

# Karsinoembriyonik Antijene Özgül İmmün Yanıtların HLA-A\*0201 Transjenik Fare Modelinde Ölçülmesi ve Değerlendirilmesi

Measurement and Evaluation of CEA-specific Immune Responses in a HLA-A\*0201 Transgenic Mice Model

Emin Ümit Bağrıaçık

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD

**Amaç:** Karsinoembriyonik antijen (CEA) geni taşıyan bir rekombinant vektör aracılığı ile immunize edilen transjenik farelerde, CEA'ye karşı oluşan özgül T lenfosit yanıtını ölçmek ve deneysel parametreleri irdeliyerek değerlendirmek.

**Gereç ve Yöntem:** Rekombinant vektör, ALVAC-CEA ile immunize edilen HLA-A\*0201 (A2) transjenik farelerden dalak hücreleri izole edildi. Kültürlerde özgül CD8+ sitotoksik T lenfositleri aktive etmek ve çoğaltmak için, hücreler iki farklı CEA peptidi ile veya kontrol peptid ile uyarıldı. CEA'ye özgül T lenfosit yanıtlarının ölçülmesinde standart bir değerlendirme işlemi için optimum parametreleri bulmak amacıyla, farklı peptid konsantrasyonları ve farklı hücre sayıları test edildi. T lenfosit cevabı, IFN- $\gamma$  salgısı olarak ELISPOT yöntemi ile ölçüldü.

**Bulgular:** ALVAC-CEA ile aşılaman transjenik fareler, CEA'ye özgül olan etkin T lenfosit yanıtları oluşturdu. Oluşan yanıtların optimal seviyelerde ölçülebilmesi için, hücre sayısı ve uyarıcı peptid miktarı gibi parametre değerlerinin kullanılan yöntem açısından önemli olduğu saptandı.

**Sonuç:** CEA'ye özgül yanıtların ölçülmesinde deneysel parametreler tam olarak optimize edilmelidir. Özgül T lenfosit yanıtlarının oluşumunda etkin bir vektör olan ALVAC-CEA, CEA ekspres eden tümörlerin tedavisinde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: **CEA, HLA-A\*0201 transjenik fare**

**Aim:** To measure specific T cell responses against to carcinoembryonic antigen (CEA) in transgenic mice that were immunized by a recombinant vector expressing CEA gene, and to evaluate experimental parameters.

**Materials and Methods:** Splenocytes were isolated from spleens of HLA-A2 transgenic mice that were immunized with a recombinant vector, ALVAC-CEA. Cells were pulsed with an irrelevant peptide for controls or with two different CEA-specific peptides to activate and expand CEA-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cultures. Various concentrations of peptides and various cell numbers were tested to find optimum parameters for a standard evaluation procedure of measuring CEA-specific T cell responses. Responding T cells were assessed by IFN- $\gamma$  secretion in ELISPOT assay.

**Results:** Transgenic mice immunized by ALVAC-CEA developed efficient specific T-cell responses to CEA. Parameters such as peptide concentration and cell number used in vitro experimental procedure were found to be significant in terms of obtaining optimal measurements.

**Conclusion:** Experimental parameters should be optimized to measure CEA-specific T cell responses. ALVAC-CEA is an efficient vector to induce specific T cell responses. Therefore, it can be a very useful vaccine in immunotherapy of cancers that express CEA.

Key Words: **CEA, HLA-A\*0201 transgenic mice, ELISPOT**

Başvuru tarihi: 18.04.2007 - Kabul tarihi: 11.06.2007

İletişim

Emin Ümit Bağrıaçık  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı,  
Beşevler, 06500 Ankara  
Tel : (312) 202 46 48  
E-posta adresi : eubagriacik@yahoo.com

Karsinoembryonik antijen (Carcinoembryonic antigen = CEA), moleküler ağırlığı 180-200 KDa olan ve insanda embryonal safhalarda eksprese edilen bir glikoproteindir (1). Erişkin serumunda CEA miktarlarındaki artış, gelişen bir malignansinin habercisi olarak değerlendirilebilmektedir. Bazı tümör tiplerinin CEA eksprese ettiği yaygın olarak bilindiği için, genel bir tümör antijeni olarak literatürde yer almıştır. Örneğin, gastrointestinal sistem, meme, pankreas ve akciğer kanserlerinin CEA eksprese ettiği bir çok defa rapor edilmiştir (1-3). Üzerinde pek çok çalışma gerçekleştirilen ve bu nedenle, biomoleküler ve immüno- lojik özellikleri hususunda oldukça fazla bir bilgi birikimi bulunan CEA, bazı tümörlerin tedavisinde hedef antijen olarak önerilmektedir (4).

Rekombinant viral vektörler genetik mühendisliği teknikleriyle genomlarında antijen genlerini taşımak üzere düzenlenebilirler. Böylece çeşitli antijenlere karşı hücrel immün yanıt oluşturulması amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu çalışmada kullanılan rekombinant vektör ALVAC-CEA daha önceden tanımlanmış olan bir vektördür (5). ALVAC-CEA, bazı genleri değiştirilerek virulansı azaltılmış ve insan karsinoembryonik antijen geni transfer edilmiş bir kanarya Pox virusudur. ALVAC-CEA ile oluşturulan enfeksiyon sırasında CEA enfekte hücreler tarafından eksprese edilir. Enfekte hücreler CEA'e ait antijenik peptid epitopları sınıf I human lökosit antijenleri (HLA molekülleri) aracılığı ile CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositlere sunarak, T hücre aktivasyonuna yol açar.

