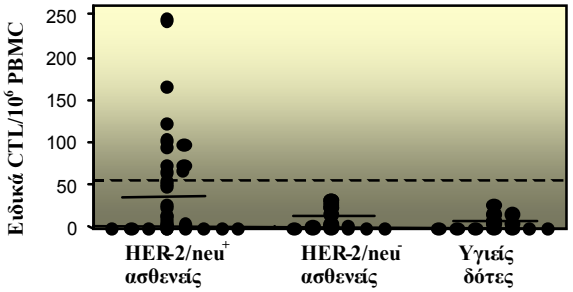
Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα πεπτίδια, για το πεπτίδιο HER-2 (777-795), μόνο το 6.3% των HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενών εμφανίζει θετική συχνότητα (57.1/10^6 PBMC και 83.7/10^6 PBMC), με μέση τιμή 70.4/10^6 PBMC. Η διαφορά της μέσης τιμής των συχνοτήτων σε αυτούς τους ασθενείς από τις μέσες τιμές των συχνοτήτων στις υπόλοιπες ομάδες (3.8/10^6 PBMC για τους υπόλοιπους HER-2/neu$^+$ ασθενείς, 5.7/10^6 PBMC για τους HER-2/neu$^-$ ασθενείς και 2.9/10^6 PBMC για τους υγιείς δότες) εμφανίζει p<0.001. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στο σχήμα 11.8.



Σχήμα 11.8. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (777-795) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A2$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

Πεπτίδιο HER-2 (952-960)

Για το πεπτίδιο HER-2 (952-960), ανιχνεύθηκαν 10 HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενείς, από τους 32 που μελετήθηκαν (ποσοστό 31.3%) με θετικές συχνότητες ειδικών CTL. Οι τιμές των συχνοτήτων κυμαίνονταν από 55/10^6 PBMC έως 244.4/10^6 PBMC, με μέση τιμή 107.3/10^6 PBMC. Η μέση τιμή αυτών διαφέρει σημαντικά (p<0.001) από τη μέση τιμή των συχνοτήτων στους υπόλοιπους HER-2/neu$^+$ ασθενείς (9.5/10^6), τους HER-2/neu$^-$ ασθενείς (10.2/10^6) και τους υγιείς δότες (6.5/10^6). Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στο σχήμα 11.9 .



Σχήμα 11.9. Ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (952-960) CTL ανά 10^6 PBMC σε HLA-A2$^+$ ασθενείς με HER-2/neu$^+$ και HER-2/neu$^-$ όγκους και σε υγιείς δότες.

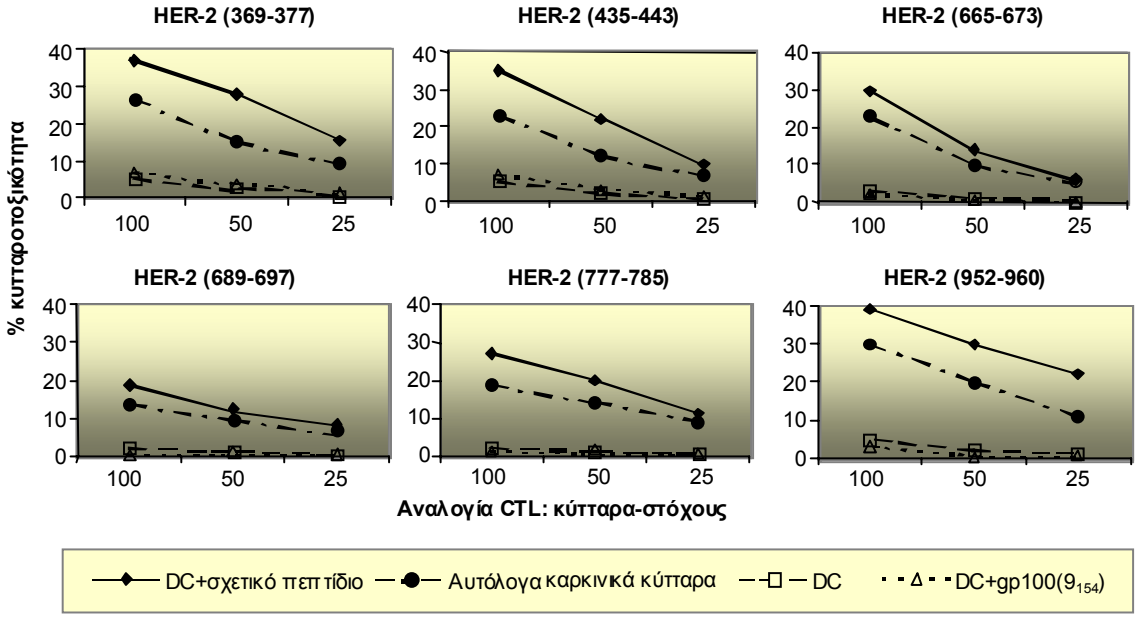
Επίσης για τα πεπτίδια HER-2 (435-443), (665-673), (689-697) και (952-960), η μέση τιμή των συχνοτήτων των ειδικών για κάθε πεπτίδιο CTL στο σύνολο των HER-2/neu$^+$ ασθενών (17.3/10^6 PBMC, 18.1/10^6 PBMC, 14.0/10^6 PBMC και 40,05/10^6 PBMC αντίστοιχα), διαφέρει σημαντικά από τη μέση τιμή που παρατηρείται στους HER-2/neu$^-$ ασθενείς και τους υγιείς δότες. Εξαίρεση αποτελεί το πεπτίδιο HER-2 (777-795) στο οποίο δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.5$) ανάμεσα στις διάφορες ομάδες αιμοδοτών (7.7/10^6 PBMC η μέση τιμή για τους HER-2/neu$^+$ ασθενείς). Εξάλλου, για όλα τα πεπτίδια [συμπεριλαμβανομένου και του HER-2 (777-795)] δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στη μέση τιμή των συχνοτήτων στους HER-2/neu$^-$ ασθενείς και τους υγιείς δότες,

11.3. Συσχέτιση των αυξημένων συχνοτήτων CTL ειδικών για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu με την ικανότητα κυτταροτοξικής δράσης ενάντια στον αυτόλογο όγκο.

Κατόπιν την αναζήτησης της παρουσίας ειδικών CTL για κάθε πεπτίδιο της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu στο περιφερικό αίμα των ασθενών, εξετάσθηκε αν τα κύτταρα αυτά, εκτός από την παραγωγή IFN-γ, παρουσιάζουν και κυτταροτοξική δράση ενάντια σε αυτόλογα DC «φορτωμένα» με το αντίστοιχο πεπτίδιο, καθώς και ενάντια στα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα. Δεδομένου του μεγάλου αριθμού κυττάρων που απαιτούνται για τη διαδικασία ανίχνευσης κυτταροτοξικής δράσης μέσω της μεθόδου απελευθέρωσης ^{51}Cr, η παρούσα μελέτη έγινε μόνο για περιορισμένο αριθμό ασθενών, από το αίμα των οποίων κατέστη δυνατή η απομόνωση ικανού αριθμού PBMC.

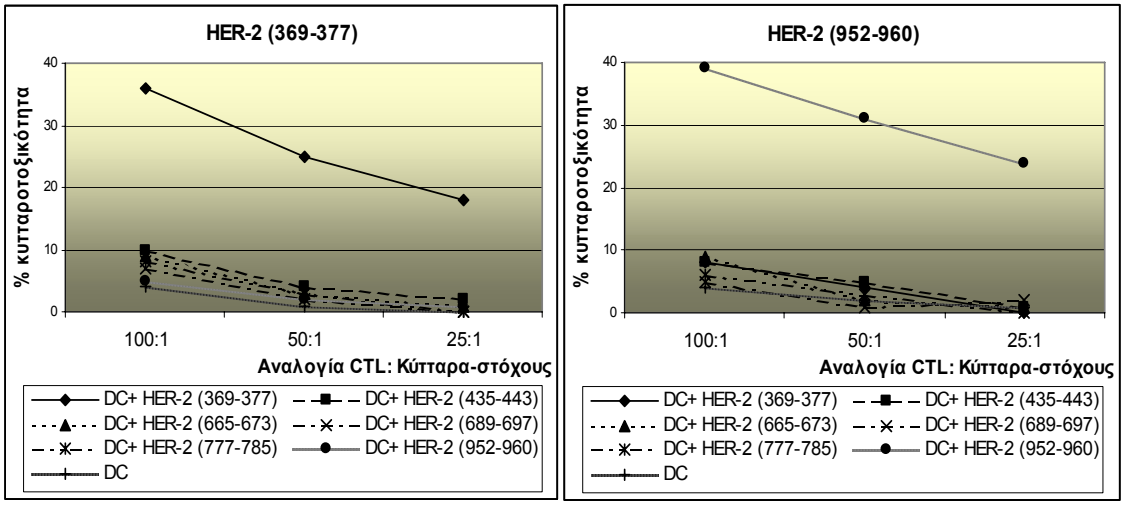
Οι ασθενείς των οποίων τα PBMC χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ήταν: Για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) η ασθενής με καρκίνο του μαστού No. 1 από τον πίνακα 11.3 (και No. 8 του πίνακα 11.5), για το πεπτίδιο HER-2 (435-443) η ασθενής No. 40 από τον πίνακα 11.1 με καρκίνο του πνεύμονα, για το HER-2 (665-673) η ασθενής No. 38 από τον πίνακα 11.1 με καρκίνο των ωοθηκών, για το HER-2 (689-697) ο ασθενής No. 32 από τον πίνακα 11.1 με καρκίνο του προστάτη, για το HER-2 (777-785) η ασθενής No. 35 από τον πίνακα 11.1 με καρκίνο του μαστού και για το πεπτίδιο HER-2 (952-960) η ασθενής No. 33 από τον πίνακα 11.1 με καρκίνο του μαστού.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα διαγράμματα του σχήματος 11.10 δείχνουν ότι τα PBMC των ασθενών που παρουσίασαν αυξημένη συχνότητα για ένα από τα μελετούμενα πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, παρουσιάζουν χαμηλή, αλλά στατιστικά σημαντική κυτταροτοξική δράση ενάντια στα αυτόλογα DC που φέρουν στην επιφάνειά τους το αντίστοιχο πεπτίδιο, όπως και ενάντια στα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα.



Σχήμα 11.10. Κυτταροτοξική δράση των PBMC ασθενών με HER-2/neu^{+} όγκους ενάντια σε αυτόλογα DC επωασμένα με τα αναφερόμενα πεπτίδια και ενάντια σε αυτόλογα καρκινικά κύτταρα.

Για την εκτίμηση αν τα PBMC ενός ασθενούς με αυξημένη συχνότητα CTL για ένα δεδομένο πεπτίδιο, δύνανται να προκαλέσουν λύση αυτόλογων DC που φέρουν στην επιφάνειά τους κάποιο από τα υπόλοιπα πεπτίδια, στο οποίο ο συγκεκριμένος ασθενής δεν παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα CTL, χρησιμοποιήθηκαν τα PBMC των ασθενών με αύξοντα αριθμό 5 και 33 από τον πίνακα 1, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένες συχνότητες για τα πεπτίδια HER-2 (369-377) και HER-2 (952-960) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 11.11.



Σχήμα 11.11. Κυτταροτοξική δράση των PBMC ασθενών με HER-2/neu^{+} όγκους που παρουσιάζουν αυξημένες συχνότητες για τα πεπτίδια HER-2 (369-377) και HER-2 (952-960) ενάντια σε αυτόλογα DC επωασμένα με τα αναφερόμενα πεπτίδια.

