



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΟΡΓΟΥΛΗΣ

Η ανοσολογική ταυτότητα εντός του όγκου και στο περιφερικό αίμα ως βιοδείκτες πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού

Διδακτορική διατριβή

Σωτήριος Π. Φόρτης

Βιολόγος, M.Sc

Αθήνα, 2018



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

MEDICAL SCHOOL

MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATORY OF HISTOLOGY-EMBRYOLOGY

DIRECTOR: PROFESSOR VASSILIS GORGOULIS

*Immune signatures within the tumor and in the peripheral
blood as prognostic biomarkers in breast cancer*

PhD Thesis

Sotirios P. Fortis

Biologist, M. Sc

Athens, 2018

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δούση-Αναγνωστοπούλου Υπατία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Μορφολειτουργικός Τομέας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γοργούλης Βασίλειος

Καθηγητής, Μορφολειτουργικός Τομέας, Ιατρική
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Δούση-Αναγνωστοπούλου Υπατία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Μορφολειτουργικός Τομέας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Κοτσίνας Αθανάσιος

Επίκουρος Καθηγητής, Μορφολειτουργικός
Τομέας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γοργούλης Βασίλειος

Καθηγητής, Μορφολειτουργικός Τομέας,
Εργαστήριο Ιστολογίας- Εμβρυολογίας, Ιατρική
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Ευαγγέλου Κωνσταντίνος

Καθηγητής, Μορφολογικού-
Κλινικοεργαστηριακού Τομέα, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κλέτσας Δημήτριος

Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Βιοεπισημών και
Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Δούση-Αναγνωστοπούλου Υπατία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Μορφολειτουργικός Τομέας, Εργαστήριο
Ιστολογίας- Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Κουλούκουσα Μυρσίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Μορφολειτουργικός Τομέας, Εργαστήριο
Ιστολογίας- Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Κοτσίνας Αθανάσιος

Επίκουρος Καθηγητής, Μορφολειτουργικός
Τομέας, Εργαστήριο Ιστολογίας- Εμβρυολογίας
Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Χαβάκη Σοφία

Επίκουρη Καθηγήτρια, Μορφολειτουργικός
Τομέας, Εργαστήριο Ιστολογίας- Εμβρυολογίας
Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ημερομηνία αίτησης για ορισμό τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής:

21 Νοεμβρίου 2014

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής:

24 Φεβρουαρίου 2015


Ημερομηνία ορισμού θέματος:

8 Ιουνίου 2015

Ημερομηνία κατάθεσης της διατριβής :

26 Φεβρουαρίου 2018

Ω Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Γ.Α.Ο.ΝΑ. «ο Άγιος Σάββας». Φτάνοντας στη συγγραφή της διατριβής αυτής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα κάποιους ανθρώπους που μου έδωσαν τη δυνατότητα να την ξεκινήσω, με στήριξαν κατά τη διάρκεια εκπόνησής της και με βοήθησαν να τη φέρω εις πέρας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, του Μορφολειτουργικού Τομέα της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Υπατία Δούση-Αναγνωστοπούλου που ήταν η επιβλέπουσα της διατριβής αυτής. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για το χρόνο που μου αφιέρωσε, τις πολύτιμες συμβουλές της για όλα τα θέματα που προέκυπταν αλλά και τον παιδαγωγικό ρόλο που είχε σε όλη την διάρκεια αυτού του ταξιδιού. Ευχαριστώ τον Καθηγητή και Διευθυντή του Μορφολειτουργικού Τομέα κ. Βασίλειο Γοργούλη για τις καίριες παρατηρήσεις του και το χρόνο που μου διέθεσε. Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Κοτσίνα για τις συμβουλές και εύστοχες ερωτήσεις του, που αποτελούσαν για μένα τροφή για σκέψη, ώστε να συνεχίσω να μαθαίνω και να βελτιώνω τον τρόπο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Κωνσταντίνο Μπαξεβάνη, Διευθυντή του Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου. Αποτέλεσε αρωγό για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης, με στήριξε ηθικά και ουσιαστικά. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη σωστή και δημιουργική καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και για τις ώρες που πάντα πρόθυμα μου αφιέρωσε συμβουλευόντάς με στις προκύπτουσες δυσκολίες. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στη Δρ. Σόνια Περέζ, Συντονίστρια του Επιστημονικού Έργου του Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, η οποία με βοήθησε να «δημιουργήσω». Ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της, με καθοδήγησε όταν χρειάστηκε αλλά και με συμβούλεψε. Όμως, πάνω απ' όλα την ευχαριστώ γιατί μέσα από τις ατελείωτες επιστημονικές συζητήσεις μας με έκανε να αλλάξω στάση απέναντι στα πράγματα, να διευρύνω τους ορίζοντες μου και να έχω μια άλλη οπτική. Την ευχαριστώ για όλα!