Karsinoembryonik antijene karşı immün yanıt oluşturulması çeşitli hayvan modellerinde çalışılmaktadır. Özellikle

son yıllarda yapılan pre-klinik araştırmalarda insanda oluşan immün yanıtlara yakınlığı açısından, HLA-A\*0201 transjenik fare modelleri tercih edilmektedir (6). Ancak bu tür hayvan modellerinde yapılan araştırma sonuçlarının güvenilirliği açısından, oluşan immün yanıtların ölçülmesi ve değerlendirilmesi için, deneysel parametrelerin belirlenmesi ve standart hale getirilmesi oldukça önem taşımaktadır.

Bu çalışmada ALVAC-CEA aracılığı ile karsinoembryonik antijene karşı immünize edilen HLA-A\*0201 transjenik farelerde oluşan immün yanıtların gerektiği şekilde ölçülerek değerlendirilebilmesi için, deneysel parametrelerin optimizasyonu çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda değerlendirilerek tartışılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Deneysel hayvanı ve immünizasyonlar

Araştırmalarda HLA-A\*0201 (A2) geni içeren 8-10 haftalık dişi transjenik fareler, yerel etik kurul izni ve kurallarına uyularak kullanıldı. Kullanılan transjenik fareler daha önce literatürde tanımlanmıştır (5). Fareler steril ortam koşulları altında deney hayvanları laboratuvarında üretildi (Sunnybrook Women's Health Science Centre, Toronto, Canada). Üç fare, karsinoembryonik antijen geni taşıyan Kanarya Pox Virus (ALVAC-CEA) ile immünize edildi. Birincil (primer) immünizasyonlar, her fareye  $5 \times 10^7$  pfu (plaque forming unit) virusun sub kütan olarak  $100 \mu\text{l}$  fosfat tampunu (PBS) içinde enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. On dört gün sonra ikincil (sekonder) immünizasyonlar aynı şekilde yapıldı. Birincil immünizasyondan 60 gün sonra

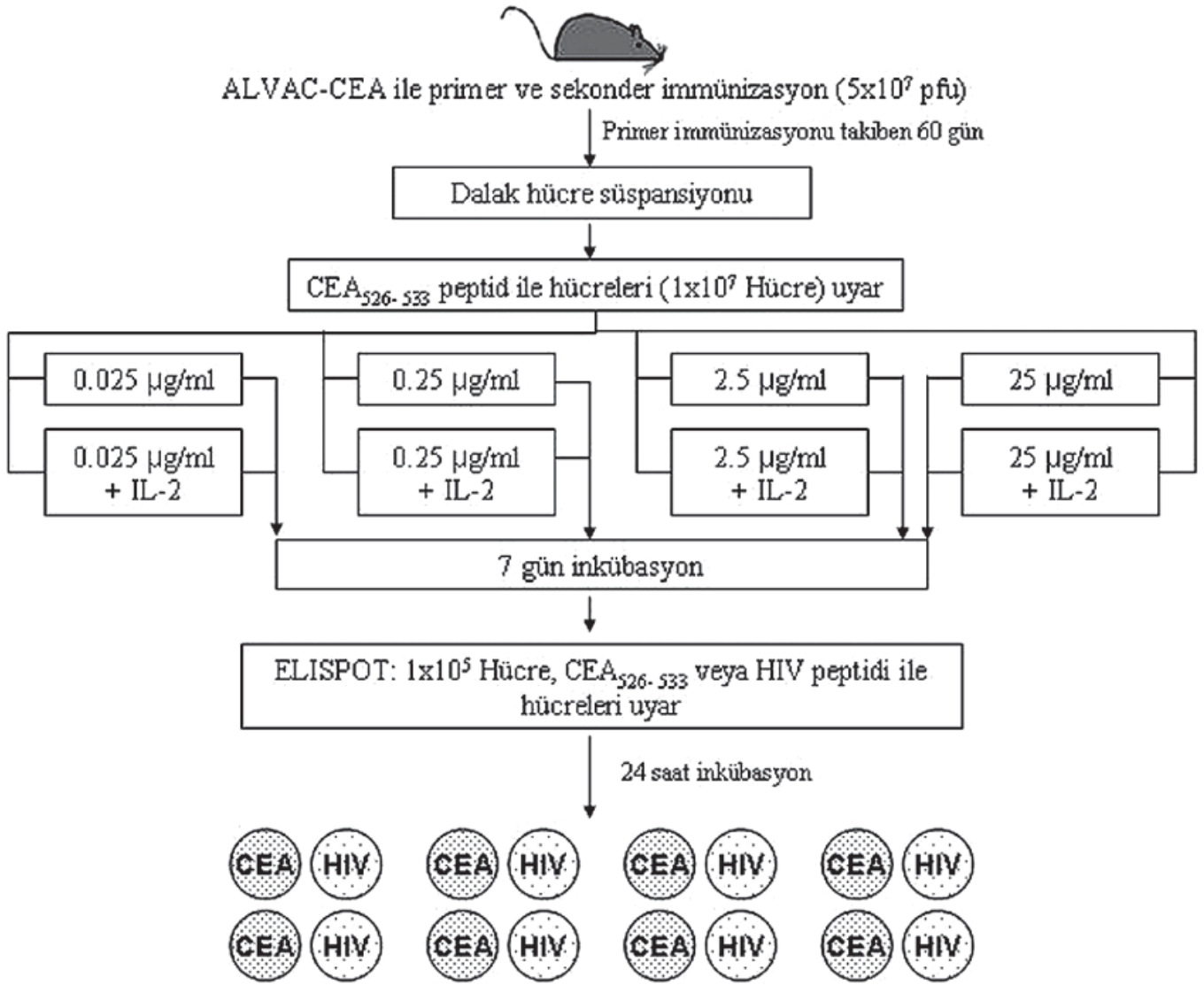
fareler servikal dislokasyon ile öldürülerek dalakları steril koşullar altında çıkartıldı.