Όπως παρατηρούμε στα πιο πάνω διαγράμματα, τα PBMC κάθε ασθενούς με αυξημένη συχνότητα CTL για ένα δεδομένο πεπτίδιο, δύνανται να προκαλέσουν τη λύση μόνο των αυτόλογων DC που είναι «φορτωμένα» με το συγκεκριμένο πεπτίδιο και όχι αυτών που φέρουν κάποιο από τα υπόλοιπα πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι και η λύση των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων πραγματοποιείται μέσω της αναγνώρισης του συγκεκριμένου πεπτιδίου και όχι μέσω των CTL που είναι ειδικά για τα υπόλοιπα πεπτίδια και βρίσκονται σε χαμηλές συχνότητες μέσα στα PBMC του ασθενούς.

12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ευρήματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη είναι: 1] Η ανάπτυξη ενός καλά καθορισμένου συστήματος για την επαναλήψιμη επαγωγή δραστικών και μακροχρόνια βιώσιμων $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων ενάντια σε πεπτίδια ογκοπρωτεϊνών απαντούμενων σε ποικίλους τύπου καρκίνου. 2] Η ταυτοποίηση πεπτιδίων της πρωτεΐνης HER-2/neu, τα οποία παρουσιάζουν επιτόπους αναγνωριζόμενους από $CD4^+$ και $CD8^+$ λεμφοκύτταρα. 3] Η επαγωγή λειτουργικών κλώνων $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για τα πεπτίδια αυτά. 3] Ο έλεγχος της συνεργασίας των $CD4^+$ και των $CD8^+$ Τ κυττάρων στο επίπεδο της πρωτογενούς ευαισθητοποίησης (priming) και της διατήρησης της λειτουργικότητας των τελευταίων και 4] Ο υπολογισμός στο περιφερικό αίμα ασθενών με ποικίλους τύπους καρκίνου, στους οποίους υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη HER-2/neu, της συχνότητας των ειδικών CTL για πεπτίδια αυτής που χρησιμοποιούνται σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα.

Η κοινή συνισταμένη που απορρέει από τα ευρήματα αυτά, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για τη δημιουργία αποτελεσματικής ανοσολογικής αντίδρασης ενάντια στον καρκίνο, είναι απαραίτητη η συνεργασία πολλών κυτταρικών τύπων. Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων κατά την ανοσοαντίδραση, μέσω επαφής ή διαλυτών παραγόντων, αποτελούν το κλειδί για τον έλεγχο αυτής. Η πορεία μιας τυπικής ειδικής ανοσολογικής απάντησης αποτελεί μια αναπόσπαστη αλυσίδα, η οποία αρχίζει από μία μη ειδική φλεγμονώδη αντίδραση που κορυφώνεται σε μία ειδική κυτταρική ή/και χυμική απάντηση και τέλος καταστέλλεται, και πάλι ειδικά, ώστε να μη δημιουργηθεί αυτοανοσία, αλλά να εξασφαλισθεί ανοσολογική μνήμη.

Κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση και τη συνεργασία των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος διαδραματίζουν τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα, ενορχηστρώνοντας το σύνολο της ανοσολογικής απάντησης, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα DC και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, συμβάλλοντας στην έναρξη, την επιτυχή έκβαση και την ολοκλήρωση της ανοσολογικής απόκρισης. Τα δραστικά $CD8^+$ Τ κύτταρα μπορούν να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα απευθείας, μέσω της αναγνώρισης του συμπλόκου MHC τάξης Ι-πεπτιδίου που εκφράζεται στην επιφάνεια του όγκου, αφού προηγούμενα ενεργοποιηθούν μέσω της παρουσίασης του κατάλληλου καρκινικού αντιγόνου από τα APC (κατά κύριο λόγο τα DC). Η ενεργοποίηση των DC εξαρτάται

κυρίως από την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε αυτά και τα $CD4^+$ Τ κύτταρα. Για το σχεδιασμό συνεπώς αποτελεσματικής ανοσολογικής απόκρισης ενάντια σε καρκινικό φορτίο, είναι απαραίτητη η επιτυχής ενεργοποίηση όλων των προηγούμενων κυτταρικών τύπων και της συνεργασίας αυτών, ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα [Toes et al, 1999].

Δεδομένης της εξάρτησης της δημιουργίας αποτελεσματικής ανοσολογικής ανοσίας ενάντια στον καρκίνο από τα $CD4^+$ Τ κύτταρα, στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, έγινε αρχικά προσπάθεια για την εγκαθίδρυση ενός αποτελεσματικού συστήματος για τη δημιουργία λειτουργικών $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων, ικανών να πολλαπλασιαστούν, παράγοντας μεγάλο αριθμό δραστικών βιώσιμων κυττάρων, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε PBMC από υγιές άτομο για να δημιουργήσουμε $CD4^+$ Τ κυτταρικούς κλώνους ειδικούς για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu. Η διαδικασία που περιγράφεται στο σχήμα 7.1 αποδεικνύεται αποτελεσματική για την ικανοποιητική ενεργοποίηση αθώων $CD4^+$ Τ κυττάρων και την απομόνωση ειδικών για το χρησιμοποιούμενο πεπτίδιο κλώνων βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Οι προκύπτουσες, με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ενεργοποίησης, καλλιέργειες $CD4^+$ κυττάρων παρουσιάζουν έντονο πολλαπλασιασμό και υψηλή παραγωγή IFN-γ σε απάντηση στην επαγωγή με το αντίστοιχο πεπτίδιο. Οι παραγόμενοι κλώνοι δύνανται να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και να παράγουν φάσμα κυτταροκινών που ανήκει στον κυτταρικό τύπο ανοσολογικής απόκρισης, τύπο που ενδείκνυται για την αντίδραση σε καρκινικό φορτίο [Pardoll, 2002].

Βασισμένοι στο πρωτόκολλο του σχήματος 7.1, απομονώθηκαν $CD4^+$ Τ κυτταρικοί κλώνοι ειδικοί για το πεπτίδιο HER-2 (884-899) της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, οι οποίοι μπορούσαν να αναγνωρίσουν καρκινικά κύτταρα που υπερέκφραζαν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τα χρησιμοποιούμενα καρκινικά κύτταρα προήλθαν τόσο από κυτταρικές σειρές (την HT-29 από καρκίνο του παχέως εντέρου που εκφράζει την πρωτεΐνη HER-2/neu και την FM3 από μελάνωμα μετασχηματισμένη ώστε να την εκφράζει), όσο και από ex-vivo όγκους ασθενών με καρκίνο του μαστού, του παχέως εντέρου και του παγκρέατος. Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα των μεταστατικών όγκων, καθώς και τα κύτταρα της σειράς HT-29 δεν εξέφραζαν στην επιφάνειά τους μόρια MHC τάξης ΙΙ, η έκφραση αυτή επήχθη μέσω επώασης με IFN-γ, γεγονός που παρείχε τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τα μη επωασμένα με IFN-

γ καρκινικά κύτταρα ως αρνητικές καλλιέργειες ελέγχου. Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς FM3, ως καλλιέργεια ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η μη μετασχηματισμένη σειρά.

Οι απομονωθέντες κλώνοι βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων αναγνώρισαν τα καρκινικά κύτταρα μέσω του μορίου HLA-DR4, αλλήλιο του MHC που απαντά σε σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα χρήσης του πεπτιδίου HER-2 (884-899) σε μεγάλη αναλογία ασθενών με HER-2/neu$^+$ όγκους. Το γεγονός ότι οι μελετούμενοι κλώνοι αναγνώρισαν τα καρκινικά κύτταρα ασθενών με HER-2/neu$^+$ μεταστατικούς όγκους καρκίνου του μαστού, του παχέως εντέρου και του παγκρέατος, αποδεικνύει ότι ο χρησιμοποιούμενος επίτοπος παρουσιάζεται φυσιολογικά (naturally processed) στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων των συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Επιπλέον, δεδομένου ότι σε αυτές τις μορφές καρκίνου έχουν ήδη εντοπιστεί επίτοποι της HER-2/neu που αναγνωρίζονται από CTL [Brossart et al, 1998, Linehan et al, 1995, Peiper et al, 1997], το πεπτίδιο HER-2 (884-899) καθίσταται υποψήφιο για συμμετοχή σε συνδυαστικά εμβόλια πεπτιδίων με επιτόπους για μόρια MHC τάξης I και II, ώστε να είναι εφικτή η ενεργοποίηση και η συνεργασία βοηθητικών και κυτταροτοξικών κυττάρων.

Στο γενικό τμήμα της εισαγωγής, αναφέρθηκε το εναλλακτικό ενδοκυττάριο μονοπάτι παρουσίασης πρωτεϊνικών επιτόπων από μόρια τάξης ΙΙ του MHC. Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν τη χρήση αυτής της οδού παρουσίασης από καρκινικά αντιγόνα του μελανώματος, όπως η τυροσινάση και η gp75, οι οποίες περιέχουν αλληλουχίες αναγνωριζόμενες από τα ενδοσώματα [Wang et al, 1999c]. Η αναγνώριση του πεπτιδίου HER-2 (884-899) επάνω στα καρκινικά κύτταρα ασθενών, υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη HER-2/neu διαθέτει αλληλουχίες αμινοξέων που της επιτρέπουν την προσάρτησή της στα λυσοσώματα και έτσι μέσω της ενδοκυτταρικής οδού παρουσίασης, πεπτιδικές περιοχές της ογκοπρωτεΐνης αυτής έχουν πρόσβαση στα εξωσώματα, όπου και προσδένονται στα μόρια τάξης ΙΙ του MHC και παρουσιάζονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Περαιτέρω ένδειξη του γεγονότος ότι πεπτίδια της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρουσιάζονται in vivo στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων σε συνδυασμό με μόρια MHC τάξης ΙΙ, αποτελεί η ύπαρξη IgG αντισωμάτων αντί-HER-2/neu σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η οποία προϋποθέτει την ενεργοποίηση CD4$^+$Τ κυττάρων [Cheever et al, 1995]. Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα όγκων του μαστού συνήθως δεν παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους μόρια MHC τάξης ΙΙ, η ενεργοποίηση των CD4$^+$ κυττάρων είναι

δυνατό να επιτευχθεί μέσω της πρόσληψης από τα μακροφάγα ή τα DC αποπτωτικών σωμάτων (apoptotic bodies), προερχόμενων από τα αποπίπτοντα καρκινικά κύτταρα. Περαιτέρω ερευνητικές μελέτες θα μπορούσαν να αποδείξουν αν και άλλες πεπτιδικές περιοχές της πρωτεΐνης HER-2/neu έχουν πρόσβαση στα ενδοσώματα, ώστε να εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και έτσι να αποτελούν υποψήφια μόρια για πρωτόκολλα εμβολιασμού [Chaux et al, 1999].

Η αναγνώριση των πεπτιδίων από τα Τ κύτταρα γίνεται μέσω του υποδοχέα τους, δηλαδή του TCR. Στην περίπτωση των κλώνων που απομονώθηκαν και αναγνωρίζουν το πεπτίδιο HER-2 (884-899), όλοι χρησιμοποιούν την υπερμεταβλητή περιοχή TCR VB7.1. Παρότι απαιτείται μοριακή ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών CDR3 των TCR για τη διαπίστωση αν οι απομονωθέντες κλώνοι προέρχονται από το ίδιο αρχικό κύτταρο (sister clones) ή αν αποτελούν διαφορετικούς κλώνους που προέρχονται από διαφορετικά αθώα $CD4^+$ Τ κύτταρα, η ταυτοποίηση της κοινής χρήση των TCR VB7.1 από όλους τους κλώνους, θέτει την απαρχή για την ανάλυση της έκτασης της ομολογίας της ομογένειας του ρεπερτορίου των TCR που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση του πεπτιδίου HER-2 (884-899) από τα μόρια HLA-DR4. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η πιθανή ομολογία στη χρήση των περιοχών TCR για την αναγνώριση του συγκεκριμένου πεπτιδίου από άλλα αλλήλια εκτός του HLA-DR4, όπως τα HLA-DR1, -DR52 και -DR53 [Kobayashi et al, 2000], καθώς και για την αναγνώριση άλλων πεπτιδίων προερχόμενων από την ίδια πρωτεΐνη, παρέχοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη δυνατότητα επιλογής των κατάλληλων για έγχυση βοηθητικών κυττάρων στα ανοσοθεραπευτικά σχήματα ενάντια σε HER-2/neu^+ στόχους.