Όλα τα μέλη του Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης και τους οφείλω πολλά. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Δρ. Λουΐζα Μαχαΐρα, που με καθοδήγησε στα πειράματα μοριακής βιολογίας και ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει. Οι εύστοχες παρατηρήσεις της σε συνδυασμό με τις ιδέες και την εμπειρία της, με βοήθησαν να εξελιχτώ. Ευχαριστώ και το Δρ. Ιωάννη Βουτσά για την αρμονική μας συνύπαρξη και για τη βοήθεια του σε διάφορα ερευνητικά προγράμματα. Με την Δρ. Ελευθερία Αναστασοπούλου υπήρξαμε «συνοδοιπόροι» καθώς πραγματοποιούσαμε ταυτόχρονα τις διατριβές μας και η βοήθεια της ήταν πολύτιμη σε όλα τα στάδια εκπόνησης της δικής μου διατριβής. Την ευχαριστώ για όλα, αλλά κυρίως γιατί με τιμά με τη φιλία της. Ευχαριστώ πολύ το Χριστόφορο Βαξεβάνη για την ουσιαστική συνεργασία μας στην ανάλυση αποτελεσμάτων και στις πειραματικές τεχνικές, τον Ιατρό και υποψήφιο διδάκτορα κ. Σάββα Στοκίδη και τη Μαρίνα Κωνσταντέλλου (προπτυχιακή φοιτήτρια) για την άψογη συνεργασία μας και γιατί έκαναν καλύτερη την καθημερινότητά μου στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη του Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου (Χριστόφορο Χαρίτο, Ελένη Ηλιοπούλου, Νίκο Αναστασόπουλο, Έφη Πάππου, Παναγιώτη Τζώνη, Γιάννη Ρέλλια, Όλγα Κατσάρα, Ιωάννα Καλογεροπούλου και Κακούλλου Νίκη) για την αρμονική και άψογη συνεργασία μας. Ένα μεγάλο τμήμα της δουλειάς που παρουσιάζεται στη διατριβή αυτή έγινε σε συνεργασία με το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γ.Α.Ο.Ν.Α. «ο Άγιος Σάββας» και θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια κ. Νίκη Αρνογιαννάκη, τον Ιατρό και υποψήφιο διδάκτορα κ. Μιχάλη Σοφόπουλο και τη Δρ. Νεκταρία Σωτηριάδου για την ουσιαστική μας συνεργασία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Διευθυντή της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Γ.Α.Ο.Ν.Α. «ο Άγιος Σάββας» κ. Αλέξανδρο Αρδαβάνη για τη συνεργασία μας στα ερευνητικά προγράμματα και την ένταξη ασθενών στα ερευνητικά πρωτόκολλα που ήταν πολύ σημαντική για τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης.