### Dalak hücrelerinin hazırlanması ve özgül peptidlerle uyarılması

Dalaklar steril AIM-V serum içermeyen lenfosit besi yeri (Gibco, USA) içinde ezilerek süspansiyon edildi ve ayrıştırıldı. Şekil 1A ve 1B takip edilen deneysel protokolün özetini belirtmektedir. Her bir fareden çıkartılan dalak hücreleri tek bir hücre süspansiyonu olarak havuzlandı. Dalak hücreleri, ( $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$  hücre)  $10 \text{ ml}$  AIM-V lenfosit besi yeri ( $100 \text{ U/ml}$  penisilin,  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomisin,  $2 \text{ mM}$  L-glutamin,  $5 \times 10^{-5} \text{ mM}$  2-merkaptotanol ile suplemante edilmiş, Gibco, USA) içeren  $25 \text{ cm}^2$  kültür flaklarına (Falcon, USA) yerleştirildi. Hücreler karsinoembryonik antijen peptidleri ve  $5 \mu\text{g}$  insan  $\beta_2$ -mikroglobulin (Sigma-Aldrich, USA) ile uyarıldı. Bu peptidlerden biri, CEA<sub>526-533</sub> fare epitopudur ve amino asit dizgesi EAQNTTYL olarak bilinmektedir (6). Diğer peptid CEA'nin HLA-A\*0201 (A2) tarafından sunulan insan epitopudur ve CEA<sub>588-597</sub> (DVLVGPDTPI) olarak bilinir (7). Ayrıca kontrol (irrelevant) peptid olarak, bir HIV peptidi olan p17 Gag<sub>77-85</sub> (SLYNTVATL) kullanıldı (8). Peptidler  $0.025 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ,  $2.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$  gibi farklı konsantrasyonlarda hücre kültürüne ilave edildi. Peptid ilave edilen hücre kültürleri  $37^\circ\text{C}$ 'de, % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 7 gün inkübe edilerek hücreler çoğaltıldı. Bazı kültürler  $20 \text{ IU/ml}$  IL-2 (proleukin) içerdi.

### IFN- $\gamma$ tayini için ELISPOT yöntemi

Test daha önce yayınlanmış bir yön-



Şekil 1. CEA'e karşı özgül immün yanıtın belirlenmesinde hücre kültürlerinde kullanılan konsantrasyonu ve IL-2'nin etkisinin in vitro araştırılması için izlenen deney protokolü özeti.

teme göre, küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (9). Kısaca, çoğaltılan hücreler 96 kuyu içeren ve tabanı anti-fare IFN- $\gamma$  antikoru (BD-Pharmingen, USA) ile kaplanmış olan ELISPOT plaklarına (Millipore, USA) yerleştirildi. Her örnek için iki kuyu kullanıldı. Her kuyuya  $200 \mu\text{l}$  besiyeri içinde  $1 \times 10^5$  hücre ve 0.1 mg/ml peptid ilave edildi. Plaklar  $37^\circ\text{C}$ 'de, % 5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda 20 saat inkübe edildi. Plaklar 5 kez yıkandı ve biotin işaretli anti-fare IFN- $\gamma$  antikoru (BD-Pharmin-

gen, USA) ile inkübe edildi. Beş kez yıkanan plaklar alkalin fosfat işaretli avidin (Sigma-Aldrich, USA) ile ve BCIP/NBT [(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich, USA)] substrat ile inkübe edildi. Plaklar AID ELISPOT okuyucusu (AID GmbH, Germany) kullanılarak okundu.