Δεδομένου ότι η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων των μεταστατικών όγκων δε φέρει αντιγόνα τάξης ΙΙ του MHC, η ειδικότητα των βοηθητικών Τ κυττάρων για τον όγκο επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των DC της περιβάλλουσας περιοχής, ώστε να καταστούν ικανά να παρουσιάσουν τα καρκινικά αντιγόνα στα $CD8^+$ Τ κύτταρα και να δημιουργηθούν δραστικά κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Η ανάγκη για βοηθητική δράση από τα $CD4^+$ Τ κύτταρα για τη δημιουργία και τη διατήρηση της κυτταροτοξικής δράσης των $CD8^+$ κυττάρων ενάντια στα κύτταρα των όγκων, οδήγησε στην ανάγκη για τη χρήση εμβολίων τα οποία να μπορούν να ενεργοποιήσουν βοηθητικά και κυτταροτοξικά κύτταρα Μέχρι πρόσφατα, για την αύξηση της δραστικότητας των ειδικών για τα καρκινικά αντιγόνα CTL, χρησιμοποιούνταν για εμβολιασμό μίγματα πεπτιδίων με δυνατότητα

δέσμευσης άλλα με μόρια MHC τάξης I και άλλα με τάξης II [Ossendorp et al, 1998]. Παρότι τα αποτελέσματα παρουσιάζονταν βελτιωμένα σε σχέση με τα εμβόλια που αποτελούνταν μόνο από επιτόπους καρκινικών αντιγόνων δεσμευόμενους από τα $CD8^+$ Τ κύτταρα, η χρήση μεγάλων πεπτιδίων με επιτόπους αναγνωριζόμενους και από τους δύο τύπους κυττάρων φαίνεται να πλεονεκτεί [Knutson et al, 2001; Kobayashi et al, 2001]. Με αυτό τον τρόπο, πεπτίδια που αποτελούνται από φυσικά παρουσιαζόμενους CTL και Th επιτόπους μπορούν να βρεθούν ταυτόχρονα στην επιφάνεια του ίδιου APC και να βρεθούν σε στενή επαφή τα APC, τα $CD4^+$ και τα $CD8^+$ Τ κύτταρα, εντείνοντας τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση [Zeng et al, 2002]. Παρόλα αυτά, η ιδέα για τη χρήση επιτόπων αναγνωριζόμενων από βοηθητικά λεμφοκύτταρα που εμπεριέχουν επιτόπους για κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα δεν αποτελεί νέα αντιμετώπιση για την επαγωγή αποτελεσματικής ανοσολογικής αντίδρασης. Η ομάδα του Leclerc είχε χρησιμοποιήσει για εμβολιασμό και, μετέπειτα, in vitro ενεργοποίηση πεπτίδιο ιού χοριομηνιγγίτιδας που περιείχε επιτόπους για Th και CTL [Fayolle et al, 1991]. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν μεγάλα συνθετικά πεπτίδια μήκους 30-40 αμινοξέων που περιείχαν επιτόπους και για τους δύο κυτταρικούς τύπους [Zwaveling et al, 2002]. Το πλεονέκτημα των μεγάλων πεπτιδίων είναι ότι μπορούν να προσληφθούν εύκολα και να ενδοκυτταρωθούν, όποτε προσεγγίζουν χωροταξικά τα κυτταρικά διαμερίσματα που γίνεται η επεξεργασία των μορίων MHC τάξης I και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτά και να παρουσιαστούν στην επιφάνεια του APC.

Γενικά, τα πεπτιδικά εμβόλια για τον καρκίνο μπορούν να καταστούν πιο αποτελεσματικά αν συμπεριλαμβάνουν επιτόπους που αναγνωρίζονται τόσο από βοηθητικά όσο και από κυτταροτοξικά Τ κύτταρα. Η επαρκής και αποτελεσματική παροχή «βοήθειας» από τα $CD4^+$ Τ κύτταρα στα CTL, τόσο όσον αφορά στην ενεργοποίηση, όσο και στη βελτιστοποίηση λειτουργικής δράσης των τελευταίων, έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, κύρια στα συστήματα μελέτης της ανοσολογικής απάντησης στα πλαίσια του καρκίνου, όπου γνωρίζουμε ότι υπάρχει μεν ανοσολογική απάντηση, αλλά αυτή δεν είναι επαρκής για την απόρριψη του όγκου. Η Disis και οι συνεργάτες της έχουν ήδη αρχίσει μια σειρά από πιλοτικές κλινικές μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση, εμβολιάζοντας ασθενείς με καρκίνο του μαστού με συνθετικά πεπτίδια της HER-2/neu που εμπεριέχουν Th και CTL επιτόπους [Knutson et al, 2001; Disis et al, 2002]. Τα πεπτίδια αυτά είναι τα HER-2 (369-384), HER-2 (688-703) και HER-2 (971-984). Επίσης στις ίδιες μελέτες

συμπεριλήφθηκαν και ανασυνδυασμένα τμήματα της εξωκυττάριας και της ενδοκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης HER-2/neu. Τα πρώτα αποτελέσματα από αυτές τις δοκιμές δείχνουν σημαντική αύξηση του ποσοστού των πρόδρομων CTL στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Επίσης, το ίδιο δείχθηκε και για τα $CD4^+$ T κύτταρα που αναγνώριζαν τον Th επίτοπο. Συνεπώς, τα πρωτόκολλα αυτά έδειξαν ότι είναι κατάλληλα για την αύξηση της συχνότητας HER-2/neu ειδικών κυτταρικών κλώνων (Th και CTL) στο αίμα των ασθενών, πράγμα που είναι σημαντικό ως προς τη δημιουργία θετικών κλινικών απαντήσεων.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάσαμε στην ενότητα 10 δείχνουν ότι, τουλάχιστον στο in vitro σύστημα που χρησιμοποιήσαμε, τόσο η ευαισθητοποίηση των $CD8^+$ T κυττάρων, όσο και η ικανότητά τους να παράγουν IFN-γ και να προκαλούν τη λύση κυτταρικών στόχων, εξαρτάται από την παρουσία στην καλλιέργεια $CD4^+$ βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Όταν στην καλλιέργεια συνυπήρχαν $CD8^+$ και $CD4^+$ T κύτταρα, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας, καθώς και του πολλαπλασιασμού των $CD8^+$ κυττάρων (αύξηση έως και 264%). Η απόκτηση μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων είναι σημαντική για τη χρήση των CTL στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, δεδομένου ότι στην περίπτωση αυτή απαιτούνται μεγάλοι αριθμοί δραστικών CTL για συστηματική έγχυση ή έγχυση στην περιοχή του όγκου. Επιπρόσθετα, η παρουσία βοηθητικών T λεμφοκυττάρων είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της λειτουργικότητας των παραγόμενων CTL, αυξάνοντας τόσο την παραγωγή IFN-γ, όσο και την κυτταροτοξικότητά τους σε ποσοστά που έφταναν το 236% και 173% αντίστοιχα. Η ενισχυτική δράση των $CD4^+$ T κυττάρων προς τη λειτουργικότητα των CTL δεν είναι δυνατόν να αποδοθεί μόνο στην έκκριση κυτταροκινών και τη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος, δεδομένου ότι η προσθήκη στην καλλιέργεια IL-2 και IL-12 δεν εξισορροπούν τη δράση των βοηθητικών λεμφοκυττάρων.

Η ποσοτική και ποιοτική βελτίωση της απάντησης των CTL ενάντια σε καρκινικά αντιγόνα παρουσία $CD4^+$ T κυττάρων έχει επίσης δειχτεί σε in vivo συστήματα από ποικίλες ερευνητικές ομάδες. Η ομάδα της Bennett απέδωσε την επαγωγή της κυτταροτοξικής δράσης στη διασταυρωτή ενεργοποίηση των $CD4^+$ και των $CD8^+$ κυττάρων από το ίδιο DC [Bennett et al, 1997], ενώ ο Greenberg, με την έγχυση βοηθητικών T λεμφοκυττάρων ειδικών για το αντιγόνο FBL, κατονόμασε τα μακροφάγα ως κυτταρικό μεσολαβητή ανάμεσα στα Th και τα CTL [Greenberg, 1991]. Πιο πρόσφατα δεδομένα που δείχνουν τη συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο

αυτών κυτταρικών πληθυσμών παρουσιάζονται από την ομάδα του Melief [Ossendorp et al, 1998], οι οποίοι δείχνουν ότι η διασταυρωτή ενεργοποίηση από τα DC είναι απαραίτητη για τη μείωση του μεγέθους όγκων αρνητικών για μόρια MHC τάξης II.

Τα αποτελέσματα αυτά διερευνήθηκαν περαιτέρω από το εργαστήριό μας [Baxevanis et al, 2000], όπου με τη χρήση μίγματος πεπτιδίων εκχυλισμένων από καρκινικά κύτταρα με την επίδραση οξέως, βρέθηκε ότι παρουσία των $CD4^+$ Τ κυττάρων, τα αυτόλογα DC μπορούσαν να ενεργοποιήσουν αποτελεσματικότερα τα $CD8^+$ Τ κύτταρα και να προκαλέσουν σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικής τους ικανότητας. Η δράση αυτή των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων απεδείχθη ότι οφείλεται στην αλληλεπίδραση των επιφανειακών μορίων CD40L και CD40 που βρίσκονται αντίστοιχα επάνω στα $CD4^+$ κύτταρα και τα DC και η οποία επιτρέπει την ενεργοποίηση των DC, απαραίτητη για την παρουσίαση του αντιγόνου και την παροχή συνδιεγερτικών σημάτων προς τα $CD8^+$ Τ κύτταρα. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα δύο αυτά επιφανειακά μόρια και η σημασία της για την κυτταρική συνεργασία και την τελική ενεργοποίηση των CTL έχει επίσης δειχθεί και σε συστήματα ιικής μόλυνσης [Ahlers et al, 2001], παρότι στα συστήματα αυτά δεν μπορεί να αποκλειστεί η ανεξάρτητη από τα Th ενεργοποίηση των CTL, λόγω απευθείας αλληλεπίδρασης των ιών με τα DC [Reddehase et al, 1988].

Η βοηθητική δράση των $CD4^+$ Τ κυττάρων στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα δεν περιορίζεται μόνο στην ενεργοποίηση των αθώων $CD8^+$ Τ κυττάρων, αλλά και των κυττάρων μνήμης. Η ομάδα του Fernando με τη χρήση πεπτιδίων της οβαλβουμίνης (OVA) έδειξε ότι είναι απαραίτητη η παρουσία ειδικών για το αντιγόνο Th για την ενεργοποίηση των $CD8^+$ Τ κυττάρων μνήμης [Gao et al, 2002].