Η διδακτορική αυτή διατριβή ήταν ένα πανέμορφο ταξίδι για μένα μεταφορικά αλλά και κυριολεκτικά καθώς είχα την ευκαιρία και την τύχη να βρεθώ για έξι μήνες στο εργαστήριο και στην ομάδα του Dr. George Pavlakis στο Vaccine Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Fredrick MD, USA. Θα ήθελα να πω ότι είμαι ευγνώμων για τη μοναδική αυτή ευκαιρία που μου έδωσε να δω πώς δουλεύει ένα εργαστήριο διεθνούς φήμης και τόσο μεγάλου

βεληνεκούς. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Dr. Barbara Felber, τον Dr. Antonio Valentin, τον Dr. Konstantinos Dimas, τον Dr. Dimitrios Stellas, την Dr. Cristina Bergamaschi, την Dr. Margherita Rosati, την Dr. Santhi Devsundaram την υποψήφια διδάκτορα Vasiliki Stravokefalou, την Dr. Sevasti Karaliota και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου (Xintao Hu, Zhongyan Lu, Terry Jones, Jenifer Bear, Bhabadeb Chowdhury, Frances Dayton, Valerie Ficca) για την αμέριστη συμπαράστασή τους, σε επιστημονικά και μη θέματα κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στην Αμερική. Οι εμπειρίες που συνέλεξα αποτέλεσαν για μένα πολύτιμα εφόδια, που θα «κουβαλάω» πάντα μαζί μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Μορφολογικού-Κλινικοεργαστηριακού Τομέα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Ευαγγέλου, τον Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» κ. Δημήτριο Κλέτσα, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μυρσίνη Κουλούκουσα καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Σοφία Χαβάκη του Μορφολειτουργικού Τομέα, της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών που μου έκαναν τη τιμή να είναι μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διατριβής.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην υπέροχη οικογένειά μου, στους εξαιρετικούς γονείς μου (Παναγιώτη και Μαρία) και στο θαυμάσιο και θαυμαστό αδελφό μου (Γιάννη), για την πολύτιμη ηθική και ουσιαστική συμπαράσταση, τα εφόδια που όλα αυτά τα χρόνια μου εξασφάλισαν και την αμέριστη βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας. Χωρίς την οικογένεια μου δεν θα είχα καταφέρει να κάνω τίποτα απ' όσα είχα ονειρευτεί όταν ξεκινούσα αυτό το ταξίδι. Δε θα μπορούσα να παραλείψω την Κωνσταντίνα και το Χρήστο, τα δύο μου (ξ)αδέλφια που ήταν και είναι πάντα δίπλα μου και νιώθω πολύ τυχερός που τους έχω!

Τέλος, ευχαριστώ πολύ ΟΛΟΥΣ τους φίλους μου που ήταν και είναι δίπλα μου στις δύσκολες στιγμές και στις στιγμές αδυναμίας. Ο καθένας με το δικό του τρόπο πάντα με ενθάρρυναν, με στήριζαν και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα... ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!

Ευχαριστώ πολύ όλους τους προαναφερθέντες ανθρώπους που είχα τη τύχη και την χαρά να τους συναντήσω και να «διασταυρωθούν» οι δρόμοι μας. Ο καθένας συνέβαλε με τον τρόπο του στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής και στην πραγματοποίηση ενός δικού μου ονείρου!

«Η επιστήμη και η τέχνη ανήκουν σε όλο τον κόσμο,
και μπροστά τους εξαφανίζονται όλα τα σύνορα»