#### İstatistik analizleri

Deney grupları arasındaki farklılıklar student's t testi veya tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile hesaplanmıştır.  $p < 0.01$  değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

#### Bulgular

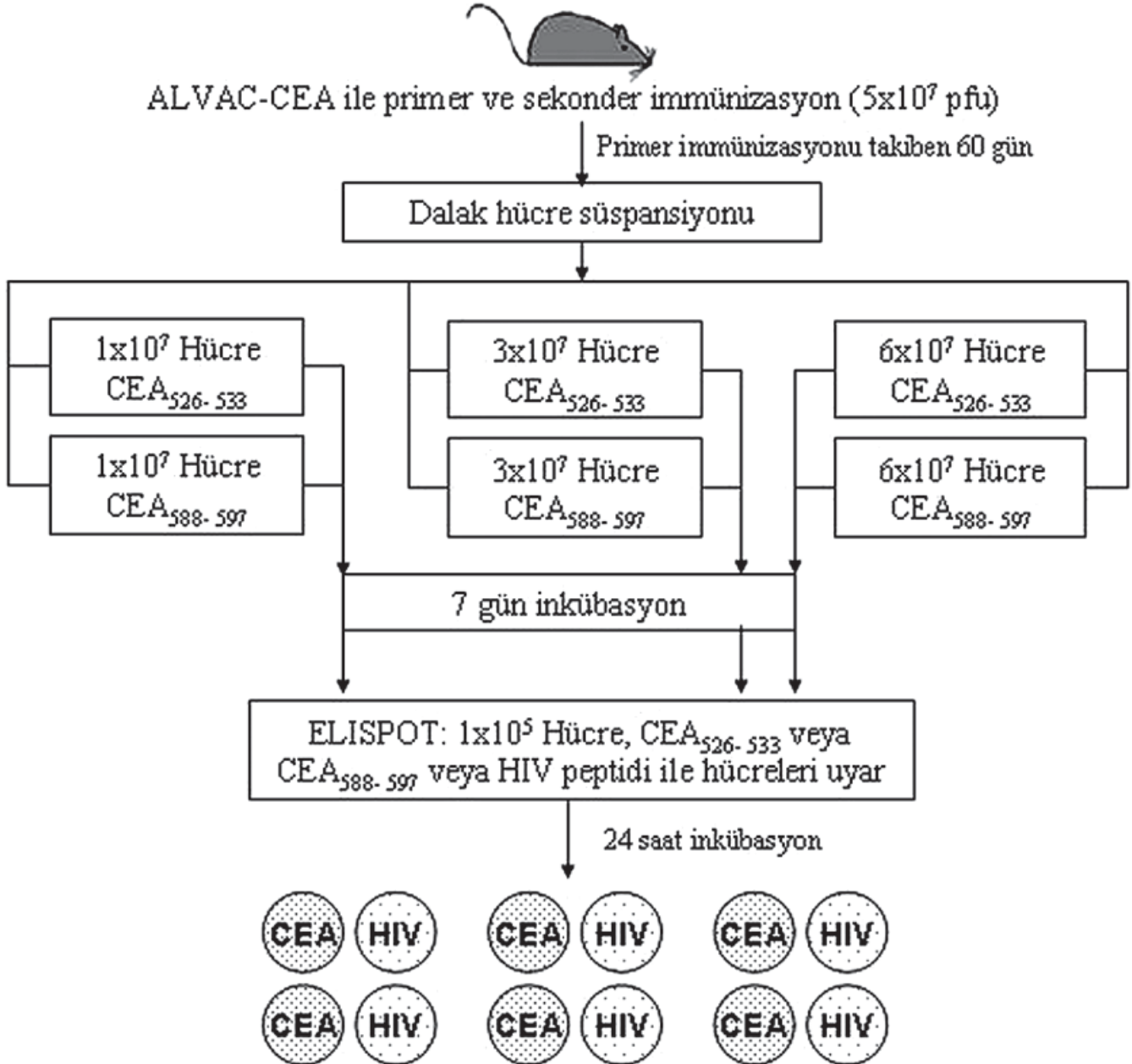
##### Peptid konsantrasyonunun ve IL-2'nin IFN- $\gamma$ salgısına etkisi

ALVAC-CEA ile immünize edilen

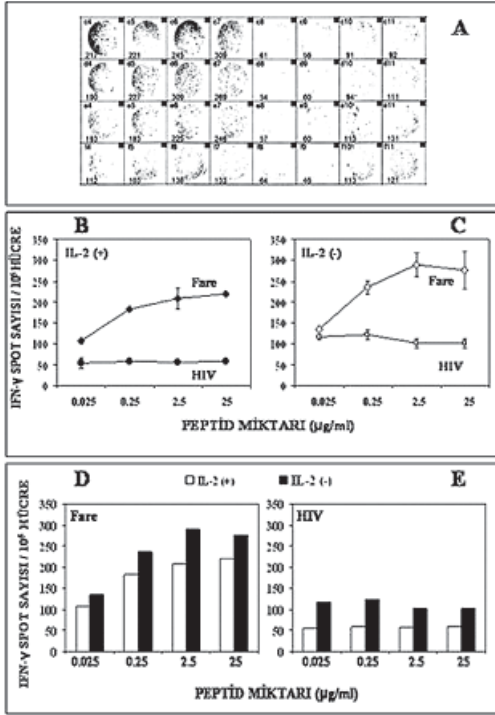
farelerin CEA'ye karşı özgül hücrel immün yanıt oluşturup oluşturmadığının araştırılması için, fare dalaklarından hazırlanan hücre süspansiyonları, CEA'nin fare epitopu olarak bilinen ve fare MHC sınıf I (K<sup>b</sup>) tarafından CD8<sup>+</sup> T lenfositlere sunulan CEA<sub>526-533</sub> peptidinin hücre kültürlerine ilavesi ile uyarıldı. Deneysel proto-