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της παροχής της μέγιστης ενισχυτικής δράσης των Th κυττάρων στη λειτουργικότητα των CTL, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών πληθυσμών $CD4^+$ Τ κυττάρων στην ανάπτυξη κυτταροτοξικών κυττάρων ειδικών για πεπτίδια της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν αφενός ολικά PBMC από υγιή δότη, τα οποία περιέχουν αθώα $CD4^+$ και αθώα $CD8^+$ κύτταρα με TCR που δύναται να συνδεθεί με τα χρησιμοποιούμενα πεπτίδια και αφετέρου απομονωμένα αθώα $CD8^+$ κύτταρα του ίδιου δότη σε συνδυασμό με αυτόλογες σειρές $CD4^+$ Τ κυττάρων ειδικών για το αντίστοιχο πεπτίδιο. Ενώ και στις δύο περιπτώσεις οι λειτουργικές απαντήσεις των

προκύπτοντων CTL ήταν βελτιωμένες σε σχέση με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα, στις καλλιέργειες που εκκίνησαν από ολικό πληθυσμό PBMC η παραγωγή IFN-γ και η κυτταροτοξική δράση παρουσιάζονταν ενισχυμένες. Κατόπιν όμως μελέτης των σχετικών ποσοστών των $CD8^+$ και των $CD4^+$ Τ κυττάρων στους δύο τύπους καλλιεργειών, διαπιστώθηκε ότι η αναλογία των Th προς τα CTL ήταν εξαιρετικά αυξημένη στις καλλιέργειες που ξεκίνησαν με ολικά PBMC (1.7/1) σε σχέση με τις καλλιέργειες που περιείχαν σειρές ειδικών για το αντίστοιχο πεπτίδιο $CD4^+$ κυττάρων (0.05/1). Δεδομένης της αλληλεπίδρασης των Th με τα DC (μέσω της σύνδεσης CD40L-CD40), στην επαγωγή της ενεργοποίησης των τελευταίων και την αποτελεσματικότερη παρουσίαση του αντιγόνου στα $CD8^+$ κύτταρα [Baxevanis et al, 2000], ο μεγαλύτερος αριθμός βοηθητικών κυττάρων διαφοροποιεί και την αναλογία $CD4^+$/DC κατά τη διάρκεια των ενεργοποιήσεων, καθώς επίσης και τη συγκέντρωση των παραγόμενων κυτταροκινών. Διαφοροποιείται δηλαδή αφενός ο βαθμός αλληλεπίδρασης των DC με τα $CD4^+$ Τ κύτταρα, απαραίτητος για την ενεργοποίηση αυτών και την αποτελεσματική παρουσίαση των πεπτιδίων στα $CD8^+$ κύτταρα, καθώς και το μικροπεριβάλλον της ανοσολογικής δραστηριότητας.

Η ταυτοποίηση των νέων επιτόπων της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu, με δυνατότητα σύνδεσης σε συχνά απαντούμενα αλλήλια τάξης I και II του MHC στην παρούσα μελέτη, έγινε με τη μέθοδο της αντίστροφης ανοσολογίας, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για την ταυτοποίηση ευρέως χρησιμοποιούμενων πεπτιδίων, όπως για παράδειγμα τα HER-2 (369-377), HER-2 (435-443) και HER-2 (665-673) της ίδιας πρωτεΐνης [Fisk et al, 1995; Rongcun et al, 1999]. Ταυτοποιήσαμε δύο νέα πεπτίδια, τα HER-2 (80-94) και HER-2 (166-180), τα οποία μπορούν να συνδεθούν ισχυρά με τα αλλήλια HL-DR4, HLA-DR11 και HLA-A2, HLA-A26, αλλήλια με μεγάλη συχνότητα εντόπισης, προσφερόμενα κατ' αυτό τον τρόπο για ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα απευθυνόμενα σε μεγάλη μερίδα του πληθυσμού.

Με διαδοχικές in vitro ενεργοποιήσεις επιτεύχθηκε η δημιουργία βοηθητικών και κυτταροτοξικών κυτταρικών κλώνων, που αναγνώριζαν ειδικά τα νέα πεπτίδια. Οι παραγόμενοι $CD4^+$ Τ λεμφοκυτταρικοί κλώνοι παρήγαγαν μεγάλα ποσά IFN-γ και εμφάνιζαν έντονο πολλαπλασιασμό σε απάντηση στο αντίστοιχο πεπτίδιο. Το είδος των παραγόμενων κυτταροκινών έδειξε ότι πρόκειται για Th1 τύπο ανοσοαπόκρισης, ο οποίος είναι και ο επιλεγόμενος για την ανοσολογική απόκριση στον καρκίνο [Pardoll, 2002]. Εξάλλου, οι παραγόμενοι CTL κλώνοι εμφάνιζαν κυτταροτοξική

δράση ενάντια σε αυτόλογα DC που έφεραν στην επιφάνειά τους τα αντίστοιχα πεπτίδια. Αποτελέσματα πειραμάτων του εργαστηρίου μας σε μοντέλα διαγονιδιακών πειραματοζώων έχουν δείξει την αναστολή ανάπτυξης όγκου θετικού για την ανθρώπινη πρωτεΐνη HER-2/neu σε ποντίκια που έχουν εμβολιαστεί με τα πεπτίδια αυτά [άρθρο υπό συγγραφή].

Επιπρόσθετα, όλοι οι κλώνοι που απομονώθηκαν, είτε επρόκειτο για βοηθητικά είτε για κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα εμφάνιζαν φαινότυπο δραστικού κυττάρου και όχι κυττάρου μνήμης ($CD45RA^{+}CD45RO^{-}$), ενώ δεν εξέφραζαν το επιφανειακό μόριο CCR7. Το μόριο CCR7 συνδέεται με χημειοκίνες των ενδοθηλιακών αγγείων των λεμφαδένων και προκαλεί την έναρξη της εξαγωγής από τα αγγεία και, συνεπώς, εντόπιση στα κεντρικά λεμφικά όργανα [Geginat et al, 2003]. Οι κλώνοι δηλαδή που απομονώθηκαν, αποτελούνταν από κύτταρα που δεν είχαν την τάση να κατευθυνθούν προς τους λεμφαδένες, αλλά προς τους περιφερικούς ιστούς και να επιτελέσουν εκεί τη λειτουργική τους δράση. Επίσης όλοι οι κλώνοι παρουσίαζαν υψηλή έκφραση του υποδοχέα της IL-2 (CD25), γεγονός που δείχνει ότι είναι δυνατόν να γίνει επαγωγή του πολλαπλασιασμού τους με υψηλά ποσά της κυτταροκίνης αυτής, όπως χρησιμοποιείται στα περισσότερα κλινικά πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν έγχυση in vitro ενεργοποιημένων Τ κυττάρων [Finn 2003].

Η ταυτοποίηση επιτόπων καρκινικών αντιγόνων πραγματοποιείται με απώτερο στόχο τη χρήση τους στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Η πιθανή συμμετοχή ενός πεπτιδίου σε ένα εμβόλιο κατά του καρκίνου εξαρτάται από το αν μπορεί να εμφανιστεί στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και να προκαλέσει την απάντηση του ανοσολογικού συστήματος. Για το λόγο αυτό, εξετάσθηκαν οι συχνότητες των ειδικών CTL για πεπτίδια της πρωτεΐνης HER-2/neu σε ασθενείς με ποικίλους τύπους μεταστατικού καρκίνου. Όπως παρουσιάζεται στην ενότητα 11, οι ασθενείς με $HER\text{-}2/neu^{+}$ όγκους παρουσιάζουν αυξημένες συχνότητες για τα πεπτίδια HER-2 (369-377), (435-443), (665-673), (689-697), (777-785) και (952-960).

Όσον αφορά στο πεπτίδιο HER-2 (369-377), έναν από τους πιο γνωστούς επιτόπους της πρωτεΐνης HER-2/neu, όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση της τεχνικής ELISPOT, είναι δυνατό να αναγνωριστεί από τα CTL ασθενών που φέρουν τα μόρια HLA-A2, -A3 ή -A26. Στην αναφορά Sotiropoulou et al, 2003α παρουσιάζεται για πρώτη φορά η δυνατότητα αναγνώρισης του πεπτιδίου αυτού από τα αλλήλια HLA-A3 και HLA-A26 και μάλιστα όχι μόνο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών, αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου, του πνεύμονα και

του προστάτη. Από τους ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, μόνο η μειονότητα των HLA-A2$^+$ και HLA-A26$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενών (το 25 και το 30% αντίστοιχα) είχαν ανιχνεύσιμες, με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, συχνότητες ειδικών CTL. Αντίθετα, η πλειονότητα των HLA-A3$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενών (το 60%) παρουσίαζε υπολογίσιμες συχνότητες ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL. Δεδομένου ότι από τους ασθενείς με θετικές συχνότητες για το συγκεκριμένο πεπτίδιο, ο ένας εκ των τεσσάρων ασθενών της ομάδας των HLA-A2 (ο ασθενής με αύξοντα αριθμό 6 στον πίνακα 11.1), καθώς και 2 από τους 3 της ομάδας των HLA-A26 (οι ασθενείς 1 και 6 του πίνακα 11.3) εξέφραζαν επίσης το αλλήλιο HLA-A3, είναι πιθανό και σε αυτούς τους ασθενείς η αναγνώριση να έγινε μέσω του μορίου HLA-A3. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλεισθεί η πιθανότητα, οι κηλίδες IFN-γ που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς αυτούς να προήλθαν από δύο ομάδες CTL, η μία από τις οποίες να αναγνώρισε το πεπτίδιο μέσω του αλληλίου HLA-A2 ή -A26 αντίστοιχα και η άλλη μέσω του HLA-A3.

Η πιθανότητα ανέργειας των CTL στην περίπτωση των HLA-A2 και των HLA-A26 ατόμων αποκλείεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα αντιδρούν στην επίδραση PHA, με μέση τιμή αριθμού κηλίδων IFN-γ παρόμοια σε HER-2/neu$^+$, και HER-2/neu$^-$ ασθενείς και σε υγιείς δότες. Μία λογική εξήγηση για τις διαφορές στις συχνότητες των CTL ανάμεσα στους ασθενείς με διαφορετική τυποποίηση όσον αφορά στο HLA-A, δίνει το γεγονός ότι το πεπτίδιο HER-2 (369-377) δύναται να συνδεθεί ισχυρά με τα αλλήλια HLA-A2 και HLA-A26 (ισχύς σύνδεσης 28 και για τα δύο αλλήλια, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων SYFPEITHI), ενώ δεσμεύεται με μέτρια μόνο ισχύ στο αλλήλιο HLA-A3 (ισχύς σύνδεσης 16). Συνεπώς, κατά τη διαφοροποίηση των Τ κυττάρων στο θύμο αδένα, δεδομένου ότι η HER-2/neu αποτελεί πρωτεΐνη που υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό, οι υψηλής συγγένειας για τα σύμπλοκα HLA-A2/HER-2 (369-377) και HLA-A26/ HER-2 (369-377) CD8$^+$ Τ κλώνοι θα υφίσταντο αρνητική επιλογή, ώστε να αποφευχθεί αυτοάνοση απάντηση ενάντια φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν χαμηλά ποσά HER-2/neu. Στη βιβλιογραφία απαντούν περιπτώσεις στις οποίες επίτοποι φυσιολογικών πρωτεϊνών που δύνανται να συνδεθούν ισχυρά με τα αλλήλια του οργανισμού είναι ικανοί να προκαλέσουν ανοσολογική ανοχή [Gross et al, 2004, Sercarz, 2000; Nanda et al, 1995]. Αντίθετα, οι κλώνοι CD8$^+$ Τ κυττάρων που είναι ειδικοί για το σύμπλοκο HLA-A3/HER-2 (369-377) δεσμεύονται με αυτό με μέτρια ισχύ και η σύνδεση αυτή δεν προκαλεί ανοχή, δεδομένου ότι οι συγκεκριμένοι κλώνοι δεν μπορούν να

αναγνωρίσουν τα χαμηλά επίπεδα HER-2/neu που εκφράζονται από τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Παρόλα αυτά, η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα ή στα αυτόλογα DC που έχουν επωαστεί με το πεπτίδιο HER-2 (369-377) δύναται να ενεργοποιήσει τους συγκεκριμένους κλώνους και να προκαλέσει έκκριση κυτταροκινών και κυτταροτοξική δράση.