Γκαίτε

*Στην αδελφή μου,
Αναστασία...*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 1 -
SUMMARY	- 5 -
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 7 -
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	- 9 -
1.1.1 Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (CANCER IMMUNOEDITING)	- 14 -
1.1.1.1 ΣΤΑΔΙΟ ΕΞΑΛΕΙΨΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 16 -
1.1.1.2 ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	- 17 -
1.1.1.3 ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΠΟΔΡΑΣΗΣ/ΔΙΑΦΥΓΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 19 -
1.1.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΟΓΚΟΥ	- 20 -
1.1.3 ΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ	- 23 -
1.1.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ	- 26 -
1.1.3.2 ΔΙΗΘΟΥΝΤΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ	- 29 -
1.1.3.3 ΔΙΗΘΟΥΝΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	- 33 -
1.1.4 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ, ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	- 37 -
1.2 ΜΙΚΡΑ RNAs (microRNAs)	- 39 -
1.2.1 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ miRNAs	- 40 -
1.2.2 miRNAs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	- 43 -
1.2.2.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	- 43 -
1.2.2.2 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	- 45 -
1.2.2.3 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	- 46 -
1.2.2.4 miRNAs ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	- 49 -
1.2.2.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ	- 52 -
1.2.2.6 miRNAs ΠΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	- 53 -
1.2.2.6.1 Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ	- 55 -
1.2.2.6.2 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΟΓΚΟ	- 57 -
2 ΣΚΟΠΟΣ	- 59 -
2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΟΣΟΝ ΑΦΟΡΑ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ	- 61 -
2.2 ΣΚΟΠΟΣ ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 62 -
2.3 ΣΚΟΠΟΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 62 -
2.4 ΤΕΛΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ	- 63 -
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 65 -
3.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	- 67 -
3.1.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	- 67 -
3.1.2 ΟΡΓΑΝΑ	- 68 -
3.1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	- 69 -
3.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ: ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΟ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 69 -
3.3 ΚΟΠΗ, ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΤΟΜΩΝ	- 72 -
3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΙΗΘΟΥΝΤΩΝ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	- 72 -
3.4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΗΘΟΥΝΤΩΝ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	- 73 -
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΟΡΟΥ	- 76 -
3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	- 77 -
3.6.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΩΛΗΝΑΡΙΩΝ	- 79 -

3.7	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 80 -
3.8	ΨΥΞΗ ΚΑΙ ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	- 81 -
	3.8.1 ΨΥΞΗ	- 82 -
	3.8.2 ΑΠΟΨΥΞΗ	- 82 -
3.9	ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΗΛΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	- 83 -
3.10	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΑΠΟ ΟΡΟ, RBMCS ΚΑΙ FFPE ΑΣΘΕΝΩΝ	- 83 -
3.11	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	- 84 -
3.12	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ cDNA (COMPLEMENTARY DNA-ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA)	- 84 -
3.13	qRT-PCR (ΠΟΣΟΤΙΚΗ-ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ)	- 85 -
3.14	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 89 -
	3.14.1 ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ	- 89 -
	3.14.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ	- 89 -
	3.14.3 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ROC (ROC CURVES)	- 90 -
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 91 -
4.1	ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	- 93 -
4.2	ΔΙΗΘΗΣΗ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΣΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ	- 94 -
4.3	ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 97 -
	4.3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ «ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ» ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΙΑΣΤΙΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ	- 99 -
	4.3.2 ΕΥΝΟΙΚΕΣ ΚΑΙ ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ «ΥΠΟΓΡΑΦΕΣ» ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	- 101 -
	4.3.3 ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ «ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ»	- 107 -
4.4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΟΠΤΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 108 -
	4.4.1 ΔΙΗΘΗΣΗ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ	- 108 -
	4.4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ/ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	- 110 -
	4.4.3 miRNAs ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ	- 113 -
	4.4.4 miRNAs ΑΠΟ RBMCS ΑΣΘΕΝΩΝ	- 114 -
	4.4.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΟΜΑΔΩΝ-CLUSTERS	- 116 -
	4.4.6 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ-CLUSTERS	- 121 -
	4.4.7 miRNAs ΣΤΟΝ ΟΓΚΟ	-127-
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 131 -
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	- 144 -
7	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	- 145 -
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 149 -
9	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	- 173 -
	9.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I -ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	- 175 -
	9.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II- ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	-177-
	9.3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III- ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ	- 202 -
	9.4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV- ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΠΙΝΑΚΩΝ	- 205 -
	9.5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V – ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	- 206 -

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη του βαθμού διήθησης και της χωροταξικής κατανομής ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών στον όγκο και κατά πόσο σχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την κλινική πορεία ασθενών με πορογενή, διηθητικό, μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Ένας επιπλέον στόχος της μελέτης αυτής ήταν η πιθανή συσχέτιση κυκλοφορούντων παραγόντων προεγχειρητικά με την εικόνα διήθησης του όγκου από ανοσοκύτταρα και προσπάθεια δημιουργίας συνδυαστικής προγνωστικής υπογραφής που θα ενσωματώνει όλα ή μέρος των στοιχείων που προέκυψαν από την μελέτη.