kol şekil 1'de görülen şema ile özetlenmiştir. Çalışılan deney düzenine göre de anlaşılacağı gibi, oluşan immün yanıtın optimum seviyelerde ölçülebilmesi için, kültürlerdeki hücre sayısı ( $1 \times 10^7$ ) sabit tutularak çeşitli deney parametreleri ayrı ayrı test edildi. Örneğin kültürlerde peptid miktarının etkisini bulmak

amacıyla, kültürlerde farklı miktarlarda peptid ilave edildi. Fare epitopu peptidinin (CEA<sub>526-533</sub>) 0.025  $\mu\text{g/ml}$  dozundan başlayarak 25  $\mu\text{g/ml}$  doza kadar 10 kat artan konsantrasyonlarıyla dalak hücreleri uyarıldı. Peptid epitopa karşı oluşan özgül T lenfosit yanıtı, IFN- $\gamma$  salgılayan hücre sayısı (spot) olarak ELISPOT testi ile saptandı.

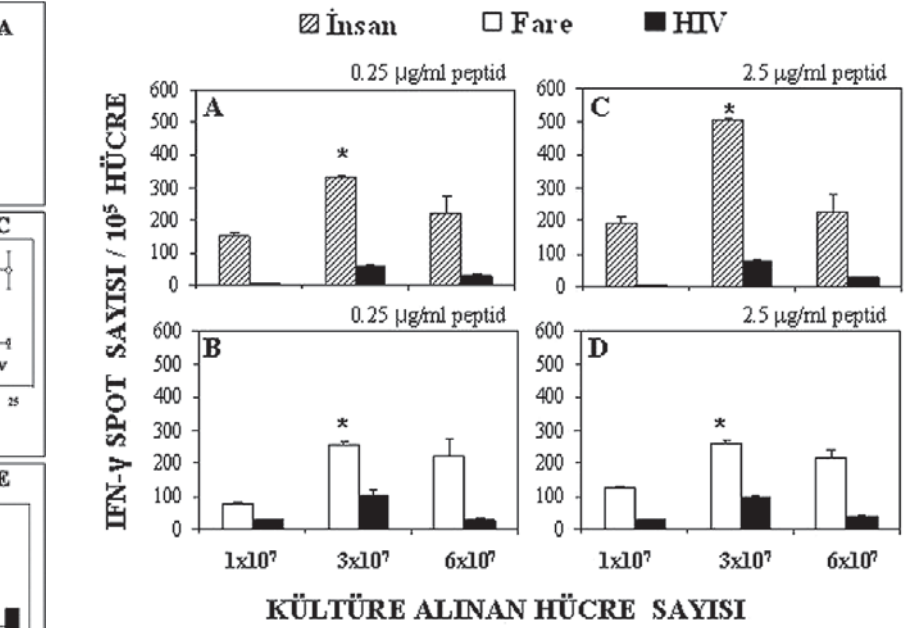


**Şekil 2.** CEA'ye karşı özgül immün yanıtın belirlenmesinde kültürlerinde kullanılan hücre sayısının etkisinin in vitro araştırılması için izlenen deney protokolü özeti. Aynı deney protokolü 0.25  $\mu\text{g/ml}$  peptid konsantrasyonları kullanılarak çalışılmıştır.



**Şekil 3.** CEA'e karşı özgül immün yanıtın belirlenmesinde peptid konsantrasyonu ve IL-2'nin etkisi ALVAC-CEA ile immünize edilen transjenik farelerden izole edilen dalak hücreleri ( $1 \times 10^7$  hücre), fare epitopu (CEA<sub>526-533</sub>) peptid ve kontrol HIV (Gag<sub>77-85</sub>) peptid ile in vitro uyarılarak çoğaltıldı. Kültürlerden toplanan hücrelerin IFN- $\gamma$  salgısı ELISPOT yöntemi ile saptandı. (A) Plak tabanında noktalar (spot)'lar tespit edildi. IL-2 içermeyen (C) kültürlerde farklı dozda kullanılan peptidlerde T lenfosit yanıtı; CEA fare epitopu (D) ve HIV peptidine (E) karşı oluşan yanıtın karşılaştırılması.

IFN- $\gamma$  salgılayan hücreler, plak kuyularının tabanında noktalar (spot) halinde görüntülendi (Şekil 3A). Kullanılan peptid'e karşı herhangi özgül olmayan bir yanıtın ortaya çıkabileceği olasılığını kontrol etmek üzere, daha önceden fare hücrelerinin hiç karşılaşmadığı başka bir peptid (irrelevant peptid, HIV peptidi, Gag<sub>77-85</sub>) kontrol amaçlı olarak kullanıldı. Kontrol HIV peptid ile karşılaştırıldığında, CEA<sub>526-533</sub> peptidinin kullanılan bütün konsantrasyonları ile uyarılan kültürlerde IFN- $\gamma$  salgılayan hücre sayısında artış gözlemlendi (Şekil 3C). Özellikle 0.25, 2.5 ve 25  $\mu\text{g/ml}$



**Şekil 4.** CEA'in insan ve fare T lenfosit epitoplarına karşı oluşan immün yanıtı, kullanılan hücre sayısının etkileri.  $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  ve  $6 \times 10^7$  hücre kullanılarak insan epitopu (CEA<sub>588-597</sub>) peptidin (A) 0.25  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonları ile veya fare epitopu CEA<sub>526-533</sub> peptidin (C) 0.25  $\mu\text{g/ml}$  ve (D) 2.5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonları ile uyarılan kültürlerde özgül T lenfosit yanıtı IFN- $\gamma$  ELISPOT yöntemiyle saptandı. Kontrol olarak HIV (Gag<sub>77-85</sub>) peptidi kullanıldı.

peptid ile uyarılan kültürlerdeki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ( $p < 0.01$ ). Maksimum artış 2.5  $\mu\text{g/ml}$  peptid ile uyarılan kültürde oldu. Dolayısıyla 2.5  $\mu\text{g/ml}$  peptid konsantrasyonunun, kullanılan deneysel koşullar altında, uygulanması gereken optimum doz olarak kabul edilebileceği düşünüldü.