Δεδομένου ότι το πεπτίδιο HER-2 (369-377) έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνητικής μελέτης σε σχέση με την ανοσοθεραπεία του καρκίνου, έχουν ήδη δημοσιευτεί εργασίες που αναφέρουν συχνότητες ειδικών για αυτό CTL σε άτομα με HER-2/neu$^+$ όγκους. Συγκεκριμένα, η ομάδα της Disis αναζήτησε τις συχνότητες αυτές σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών και δεν εντόπισε τέτοια κύτταρα πριν τον εμβολιασμό [Knutson et al, 2001]. Η ίδια ομάδα στη συνέχεια χρησιμοποίησε το δεκαπενταπεπτίδιο HER-2 (369-383), το οποίο εμπεριέχει το μελετούμενο εννιαπεπτίδιο HER-2 (369-377) σε μηνιαίους εμβολιασμούς HLA-A2$^+$ HER-2/neu$^+$ ασθενών. Ο αριθμός των CD8$^+$ Τ κυττάρων που είναι ειδικά για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) υπολογίσθηκε στο 13,33% πριν τον εμβολιασμό και 66,6% μετά [Knutson et al, 2001]. Σε πιο πρόσφατη εργασία της ίδιας ομάδας [Disis et al, 2002] η συχνότητα πριν τον εμβολιασμό ανέρχεται μόλις στο 5%. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα, τα δικά μας αποτελέσματα, όσον αφορά στους HLA-A2$^+$ ασθενείς, παρουσιάζουν μεγαλύτερες συχνότητες ειδικών CTL για το πεπτίδιο αυτό, σε μη ανοσοποιημένους με σχετικά εμβόλια ασθενείς (25%). Τόσο στην παρούσα εργασία, όσο και στις προαναφερθείσες, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ELISPOT, καθώς και ολικά PBMC ως πηγή CTL από τους ασθενείς. Εξετάζοντας όμως τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια, διαπιστώθηκαν διαφορές ως προς το είδος των APC και των κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αυτόλογα DC (που αποτελούν τα πλέον εξειδικευμένα APC) αντί για PBMC, καθώς και τις κυτταροκίνες IL-7 και IL-12 αντί για την IL-2 που χρησιμοποιούν οι άλλες ομάδες, κυτταροκίνες που υποστηρίζουν τις αντιγόνο-ειδικές απαντήσεις των CD8$^+$ Τ κυττάρων [Trinchieri, 1995; Trinchieri, 1997; Costello et al, 1993]. Είναι, συνεπώς, δυνατό να επιτεύχθηκε ο σχεδιασμός ενός συστήματος που ευνοεί την ανάπτυξη των προϋπαρχόντων CD8$^+$ Τ κλώνων, σε σχέση με τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν από άλλες ερευνητικές ομάδες.

Η εντόπιση αυξημένων συχνοτήτων ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (369-377) CTL σε ασθενείς με πέντε διαφορετικούς τύπου καρκίνου (μαστού, ωοθηκών, παχέως εντέρου, πνεύμονα και παγκρέατος), καθώς και η δυνατότητα των κυττάρων αυτών

να προκαλούν λύση των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύουν ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο είναι ιδανικό για χρήση σε ανοσοθεραπευτικά εμβόλια για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η αναγνώρισή του μέσω και των τριών αλληλίων, HLA-A2, HL-A3 και HLA-A26, αυξάνει τον πληθυσμό των ασθενών που δύνανται να λάβουν μέρος στους εμβολιασμούς αυτούς.

Εκτός από το πεπτίδιο HER-2 (369-377), για το οποίο υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία, δεν ισχύει το ίδιο και για τα υπόλοιπα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία έχουν απασχολήσει την έρευνα για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου σε μικρότερο βαθμό. Από όλα τα πεπτίδια που προαναφέρθηκαν, μόνο για το HER-2 (689-697) υπάρχει δημοσιευμένη εργασία που εξετάζει την ύπαρξη συχνοτήτων ειδικών CTL σε ασθενείς με HER-2/neu^{+} όγκους. Στην περίπτωση αυτή, ασθενείς με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών δεν εμφανίζουν ανιχνεύσιμα CD8^{+} Τ κύτταρα ειδικά για το πεπτίδιο αυτό πριν τον εμβολιασμό με δεκαπενταπεπτίδιο που εμπεριέχει το συγκεκριμένο επίτοπο [Knutson et al, 2001]. Η συχνότητα αυτών αυξάνεται στο 26.7% μετά τον εμβολιασμό. Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα των ειδικών για το πεπτίδιο αυτό CTL σε ασθενείς (οι οποίοι δεν έχουν λάβει κανένα εμβόλιο σχετικό με τον καρκίνο) είναι ανιχνεύσιμα σε ποσοστό 15.6%. Εκτός αυτού, η μέση συχνότητα στην οποία εντοπίζονται τα κύτταρα αυτά στους ασθενείς ανέρχεται στα 64.5/10^{6} PBMC, συχνότητα που υπερβαίνει ακόμα και αυτή που εντοπίζει η ομάδα της Disis στους ασθενείς που έχουν λάβει το σχετικό εμβόλιο (25/10^{6} PBMC). Όπως αναφέρθηκε και για το πεπτίδιο HER-2 (369-377), έτσι και στην περίπτωση αυτή, η διαφορά στα αποτελέσματα της ομάδα μας με την ομάδα της Disis δύναται να οφείλεται στη χρήση εξειδικευμένων APC, καθώς και κυτταροκινών ικανών να υποστηρίζουν την ειδική για το αντιγόνο αντίδραση των CD8^{+} Τ κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία βέλτιστης ενεργοποίησης και καταλληλότερου μικροπεριβάλλοντος για την επιτέλεση της λειτουργικής δράσης των CTL, η οποία μας επιτρέπει και την ανίχνευσή τους. Η βελτίωση του συστήματος ενεργοποίησης των CTL μπορεί επίσης να επιτρέπει την αντίδραση κυττάρων με μικρότερη ειδικότητα για το σύμπλοκο HLA-A2/HER-2 (689-697), καθώς και σε κύτταρα μερικώς κατασταλμένα κατά την ανάπτυξη του όγκου [Pawelec et al, 1997].

Στο σύνολο των εξεταζόμενων πεπτιδίων, το HER-2 (952-960) παρουσίασε ανιχνεύσιμες συχνότητες στην πλειονότητα των HLA-A2^{+} ασθενών με HER-2/neu^{+} όγκους. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν ειδικά για αυτό κύτταρα σε 10 στους 32 ασθενείς, ποσοστό που ανέρχεται στο 31.3% και μάλιστα 4 από αυτούς εμφάνισαν

εξαιρετικά υψηλές συχνότητες ειδικών CTL (103-244/10^6 PBMC). Στην ίδια ομάδα των HLA-$A2^+$ ασθενών, μόνο το 12.5% εμφάνισε αυξημένη συχνότητα CTL ειδικών για το πεπτίδιο HER-2 (435-444), ενώ για το πεπτίδιο HER-2 (689-697) το ποσοστό αυτό ανήλθε στο 18.8%. Για τα πεπτίδια αυτά, εκτός από τη δική μας εργασία [Sotiropoulou et al, 2003β] δεν υπάρχει βιβλιογραφία σχετικά με τις συχνότητες στις οποίες απαντούν σε ασθενείς με καρκίνο. Εργασίες που έχουν δημοσιευτεί, αναφέρουν την απομόνωση κλώνων CTL ειδικών για τα πεπτίδια αυτά από περιφερικό αίμα ασθενών [Baxevanis et al, 2002; Kono, 1998; Rongcun, 1999]. Δεδομένου ότι η απομόνωση των κλώνων στις περιπτώσεις αυτές γίνεται μετά από 4-5 ενεργοποιήσεις, ο αριθμός των κλώνων που προκύπτουν δεν εκφράζει την αντιπροσώπευσή τους στα PBMC των ασθενών, λόγω του επιλεκτικού πολλαπλασιασμού τους σε αυτά τα συστήματα καλλιέργειας.

Τέλος, για το πεπτίδιο HER-2 (777-785), το οποίο δεν έχει ξαναχρησιμοποιηθεί σε δημοσιευμένη ερευνητική μελέτη πριν την αναφορά Sotiropoulou et al, 2003β που βασίζεται στην παρούσα διατριβή, μόνο το 6.3% εμφάνισε ανιχνεύσιμη συχνότητα ειδικών για αυτό CTL. Εκτός όμως από τη μικρή αναλογία των ασθενών στους οποίους εμφάνισε αυξημένη συχνότητα, η μέση τιμή της συχνότητας των ειδικών για αυτό CTL στους HER-2/neu^+ ασθενείς δεν διέφερε σημαντικά από τους HER-2/neu^- ασθενείς και τους υγιείς δότες, σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα πεπτίδια που εξετάσαμε. Το γεγονός αυτό δεν σημαίνει ότι η χρήση του σε εμβολιασμό δεν μπορεί να αυξήσει πολύ την αναλογία του ώστε να μπορέσει να δράσει ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, όπως έχει ήδη παρουσιαστεί για τα πεπτίδια HER-2 (369-377) και HER-2 (689-697) της ίδιας πρωτεΐνης [Disis et al, 2002; Knutson et al, 2001].

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα, των οποίων η συχνότητα στο περιφερικό αίμα είναι σχετικά υψηλή, δεν είναι ανεργικά, αλλά έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν λύση τόσο των αυτόλογων DC που φέρουν το αντίστοιχο πεπτίδιο, όσο και των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Η λύση των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων υποδεικνύει ότι οι χρησιμοποιούμενοι επίτοποι εκφράζονται φυσικά (naturally processed) στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων όλων των τύπων καρκίνου που μελετήσαμε, καθώς και ότι τα $CD8^+$ Τ κύτταρα είναι λειτουργικά και μπορούν να δράσουν ενάντια στον αυτόλογο όγκο. Το γεγονός ότι η κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν δε φτάνει σε πολύ υψηλά επίπεδα, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η κυτταροτοξική δράση εκτιμήθηκε μετά από μικρή

διάρκεια ενεργοποίησης (8 ημέρες). Μεγαλύτερη διάρκεια καλλιέργειας με επαναλαμβανόμενες ενεργοποιήσεις δύναται να αυξήσει πολύ την ικανότητα κυτταροτοξικής δράσης [Brossart et al, 1998; Rongcun et al, 1999].

Η ερώτηση που μένει αναπάντητη και αποτελεί σημείο συζήτησης, είναι κατά πόσον θα μπορούσε να εφαρμοστεί ενεργητική ανοσοποίηση εμβολιασμού με HER-2/neu πεπτίδια σε ασθενείς που παρουσιάζουν χαμηλές έως μη ανιχνεύσιμες συχνότητες των CTL για τα συγκεκριμένα πεπτίδια. Δηλαδή αν, εκτός από την έκφραση των κατάλληλων αλληλίων HLA και της υπερέκφρασης ή μη της HER-2/neu, και η συχνότητα των CTL στο περιφερικό αίμα ως προς ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο της HER-2/neu αποτελεί έναν επιπλέον περιοριστικό παράγοντα ως προς την επιλογή της ομάδας των ασθενών που θα συμμετέχουν σε πρωτόκολλα εμβολιασμού. Το γεγονός ότι επιτεύχθηκε, αναπτύσσοντας μια πολύ ευαίσθητη τεχνική, να διαπιστωθούν αυξημένα ποσοστά ασθενών με υψηλές συχνότητες ενάντια των εξεταζόμενων HER-2/neu πεπτιδίων βοηθάει σημαντικά στην επιλογή ενισχυμένου αριθμού ασθενών.