Ayrıca diğer bir parametre olarak, T lenfositler için bir büyüme faktörü olan interlekin 2 (IL-2)'nin kültür ortamında bulunmasının, oluşan özgül immün yanıtı etkisi de araştırıldı. IL-2 varlığında da CEA<sub>526-533</sub> peptidi ile uyarılan kültürlerde IFN- $\gamma$  salgılayan hücre sayısında artış gözlemlendi (Şekil 3B). Kontrol peptid ile karşılaştırıldığında gözlenen artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ( $p < 0.01$ ). Ancak IL-2 içeren ve IL-2 ilave edilmeyen kültürler kendi arasında karşılaştırıldığında, IL-2 ilave edilen kültürlerde IFN- $\gamma$  salgılayan

hücre sayısında azalma olduğu tespit edildi (Şekil 3D). CEA<sub>526-533</sub> peptidi ile uyarılan kültürlerdeki IFN- $\gamma$  miktarında gözlenen bu azalma, aynı zamanda kontrol (HIV) peptid ile uyarılan kültürlerde de gözlemlendi (Şekil 3E).

#### Kültürlerdeki hücre sayısının IFN- $\gamma$ salgısına etkisi

Hücre sayısının IFN- $\gamma$  salgısına etkisini araştırmak ve HLA-A2 tarafından T lenfositlere antijen sunumunun yapıldığını göstermek için, farklı sayılarda hücre içeren kültürler, her kültürde tek bir tip olmak üzere, üç farklı peptid ile uyarıldı. Takip edilen deneysel protokol Şekil 2'de özetlenmiştir. Kontrol peptid (irrelevant peptid, Gag<sub>77-85</sub>) olarak HIV peptidi kullanıldı. Diğer seçilen iki peptid, CEA'nin fare epitopu (CEA<sub>526-533</sub>) ve insan HLA-A2 molekülü tarafından sunulduğu

bilinen epitopu CEA<sub>588-597</sub> dir. Her bir peptidin iki farklı dozu test edildi (0.25 ve 2.5 µg/ml) . Şekil 4A ve 4C de görüldüğü gibi, kontrol peptid ile uyarılan hücrelere kıyasla, insan epitopu ile uyarılan kültürlerde IFN-γ salgılayan hücre miktarlarında istatistiksel olarak önemli artışlar gözlemlendi (p<0.01). IFN-γ salgılayan hücre sayısındaki bu belirgin artış, kültürdeki hücre sayısı ve kullanılan peptid dozu gözlemlenmesinin, bütün kültürlerde tespit edildi. Ancak kültürlerde kullanılan hücre sayısı göz önünde tutulduğunda, en fazla artış 3x10<sup>7</sup> hücre kullanılan kültürlerde gözlemlendi. Kullanılan peptid miktarı açısından karşılaştırıldığında, 2.5 µg/ml peptidle uyarılan kültürde IFN-γ salgılayan hücre miktarı en fazla oldu. Dolayısıyla kültürlerde 2.5 µg/ml peptid ve 3x10<sup>7</sup> hücre kullanımı, CEA'ye özgül immün yanıt (IFN-γ spot sayısı 503 ± 4) ölçülmesinde optimum parametreler olarak saptandı.

Fare epitopu peptid (CEA<sub>526-533</sub>) ile hücreler uyarıldığı zaman da benzer sonuçlar gözlemlendi (Şekil 4B ve 4D). Kullanılan deneysel koşullar altında kültürlerle ilave edilmesi gereken hücre sayısının 3x10<sup>7</sup> hücre olması gerektiği tespit edildi.

## Tartışma

Bu çalışmada CEA geni taşıyan ve ALVAC-CEA olarak adlandırılan vektör ile aşılınmış olan HLA-A2 transjenik farelerde, CEA'ye karşı özgül olarak gelişen hücresel immün yanıt ELISPOT testi kullanılarak ölçüldü. Bunun yanı sıra, oluşan immün yanıtın tam ve doğru olarak tayin edilmesi amacıyla, hücrelerin ayrılmasında kullanılan peptid miktarları veya kullanılan hücre sayıları gibi test parametreleri araştırılarak optimize edildi.