Επανεξετάζοντας το θέμα των ασθενών που δείχνουν χαμηλές έως μη ανιχνεύσιμες συχνότητες CTL προς τα HER-2/neu πεπτίδια, θα ήταν σκόπιμο να αναφερθεί ότι αυτοί δεν ανήκουν κατ' ανάγκη σε ομάδες αποκλεισμού από τα πρωτόκολλα εμβολιασμού. Και αυτό διότι σε ήδη ανακοινωθείσες εργασίες [Knutson et al, 2001] ασθενείς με μηδενικές συχνότητες CTL προς συγκεκριμένα πεπτίδια της HER-2/neu, κατόπιν εμβολιασμού με τα συγκεκριμένα πεπτίδια ή άλλα μεγαλύτερα που συμπεριλάμβαναν στην αλληλουχία τους αυτά τα ίδια, αύξησαν σημαντικά το ποσοστό των ειδικών CTL στο περιφερικό αίμα. Αυτό το αποτέλεσμα αποδεικνύει ότι όντως υπάρχουν Τ κλώνοι που αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα HER-2/neu πεπτίδια και οι οποίοι παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων των πεπτιδίων στο αίμα (κατόπιν εμβολιασμού) ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και έτσι εμφανίζονται σε αυξημένα ποσοστά. Γίνεται βέβαια αντιληπτό ότι ασθενείς που εμφανίζουν ήδη αυξημένες συχνότητες των CTL προς ορισμένα HER-2/neu πεπτίδια έχουν ήδη υποστεί «αυτοεμβολιασμό» από τον αυτόλογο όγκο. Αυτοί οι ασθενείς ίσως, κατόπιν εμβολιασμού με τα συνθετικά πεπτίδια, παρουσιάσουν καλύτερες κλινικές απαντήσεις, λόγω ακριβώς της επιπλέον αύξησης του ποσοστού των ειδικών CTL και για αυτό το λόγο, πρέπει να προτιμηθούν σε πιλοτικά κλινικά πρωτόκολλα χωρίς όμως βέβαια να αποκλεισθούν και εκείνοι με χαμηλά ποσοστά των ίδιων κυττάρων.

Συμπερασματικά, με βάση τα δεδομένα των ερευνών διεθνώς, η ανοσοθεραπεία παρουσιάζεται ως ένας νέος αποτελεσματικό τρόπος θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου. Η σημαντική πρόοδος που έχει επιτευχθεί στους τομείς της μοριακής βιολογίας και της γενετικής έχει οδηγήσει στην κατανόηση σε μεγάλο βαθμό των αλληλεπιδράσεων καρκίνου και ανοσολογικού συστήματος. Είναι πλέον διαθέσιμη πληθώρα χαρακτηρισμένων καρκινικών αντιγόνων και η ερευνητική δραστηριότητα επικεντρώνεται στην επιλογή των βέλτιστων επιτόπων και του καταλληλότερου τρόπου παρουσίασης αυτών στα Τ λεμφοκύτταρα, καθώς και στο ρόλο των APC, των συνδιεγερτικών μορίων, των σημάτων κινδύνου και των κυτταροκινών. Κατασκευασμένα με γενετική μηχανική μονοκλωνικά αντισώματα και διαλυτοί συνδιεγερτικοί παράγοντες, καρκινικά και δενδριτικά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί για την επαγωγή ειδικής ανοσολογικής απάντησης με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών θέτουν το πλαίσιο σχεδιασμού των νέων κλινικών δοκιμών, ώστε να καθοριστεί το βέλτιστο σύστημα δημιουργίας και παροχής εμβολίων κατά του καρκίνου. Η πρόκληση που μας δίνεται είναι να εκτιμήσουμε την αποτελεσματικότητα των στρατηγικών αυτών και να βελτιστοποιήσουμε την κλινική τους χρήση.

Για να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα των εμβολίων κατά του καρκίνου, πρέπει να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη δραστική φάση της ανοσολογικής απάντησης, όπως και τη σχέση ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και το περιβάλλον τους. Η χρησιμοποίηση εμβολίων που περιέχουν πολλούς επιτόπους, ώστε να ενεργοποιούνται ταυτόχρονα τόσο τα Th όσο και τα CTL, η χρήση κατάλληλων ανοσοενισχυτικών, ώστε να ισχυροποιείται η ανοσογονικότητα του εμβολίου, η ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων παρακολούθησης της απόκρισης του ασθενούς, καθώς και η εφαρμογή τους σε ασθενείς με περιορισμένο καρκινικό φορτίο, αποτελούν τα επόμενα βήματα στη διερεύνηση της βέλτιστης χρήσης των εμβολίων στη θεραπεία του καρκίνου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

13. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADCC Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, Εξαρτώμενη από τα αντισώματα κυτταροτοξικότητα

APC Antigen Presenting Cells, Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

CCR7 C-Chemokine Receptor 7, Υποδοχέας-7 της C-χημειοκίνης

CD Cluster of Differentiation, Ομάδα διαφοροποίησης λεμφοκυττάρων

CDR Complementary Determining Region, Περιοχή καθορισμού συμπληρωματικότητας του υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων

CLIP Class II- associated Ii-chain Peptide, Τμήμα της Ii που καταλαμβάνει την αύλακα του μορίου MHC τάξης ΙΙ

cpm counts per minute, Κρούσεις ανά λεπτό

CTL Cytotoxic T Lymphocytes, Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα

DC Dendritic Cells, Δενδριτικά κύτταρα

DMEM Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO Διμεθυλσουλφοξείδιο

DP Double Positive, Διπλά θετικά κύτταρα (για δύο επιφανειακά μόρια)

EBV Epstein-Barr Virus, Ιός Epstein-Barr

ELISA Enzyme-Linked ImmunoAssay, Ανοσοενζυμική δοκιμασία δέσμευσης ενζύμου

ELISPOT Enzyme-Linked Immunosorbent Spot, Ανοσοενζυμική δοκιμασία δέσμευσης ενζύμου σε μορφή κηλίδας

ErbB transforming avian Erythroblastosis virus gene, Γονίδιο του ιού ερυθροβλάστωσης των πτηνών (πρώτη ονομασία της πρωτεΐνης HER-2/neu)

FCS Fetal Calf Serum, Βόειος εμβρυϊκός ορός

FITC Fluorescein Isothiocyanate, Ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη

GM-CSF Granulocyte-Macrophages Cell Stimulating Factor, Παράγοντας ενεργοποίησης κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων

HBSS Hank's Balanced Salt Solution

HLA Human Leukocyte Antigens, Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα

HER Human Epidermal growth factor Receptor, Ανθρώπινος υποδοχέας του επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα

IFN Interferon, Ιντερφερόνη

Ig Immunoglobulin, Ανοσοσφαιρίνη

IL Interleukin, Ιντερλευκίνη

Ii Invariant Chain, Αμετάβλητη αλυσίδα μορίου MHC τάξης II

IU International Unit, Διεθνείς μονάδες

KIR Killer Immunoglobulin-like Receptors, Υποδοχείς κυτταρικής λύσης με μορφή ανοσοσφαιρίνης

LCL Lymphoblastoid Cell Line, Λεμφοβλαστοειδής κυτταρική σειρά

MHC Major Histocompatibility Complex, Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας

NK Natural Killer cells, Φυσικά φονικά κύτταρα

NKT Natural Killer T cells, Φυσικά φονικά -Τ κύτταρα

OD Optical Density, Οπτική πυκνότητα

PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells, Μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος

PBS Phosphate Buffer Saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων

PCR Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PE Phycoerythrin, Φυκοερυθρίνη

PECy5 Phycoerythrin-Cyanogen-5, Φυκοερυθρίνη-κυανογόνο 5

PHA Phytohemagluttinin, Φυτοαιμοσυγκολλητίνη

RPMI Rosweli Park Memorial Institute

SEREX Serologic analysis of recombinant cDNA expression libraries, Ορολογική ανάλυση βιβλιοθηκών ανασυνδυασμένου DNA

SI Stimulation Index, Δείκτης ενεργοποίησης

TAA Tumor Associated Antigen, Καρκινικό αντιγόνο

TAP Transporter Associated with Processing, Μόριο μεταφοράς πεπτιδίων κατά την επεξεργασία των αντιγόνων

TCR T-Cell Receptor, Υποδοχέας Τ κυττάρων

TGF Transforming Growth Factor, Παράγοντας μεταβολής της αύξησης

Th T-helper, Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα

TH1 Κυτταρικός τύπος ανοσοαπόκρισης

TH2 Χυμικός τύπος ανοσοαπόκρισης

TIL Tumor Infiltrating Lymphocytes, Διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα

TNF Tumor Necrosis Factor, Παράγοντας νέκρωσης όγκων

Tr1 Type 1 T regulatory cells, Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 1

14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahlers JD, Belyakov IM, Thomas EK, Berzofsky JA: High-affinity T helper epitope induces complementary helper and APC polarization, increased CTL, and protection against viral infection. J Clin Invest 2001; 108: 1677-1685

2. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K and Yamamoto T: The product of the c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science 1986; 232: 1644-1646

3. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJK: NK cells and the tumor microenvironment: Implications for NK-cell function and anti-tumor activity. Trands Immunol 2003; 24: 603-609

4. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997; 25: 3389-3402

5. Alroy I and Yarden Y: The ErbB signalling network, in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Lett 1997; 410: 83-86

6. Anderson BW, Kudelka AD, Honda T, Pollack MS, Gershenson DM, Gillogly MA, Murray JL and Ioannides CG: Induction of determinant spreading and of Th1 responses by in vitro stimulation with HER-2 peptides. Cancer Immunol Immunother 2000; 49: 459-468

7. Armstrong AC, Eaton D and Ewing JC: Cellular immunotherapy for cancer. BMJ 2001; 323: 1289-1293

8. Bach JF: Regulatory T cells under scrutiny. Nat Rev Immunol 2003; 3: 189-198

9. Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M: Tumor-specific $CD4^+$ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. J Immunol 2000; 164: 3902-3912

10. Baxevanis CN, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Katsoulas HL and Papamichail M: HER-2/neu-derived peptide epitopes are also recognized by cytotoxic $CD3^+CD56^+$ (natural killer T) lymphocytes. Int J Cancer 2002; 98: 864-872

11. Baxevanis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN and Papamichail M: Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 2004; 53: 166-175

12. Bennett SRM, Carbone FR, Karamalis F, Miller JFAP and Heath WR: Induction of a $CD8^+$ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate $CD4^+$ T cell help. J Exp Med 1997; 186: 65-70

13. Blake J, Johnston JV, Hellstrom KE, Marquardt H, Chen L: peptide libraries to construct functional mimics of tumor epitopes recognized by MHC class I-restricted cytolytic T lymphocytes. J Exp Med 199; 184: 121-130

14. Boon T, Coulie PG and Van den Eynde B: Tumor antigens recognized by T cells. Immunol Today 1997; 18: 267-268

15. Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W: hER-2/neu derived peptides are tumor associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. Cancer Res 1998; 58: 732-736

16. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt UL, Kanz L, Brugger W: Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. Blood 2000; 96: 3102-3108

17. Carbone FR, Kurts C, Bennett SRM, Miller JFAP and Heath WR: Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. Immunol Today 1998; 19: 368-373

18. Carter P: Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. Nat Rev Cancer 2001; 1: 118-129

19. Chazin U, Kaleko M and Miller A: Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor. Oncogene 1992; 7: 1859-1866

20. Chaux P, Vantomme V, Stroobant V, Thielemans K, Corthals J, Luiten R, Eggermont AM, Boon T, van der Bruggen P: Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to $CD4^+$ T lymphocytes. J Exp Med 1999; 189: 767-778

21. Cheever MA, Disis ML, Bernhard H, Gralow JR, Hand SL, Huseby ES, Qin HL, Takahashi M, Chen W: Immunity to oncogenic proteins. Immunol Rev 1995; 145: 33-59

22. Coley WB: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. Am J Mad Sci 1893; 105: 487-511

23. Costello R, Imbert J, Olive D: Interleukin-7, a major T-lymphocyte cytokine. Eur Cytokine Netw 1993; 4: 253-262

24. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A and Ullrich A: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. Science 1985; 230: 1132-1139

25. Davis MM: Serial engagement proposed. Nature 1995; 375: 104

26. D'Elios M and Del Prete G: Th1/Th2 balance in human disease. Transplant Proc 1998; 30: 2373-2377

27. Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB, Moe R and Cheever MA: Existent T cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. Cancer Res 1994; 54: 16-20

28. Disis ML, Grabstein KH, Sleath DR and Cheever MA: Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. Clin Cancer Res 1996; 5: 1289-1297

29. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Menard S, Cheever MA: High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. J Clin Oncol. 1997; 15: 3363-3367

30. Disis ML, Knutson KL, Schiffman K, Rinn K and McNeel DG: Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. Breast Cancer Res Treat 2000; 62: 245-252

31. Disis ML and Schiffman K: Cancer vaccines targeting the HER2/*neu* oncogenic protein. Semin Oncol 2001; 28 (suppl 18): 12-20

32. Disis ML, Gooley TA, Rinn K, Davis D, Piepkorn M, Cheever MA, Knutson KL and Shiffmann K: Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. J Clin Oncol 2002; 20: 2624-2632

33. Eliopoulos P, Mohammed MQ, Henry K and Petsas S: Overexpression of HER-2 in thick melanoma. Melanoma Res 2002; 12(2): 139-145

34. Fayolle C, Deriaud E, Leclerc C: In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires $CD4^+$ T cell help. J Immunol 1991; 147: 4069-4073

35. Fehniger TA and Caligiuri MA: Interleukin 15: biology and relevance to human disease. Blood 2001; 97: 14-32

36. Finn OJ: Cancer vaccines: Between the idea and the reality. Nat Rev Immunol 2003; 3: 630-641

37. Fisk B, Blevins TL, Wharton JT and Ioannides CG: Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. J Exp Med 1995; 181: 2109-2117

38. Fisk B, Hudson JM, Kavanagh J, Wharton JT, Murray JL, Ioannides CG and Kudelka AP: Existent proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and ovarian cancer patients to HER-2 peptides. Anticancer Res 1997; 17: 45-53

39. Forgue-Lafitte ME, Horvat A and Rosselin G: Insulin binding by a cell line (HT-29) derived from human colonic cancer. Mol Cell Endocrinol 1979; 14: 123-130

40. Forni G, Lollini PL, Musiani P and Colombo MP: Immunoprevention of cancer: Is it time ripe? Cancer Res 2000, 60: 2571-2575

41. Fountzilas G, Razis E, Tsavdaridis D, Karina M, Labropoulos S, Christodoulou C, Mavroudis D, Gogas H, Georgoulias V, Skarlos D: Continuation of transtuzumab beyond disease progression is feasible and safe in patients with metastatic breast cancer: a retrospective analysis of 80 cases by the Hellenic cooperative oncology group. Clin Breast Cancer 2003; 4: 120-125

42. Foy TM, Fanger GR, Hand S, Gerard C, Bruck C and Cheever MA: Designing HER2 vaccines. Semin Oncol 2002; 29 (suppl 11): 53-61

43. Gao FG, Khammanivong V, Liu WJ, Leggatt GR, Frazer IH, Fernando GJP: Antigen-specific $CD4^+$ T-cell help in required to activate a memory $CD8^+$ T cell to a fully fynctional tumor killer cell. Cancer Res 2002; 62: 6438-6441

44. Geginat J, Sallusto F and Lanzavecchia A: Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory $CD4^+$ T cells. Pathol Biol 2003; 51:64-66

45. Gold P and Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J Exp Med 1965; 122: 467-481

46. Greenberg PD: Adoptive T cell therapy of tumors: Mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. Adv Immunol 1991; 49: 281

47. Gritzapis AD, Mamalaki a, Kretsovali A, Papamatheakis J, Belimezi M, Perez SA, Baxevanis CN and Papamichail M: Redirecting mouse T hybridoma against human breast and ovarian carcinomas: in vivo activity against HER-2/neu expressing cancer cells. Br J Cancer 2003; 88: 1292-1300

48. Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet SS, Alves P, Benneceur-Griscelli A, Faure O, Guillaume P, Firat HH, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K: High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. J Clin Invest 2004; 113: 425

49. Groux H: An overview of regulatory T cells. Microbes Infect 2001; 3: 883-889

50. Hadler T, Pawelec G, Kirkin AF, Zeuthen J, Meyer HE, Kun L and Kalbacher H: Isolation of novel HLA-DR restricted potential tumor-associated antigens from the melanoma cell line FM3. Cancer Res 1997; 57: 3238-3244

51. Hampton TA, Conry RM, Khazaeli MB, Shaw DR, Curiel DT, Lo Buglio AF and Strong TV: SEREX analysis for tumor antigen identification in a mouse model of adenocarcinoma. Cancer Gene Ther 2000; 7: 446-455

52. Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Randall TD and Swain SL: CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. Proc Natl Acad Sci USA 2003; In press

53. Hellstrom I, Hellstrom KE, Pierce GE and Yang JMS: Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. Nature 1968; 220: 1352-1354

54. Hennecke J and Wiley DC: T cell receptor-MHC interactions up close. Cell 2001; 104: 1-4

55. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D and Levitsky H: The general role of $CD4^+$ T cells in the antitumor immune response. J Exp Med 1998; 188: 2357-2368

56. Hurwitz AA, Kwon ED and van Elsas A: Costimulatory wars: the tumor menace. Curr Opin Immunol 2000; 12: 589-596

57. Hynes NE, Stem DF: The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta. 1994; 1198: 165-184

58. Janeway CA, Travers P, Walport M and Schlomchik M: Immunobiology, 5th edition, 2001, Garland Publishing, New York and London

59. Kaech SM, Wherry EJ and Ehmed R: Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. Nat Rev Immunol 2002; 2: 251-262

60. Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Sette A, Celis E. Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocytes epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. Cancer Res 1999; 59: 431-435

61. Kiyokawa N, Yan D-H, Brown ME and Hung M-C: Cell cycle-dependent regulation of $p185^{neu}$: A relationship between disruption of this regulation and transformation. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 1092-1096

62. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A and Vanky F: Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. Int J Cancer 1976; 18: 421-431

63. Knutson KL, Schiffman K and Disis ML: Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8-T cell immunity in cancer patients. J Clin Invest 2001; 107: 477-484

64. Knutson KL, Shiffman K, Cheever MA and Disis ML: Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. Clin Cancer Res 2002; 8: 1014-1018

65. Kobayashi H, Wood M, Song Y, Appelle E and Celis E: Defining promiscuous MHC class II helper T-cell epitopes for HER-2/neu tumor antigen Cancer Res 2000; 60: 5228-5236

66. Kobayashi H, Lu J, Celis E: Identification of helper T-cell epitopes that encompass or lie proximal to cytotoxic T-cell epitopes in the gp100 melanoma tumor antigen. Cancer Res 2001; 61: 7577-7584

67. Kono K, Rongcun Y, Charo J, Ichihara F, Celis E, Sette A, Appellia E, Sekikawa T, Matsumoto Y Kiessling R: Identification of HER-2/neu-derived peptide epitopes recognized by gastric cancer-specific cytotoxic T lymphocytes. Int J Cancer 1998; 78: 202-208

68. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Guddo F, Kaklamanis L, Vignola M, Kakolyris S, Turley H, Georgoulias V, Bonsignore G, Gatter KC, Harris AL: c-erb-B and epsialin challenge host immune response by HLA-class I expression in human non-small-cell lung cancer. J Immunother 2000; 23: 104-114

69. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU; Proof of principle study investigators: A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. N Engl J Med 2002; 347: 1645-1651

70. Kuby J: Immunology. WH Freeman and Co, New York. 1992

71. Kunzendorf U, Tran TH and Bulfone-Paus S: The Th1-Th2 paradigm in 1998: law of nature or rule with esceptions. Nephrol Dial Transplant 1998; 13: 2445-2448

72. Lechler R, Aichinger G and Lightstone L: The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. Immunol Rev 1996; 151: 51-79

73. Levine BL, Bernstein WB, Connors M, Craighead N, Lindsten T, Tompson CB and June CH: Effects of CD28 costimulation on long term proliferating $CD4^+$ T cells in the absence of exogenous feeder cells. J Immunol 1997; 159: 5921-5930

74. Linehan DC, Goedegebuure PS, Peoples GE, Rogers SO, Eberlein TJ: Tumor specific and HLA-A2-restricted cytolysis by tumor associated lymphocytes in human metastatic breast cancer. J Immunol 1995; 155: 4486-4491

75. Litvinov SV, Golovkina TV: Expression of proteins immunologically related to murine mammary tumour virus (MMTV) core proteins in the cells of breast cancer

continuous lines MCF-7, T47D, MDA-231 and cells from human milk. Acta Virol 1989; 33: 137-142

76. Lohrisch C and Piccart M: An overview of HER2. Semin Oncol 2001; 28 (suppl 18): 3-11

77. Lustgarten J, Theobald M, Labadie C, LaFace D, Peterson P, Disis ML, Cheever MA and Sherman LA: Identification of HER-2/neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD8. Hum Immunol 1997; 52: 109-118

78. Matzinger P: Tolerence, danger and the extended family Annu Rev Immunol 1994; 12: 991-1045

79. Maxwell-Armstrong CA, Durrant LG and Scholefield JH: Colorectal cancer vaccines. Br J Surg 1998; 85: 149-154

80. McLellan AD and Kampgen E: Functions of myeloid dendritic cells. Immunol Lett 2000; 72: 101-105

81. Medzhitov R and Janeway CA Jr: Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. Semin Immunol1998; 10: 351-353

82. Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agrest R and Balsari A: HER2 as a prognostic factor in breast cancer. Oncology 2001; 61 (suppl 2): 67-72

83. Meric F, Hung M-C, Hortobagyi GN and Hunt KK: Her-2/ *neu* in the management of invasive breast cancer. J Am Coll Surg 2002; 194(4): 488-501

84. Moingeon P: Cancer vaccines. Vaccine 2001; 19: 1305-1326

85. Muller CR, Ehninger G and Goldmann SF: Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A, HLA-B and HLA-DR based on over 13,000 german blood donors. Hum Immunol 2003; 64: 137-151

86. Murray JL, Przepiorka D and Ioannides C: Clinical trials of HER-2/neu-specific vaccines. Semin Oncol 2000; 27: 71-75

87. Nanda NK, Secarz EE: Induction of anti-self-immunity to cure cancer. Cell 1995; 82: 13-17

88. O ‘Garra A and Arai N: The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. Trends Cell Biol 2000; 10: 542-550

89. Ossendorp F, Mengede E, Camps M, Filius R, Melief CJM: Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. J Exp Med 1998; 187: 693-702