Bir bireyin total lenfositlerinin sayısına kıyasla, immünizasyon sonucu herhangi bir antijene karşı aktive olan özgül T lenfositlerin sayısı oldukça azdır. Bu nedenle özgül hücresel yanıtın oluşup oluşmadığının anlaşılabilmesi için yada yanıtın ölçülebilir hale getirilmesi için, yanıt veren hücrelerin sayısını in vitro koşullarda arttırmak gerekebilir. Bu amaçla araştırmada CEA'nin iki farklı tipte peptid epitopu kullanıldı. CEA ile immünize edilmiş bireylerden elde edilen hücreler, bu antijenin peptid epitoplarıyla yüklendikleri zaman da T lenfositlere antijen sunarak uyarabilmektedir (10). Ancak bu takdirde, CEA'nin bütün epitoplarına özgül olan T lenfositler çoğalmaz. Sadece kullanılan epitopa özgül olan T lenfositler çoğalır. Araştırmada seçilen peptidlerin birisi (CEA<sub>526-533</sub>) fare MHC sınıf I moleküllerinden H-2K<sup>b</sup> tarafından, diğeri (CEA<sub>588-597</sub>) ise insan MHC sınıf I moleküllerinden HLA-A2 tarafından sunulan peptidler olarak bilinmektedir (6, 7). Bu araştırmada kullanılan iki peptid ile özgül T lenfositler çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltma işlemi sırasında bazı deneysel parametrelerin önemli olduğu tespit edildi. Kullanılan peptid miktarlarının ve kültüre alınan hücre sayısının in vitro ortamda fizyolojik bir denge içinde olması gerektiği anlaşıldı. Örneğin, yüksek sayıda (6x10<sup>7</sup>) hücre içeren kültürlerde peptidlere karşı yanıt daha düşük seviyelerde oldu. Bu durum muhtemelen şöyle açıklanabilir: Kültüre alınan hücre sayısının fazla olması, bu hücreler içinde kullanılan CEA epitoplarına özgül olan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Peptid yüklemesiyle yapılan uyarım sonucunda özgül hücreler bölünerek sayıca çoğalacaklardır. Bu reaksiyon zaten sayıca fazla olan bu hücrelerin sayısının kısa bir sürede çok daha fazla seviyelere ulaşmasına neden olacaktır. Fiz-

yolojik koşulların sınırlı olduğu bir kültür ortamında, hücre sayısı ve dolayısıyla metabolizmasındaki ani artış sonucunda hücreler çoğalmalarının pik noktasına çok daha kısa bir süre içinde erişecektir. Ortamdaki fizyolojik koşulların tüketilmesine bağlı olarak zaman içinde metabolik aktivitelerini kaybederek apoptotik hücre ölümüyle yok olacaklardır. Seçilen zaman dilimi sonrasında hücreler çoğaltıldıkları kültürlerden toplanarak ELISPOT yöntemi ile test edildikleri zaman, özgül yanıt veren hücre frekansının en fazla olduğu kültür, hücre çoğalması ve canlı kalması açısından fiziki ve fizyolojik parametrelerin optimum düzeyde yani fizyolojik bir denge halinde olduğu kültür şartlarını içerecektir.

Araştırmada IL-2 içeren kültürlerde, içermeyen kültürlerle kıyasla, peptid antijene yanıt veren hücre sayısında bir azalma olduğu gözlemlendi. Bilindiği gibi IL-2, antijen özgüllüğünden bağımsız bir mekanizma ile T lenfositlerin üremesini etkileyen bir sitokindir. Mitojenik aktivitesi sayesinde T lenfosit üremesini artırır. Bu nedenle aktive edilen T lenfositler IL-2 varlığında çok daha hızlı bir şekilde bölünerek çoğalır. Hücre kültürleri gibi fizyolojik şartlar açısından sınırlı ortamlarda çoğalan T lenfositler birkaç gün içinde ölmeye başlar. Bu durum uyarımın veya aktivasyonun neden olduğu hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır (12). Son yıllarda yapılan çalışmalarda çoğalan T lenfositlerin ölümünün geciktirilmesi amacıyla diğer sitokinlerin işe karışması gerektiğini göstermiştir. Örneğin bu sitokinlerden birisinin IL-15 olduğu gösterilmiştir (13). Bu araştırmada da, IL-2'nin mitojenik etkisi ile T lenfositlerin sayısında ortaya çıkan ani artışa bağlı olarak hücre ölümü gerçekleşmiştir. IL-2 içermeyen kültürlerde ise hücre ölümü

mekanizmaları daha yavaş işlediği için, IL-2 içeren kültürlerle kıyasla, IFN- $\gamma$  salgılayan T hücre sayısında bir azalma ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, CEA'ne karşı oluşan T lenfosit yanıtlarının in vitro ölçülmesi sırasında izlenecek olan deney protokolünde, dışardan IL-2 ilave edilmemesi gerekmektedir. Alternatif olarak, eğer IL-2 ilavesi yapılırsa, bu takdirde kültür süresinin kısaltılması veya ortama IL-15 gibi sitokinlerinde ilave edilmesi, optimal ölçüm sonuçlarının elde edilmesi açısından zaruridir.