90. Ossendorp F, Toes REM, Offringa R, van der Burg SH and Melief CJM: Importance of $CD4^+$ T helper cell responses in tumor immunity. Immunol Lett 2000; 74: 75-79

91. Pardoll DM: Cancer vaccines. Nat Med 1998; 4: 525-531

92. Pardoll D: T cells take aim at cancer. Proc Natl Acad Sci 2002; 99: 15840-15842

93. Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM and Anichini A: Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: What have we achieved? Where are we going? J Natl Cancer Inst 2002; 94: 805-818

94. Pawelec G, Zeuthen J and Kiessling R: Escape from host-antitumor immunity. Crit Rev Oncog 1997; 8: 111-141

95. Peiper M, Goedegebuure PS, Linehan DC, Ganguly E, Douville CC, Eberlein TJ: The HER-2/neu-derived peptide p654-662 is a tumor associated antigen in human pancreatic cancer recognized by cytotoxic T lymphocytes. Eur J Immunol 1997; 27: 1115-1123

96. Perez SA, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NM, Mamalaki A, Gritzapis AD, Echner H, Voelter W, Pawelec G, Papamichail M and Baxevanis CN: HER-2/neu-derived peptide 884-899 is expressed by human breast, colorectal and pancreatic adenocarcinomas and is recognized by in-vitro-induced specific $CD4^+$ T cell clones. Cancer Immunol Immunother 2002; 50: 615-624

97. Perez SA, Sotiropoulou PA, Gkika DG, Mahaira LG, Niarchos DK, Gritzapis AD, Kavalakis YG, Antsaklis AI, Baxevanis CN and Papamicahil M: A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. Blood 2003; 101: 3444-3450

98. Perez-Diez A and Marincola FM: Immunotherapy against antigenic tumors: a game with a lot of players. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 230-240

99. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A and Larsimont D: The predictive value of HER2 in breast cancer. Oncology 2001; 61 (suppl 2): 73-82

100. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG: Amplification and overexpression of HER-2/*neu* in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. Cancer Res 1994; 54: 5675-5682

101. Rammensee H-G, Friede T and Stevanovic S: MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics 1995; 41: 178-228

102. Ravdin P: The use of HER2 testing in the management of breast cancer. Semin Oncol 2000; 27 (suppl 9): 33-42

103. Read S and Powrie F: $CD4^+$ regulatory T cells. Curr Opin Immunol 2001; 13: 644-649

104. Reddehase MJ, Jonjic S, Weiland F, Mutter W, Koszinowski UH: Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. J Virol 1988; 62: 1061-1065

105. Reese DM and Slamon DJ: HER-2/*neu* signal transduction in human breast and ovarian cancer. Stem Cells 1997; 15: 1-8

106. Reimann J and Schirmbeck R: Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. Immunol Rev 1999; 172: 131-152

107. Renner C, Trumper L and Pfeundschuh: Tumor vaccines: a new immunotherapeutic approach in oncology. Ann Hematol 2000; 79: 651-659

108. Reya T: Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. Recent Prog Horm Res 2003; 58; 283-295

109. Ridge JP, Di Rosa F and Matzinger P: A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a $CD4^+$ T-helper and a T-killer cell. Nature 1998; 393: 474-478

110. Rishi AK, Gerald TM, Shao ZM, Li XS, Baumann RG, Dawson MI and Fontana JA: Regulation of the human retinoic acid receptor alpha gene in the estrogen receptor negative human breast carcinoma cell lines SKBR-3 and MDA-MB-435. Cancer Res 1996; 56: 5246-5252

111. Roit I, Brostoff J and Male D: Immunology. Gower Medical Publishing, London. 1992

112. Rongcun Y, Salazar-Onfray F, Charo J, Malmberg KJ, Evrin K, Maes H, Kono K, Hising C, Petersson M, Larsson O, Lan L, Appella E, Sette A, Celis E and Kiessling R: Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. J Immunol 1999; 163: 1037-1044

113. Rosenberg SA: Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature 2001α; 411: 380-384

114. Rosenberg SA: Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. J Iintern Med 2001b; 250: 462-475

115. Russo P, Ottoboni C, Falugi C, Reinhold W, Riou JF, Parodi S and O'Connor PM: Cellular effects of a new farnesyltransferase inhibitor, RPR-115135, in a human isogenic colon cancer cell line model system HCT-116. Ann N Y Acad Sci 1999; 886: 252-256

116. Sakaguchi S: Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. Cell 2000; 101: 455-459

117. Sartor CI: Molecular targets as therapeutic strategies in the management of breast cancer. Semin Radiat Oncol 2002; 12(4): 341-351

118. Scardino A, Alves P, Gross DA, Tourdot S, Graff-Dubois S, Angevin E, Firat H, Chouaib S, Lemonnier F, Nadler LM, Cardoso AA and Kosmatopoulos K: Identification of HER-2/neu immunogenic epitopes presented by renal cell carcinoma and other human epithelial tumors. Eur J Immunol 2001; 31: 3261-3270

119. Scardino A, Gross DA, Alves P, Schultze JL, Graff-Dubois S, Faure O, Tourdot S, Chouaib S, Nadler LM, Lemonnier FA, Vonderheide RH, Cardoso AA, Kosmatopoulos K: HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. J Immunol 2002; 168: 5900-5906

120. Scher HI: HER2 in prostate cancer-a viable target or innocent bystander? J Natl Cancer Inst 2000; 92(23): 1866-1868

121. Schirle M, Weinschenk T and Stevanovic S: Combining computer algorithms and experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens. J Immunol Methods 2001; 257: 1-16

122. Schultze JL, Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS and Vonderheide RH: Tumor immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. Vox Sang 2001; 80: 81-89

123. Seliger B, Maeurer MJ and Ferrone S: Antigen processing machinery breakdown and tumor growth. Immunol Today 2000; 21: 455-464

124. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A and Moudfil K: Dominance and crypticity of T-cell antigenic determinants. Ann Rev Immunol 1993; 11: 729-766

125. Sercarz EE: Driver clones and determinant spreading. Journal of Autoimmunity 2000; 14: 275-277

126. Smyth MJ, Godfrey DI and Trapani JA: A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. Nat Immun 2001; 2: 293-299

127. Sotiriadou R, Perez SA, Gritzapis AD, Sotiropoulou PA, Echner H, Heinzel S, Mamalaki A, Pawelec G, Voelter W, Baxevanis CN and Papamichail M: Peptide HER2 (776-788) represents a naturally processed broad MHC class II-restricted T cell epitope. Brit J Cancer 2001; 85: 1527-1534

128. Sotiropoulou PA, Perez SA, Iliopoulou EG, Missitzis I, Voelter W, Echner H, Baxevanis CN and Papamichail M: Cytotoxic T cell precursor frequencies to HER-2 (369-377) in patients with HER-2/neu positive epithelial tumors. Brit J Cancer 2003α; 89: 1055-1061

129. Sotiropoulou PA, Perez SA, Voelter W, Echner H, Missitzis I, Tsavaris NB, Papamichail M and Baxevanis CN: Natural $CD8^+$ T cell responses against MHC class I epitopes of the HER-2/neu oncoprotein in patients with epithelial tumors. Cancer Immunol Immunother 2003β; 52: 771-779

130. Sprent J and Surh CD: Generation and maintenance of memory T cells. Curr Opin Immunol 2001; 13: 248-254

131. Steinitz M, Bakacs T and Klein G: Interaction of the B95-8 and P3HR-1 substrains of Epstein Barr virus (EBV) with peripheral human lymphocytes. Int J Cancer 1978; 22: 251-257

132. Toes REM, Ossendorp F, Offringa R and Melief CJM: CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. J Exp Med 1999; 189: 753-756

133. Topalian SJ: Tumor immunology. Curr Opin Immunol 2001; 13: 131-133

134. Tourdot S, Scardino A, Saloustrou E, Gross DA, Pascolo S, Cordopatis P, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K: A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. Eur J Immunol 2000; 30: 3411-3421

135. Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. J Exp Med 1992; 76: 1453-1457

136. Trinchieri G: Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adoptive immunity. Annu Rev Immunol 1995; 13: 251-278

137. Trinchieri G: Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection. Curr Opin Immunol 1997; 9: 17-21

138. Tuma RA and Pamer EG: Homeostasis of naïve, eefector and memory CD8 T cells. Curr Opin Immunol 2002, 14: 348-353

139. Tuttle TM, Anderson BW, Thompson WE, Lee JE, Sahin A, Smith TL, Grabstein KH, Wharton T, Ioannides CG and Murray JL: Proliferative and cytokine responses to class II HER-2/neu-associated peptides in breast cancer. Clin Cancer Res 1998; 4: 2015-2024

140. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E and Lanzavecchia A: Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. Nature 1995; 375: 148-151

141. Van den Eynde BJ and Morel S: Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and immunoproteasome. Curr Opin Immunol 2001; 13: 147-153

142. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A and Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 1991; 254: 1643-1647

143. Wang R-F and Rosenberg SA: Human tumor antigens for cancer vaccine development. Immunol Rev 1999a; 170: 85-100

144. Wang R-F, Wang X, Atwood AL, Topalian SL and Rosenberg SA: Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. Science 1999b; 284: 1351-1354

145. Wang S, Bartido S, Yang G, Qin J, Moroi Y, Panageas KS, Lewi J, Houghton AN: A role for a melanosome transport signal in assessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting $CD4^+$ T cell responses. J Immunol 1999c; 163: 5820-5826

146. Wang S-C and Hung M-C: HER2 overexpression and cancer targeting. Semin Oncol 2001a; 28 (suppl 16): 115-124

147. Wang S-C, Zhang L, Hortobagyi GN and Hung M-C: Targeting HER2: Recent developments and future directions for breast cancer patients. Semin Oncol 2001b; 28 (suppl 18): 21-29

148. Wedad H: Testing for HER2 status. Oncology 2001; 61 (suppl 2): 22-30

149. Wybran J, Hellstrom I, Hellstrom KE and Funderberg H: Cytotoxicity of human rosette-forming blood lymphocytes on cultivated human tumor cells. Int J Cancer 1974; 13: 515-521

150. Xia W, Lau Y-K, Zhang H-Z, Xiao F-Y, Johnston DA, Liu A-R, Li L, Katz RL and Hung M-C: Combination of EGFR, HER-2/neu and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. Clin Cancer Res 1999; 5: 4164-4174

151. Yarden Y: Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology 2001a; 61 (suppl 2): 1-13

152. Yarden Y, Sliwkowski: Untangling the ErbB signaling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 127-137

153. Yoshino I, Goedegebuure PS, Peoples GE, Parish AS, DiMaio JM, Lyerly HK, Gazdar AF and Eberlin TJ: HER-2/neu-derived peptides are shared antigens among human non-small lung cancer and ovarian cancer. Cancer Res 1994; 54: 3387-3390

154. Zaks TZ and Rosenberg SA: Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu^{+} tumors. Cancer Res 1998; 58: 4902-4908

155. Zeng G: MHC class II-restricted antigens recognized by CD4^{+} T cells: New strategies for cancer vaccine design. J Immunother 2001; 24: 195-204

156. Zeng G, Li Y, El-Gamil M, Sidney J, Sette A, Wang R-F, Rosenberg SA, Robbins PF: Generation of NY-ESO-1-specific CD4^{+} and CD8^{+} T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: A new strategy for vaccine design. Cancer Res 2002; 62: 3630-3635

157. Zinkernagel RM: Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. Semin Immunol 2000; 12: 163-171

158. Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Noute J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ: Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. J Immunol 2002; 169: 350-358