Tümör antijenlerine karşı T lenfositlerin aktivasyonu ile ilgili çalışmalarda kullanılan fare modellerlerinde aranan en önemli özelliklerden birisi, insan modeline oldukça yakın bir şekilde tasarlanmış olmasıdır. Bu çalışmada insan reaksiyonlarına yakın bir model olarak insan HLA-A2 geni taşıyan tranjenik fareler kullanılmıştır. HLA-A2 insanın MHC sınıf I molekül tiplerinden birisidir. Bu tür bir farede hücreler, tıpkı insanda olduğu gibi, HLA-A2 üzerinde antijenik peptid epitoplara CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositlere sunma kapasitesine sahiptir. HLA-A2 tarafından sunulan

CEA peptidi (HLA-A2-restricted) ile T hücrelerin aktivasyonu ve IFN- $\gamma$  salgılaması, çalışmada kullanılan fare hücrelerinin HLA-A2 aracılığı ile sunulan CAE'e karşı T lenfosit yanıtının oluşturabildiğinin önemli bir kanıtıdır. Dolayısıyla bu kanıt, ALVAC aracılığı ile insanların CEA'e karşı immünize edilebileceğinin bir göstergesidir. Kullanılan fareler HLA-A2'nin yanı sıra fareye ait olan MHC sınıf I moleküllerini de (H-2K<sup>b</sup>) ekspres etmektedir. Fareye özgül olan peptide karşı hücrelerin yanıt vermesi, CEA epitoplarının fare MHC sınıf I molekülleri tarafından da sunulduğunu göstermiştir.

ELISPOT yöntemi T lenfosit yanıtlarının ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile kuyucuk tabanında tespit edilen her bir nokta (spot), genellikle bir hücrenin salgıladığı sitokinin izi anlamındadır. Bu nedenle ELIPOT yöntemi kullanılan hücre havuzu içinde yanıt veren hücre sayısını, dolayısıyla frekansını belirler. Bu özelliği açısından ELISA yönteminden daha üstün olan bir yöntemdir.

İmmün sistemin tümör antijenlerine

karşı özgül bir şekilde aktivasyonu, henüz deneysel aşamalarda olan kanser tedavi yaklaşımlarından birisidir. Bu tür tedavilerde, üzerinde oldukça yaygın olarak çalışılmış olan ve dolayısıyla biyokimyasal ve immünolojik özellikleri çok iyi anlaşılmış olan tümör antijenleri çeşitli (vektörler yardımıyla ile uygulanarak), faz I veya faz II randomize klinik denemeler ile literatürde görülmektedir (4, 11). Bazı tümörler tarafından eksprese edilen CEA de, oldukça yoğun ve uzun bir süreden beri çalışılmış bir tümör antijeni olarak kanser aşularında kullanılmak üzere tercih edilmektedir. Bu makalenin konusu olan araştırma sonuçları da CEA'nin kanserlerin immünoterapisinde uygun bir antijen olarak kullanılabilirliğini önermektedir. Ancak kanser immünoterapisi konusunda yapılan deneysel ve klinik araştırmalar henüz oldukça erken aşamalarda. Kliniklerde yaygın olarak kullanılabilmesi için daha uzun bir sürecin geçmesi gerekmektedir.

**Not:** Bu çalışma Toronto Üniversitesi'nce afileye olan Sunnybrook Women's Health Science Centre, Toronto, Kanada'da

#### KAYNAKLAR

1. Horig H, Medina FA, Conkright WA, *et al.* Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2:1-24.
2. Kass E, Schlom J, Thompson J, *et al.* Induction of protective host immunity to carcinoembryonic (CEA), a self antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Research* 1999; 59:676-683.
3. Haga S, Watanabe O, Shimizu T, *et al.* The clinical value of tissue carcinoembryonic antigen in breast cancer. *Surgery Today* 1991; 21:278-283.
4. Neil L, Berinstein. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *Journal of Clinical Oncol.* 2002; 20:2197-2207.
5. Borenstein SH, Graham J, Zhang X-L *et al.* CD8<sup>+</sup> T Cells are necessary for recognition of allelic, but not locus-mismatched or xeno-, HLA Class I transplantation antigens. *Journal of Immunol.* 2000; 165: 2341-2353.
6. Schmitz J, Reali E, Hodge JW, *et al.* Identification of an interferon- $\gamma$ -inducible carcinoembryonic antigen (CEA) CD8<sup>+</sup> T-cell epitope, which mediates tumor killing in CEA transgenic mice. *Cancer Research* 2002; 62:5058-5064.
7. Wada S, Tsunoda T, Baba T, *et al.* Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Research* 2005; 65: 4939-4946.
8. Kan-Mitchell J, Bisikirska B, Wong-Staal F, *et al.* The HIV-1 HLA-A2-SLYNTVATL is a help-independent CTL epitope. *Journal of Immunology* 2004; 172: 5249-5261.
9. Arlen P, Tsang KY, Marshall JL, *et al.* The use of a rapid ELISPOT assay to analyze peptide-specific immune responses in carcinoma patients to peptide vs. recombinant poxvirus vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 2000; 49: 517-529.
10. Linnemann T, Wiesmüller KH, Gellrich S, *et al.* A T-cell epitope determined with random peptide libraries and combinatorial peptide chemistry stimulates T cells specific for cutaneous T-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 2000; 11, Supplement 1,95-99.
11. Von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, *et al.* Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 2219-2228.
12. Vella AT, Dow S, Potter TA, *et al.* Cytokine-induced survival of activated T cells *in vitro* and *in vivo* (interleukin 4/interleukin 2/interleukin 7/interleukin 15). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 3810-3815.
13. Cornish GH, Sinclair IV, and Cantrell DA. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood.* 2006; 108: 600-608.