Η μελέτη χωρίζεται σε τρία τμήματα. Το πρώτο τμήμα αφορά στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο του μαστού (BCa) που μελετήσαμε, το δεύτερο σε αναδρομικό τμήμα της μελέτης όπου τα ευρήματά μας συσχετίστηκαν με στοιχεία από την κλινική παρακολούθηση των ασθενών, που είχαμε στη διάθεσή μας και το τρίτο τμήμα αφορά σε ένα προοπτικό τμήμα της μελέτης, όπου έγινε επιπλέον αιμοληψία μια ημέρα πριν το χειρουργείο ασθενών.

Όσον αφορά στο σύνολο των ασθενών, εξετάστηκε η παρουσία ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών είτε στο κέντρο του όγκου (Tumor Center, TC), είτε στο διηθητικό μέτωπο (Invasive Margin, IM), ή/και στα δύο και μελετήθηκε ο ρόλος της χωροταξικής-αρχιτεκτονικής κατανομής των κυττάρων αυτών σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Σε μία ομάδα 162 ασθενών, οι πληροφορίες που εξήχθησαν από τη διαφορική διήθηση των όγκων από CD8+ λεμφοκύτταρα και CD163+ μακροφάγα συσχετίστηκαν με τα εγκαθιδρυμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στον BCa, όπως είναι το στάδιο (TNM stage), ο βαθμός διαφοροποίησης (Grade), η παρουσία ορμονικών υποδοχέων (Hormone Receptors), η υπερ-έκφραση του HER2/neu, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67% και η ηλικία των ασθενών, με στόχο τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων. Από τα αποτελέσματά μας, προτείνεται για πρώτη φορά ότι η συνδυαστική αξιολόγηση των πυκνοτήτων των ανοσοκυττάρων CD8+ ή/και CD163+ στο κέντρο του όγκου (TC) και το διηθητικό μέτωπο (IM) επιτρέπει καλύτερη κατηγοριοποίηση των ασθενών και βελτιώνει την προγνωστική αξία της εγκαθιδρυμένης σταδιοποίησης κατά TNM στον καρκίνο του μαστού.

Το αναδρομικό τμήμα της μελέτης αφορούσε 97 ασθενείς για τους οποίους είχαμε διαθέσιμα στοιχεία από την κλινική παρακολούθηση. Τα δεδομένα μας υπέδειξαν ότι η συνδυαστική αξιολόγηση των πυκνοτήτων των κυττάρων CD8+ και CD163+ από κοινού στο TC και στο IM μπορούν να βελτιώσουν την ακρίβεια της πρόβλεψης για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και τη συνολική επιβίωση (OS). Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν δύο «υπογραφές», η ευνοϊκή- Favorable Combined Immune Signatures-FCIS, που χαρακτηρίζεται από υψηλά CD8+ στο TC και χαμηλά στο IM και/ή χαμηλά CD163+ στο TC και υψηλά στο IM και η δυσμενής-Unfavorable Combined Immune Signatures-UCIS, που χαρακτηρίζεται από χαμηλά CD8+ στο TC και υψηλά στο IM, ή υψηλά CD163+ στο TC και χαμηλά στο IM (χωρίς να είναι CD8+ HL ή CD163+ LH). Οι δύο αυτές υπογραφές καλύπτουν το 50% περίπου των ασθενών με μη μεταστατικό πορογενή διηθητικό καρκίνο του μαστού. Οι υπόλοιπες ασθενείς παραμένουν σε μια «γκρίζα ζώνη» (REST).

Στο προοπτικό τμήμα της μελέτης μελετήθηκαν τα επίπεδα έξι miRNAs στον ορό 50 ασθενών και στα Peripheral Blood Mononuclear Cells-PBMCs τους. Επίσης, μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης κυκλοφορούντων κυτταροκινών/χημειοκινών. Απευθείας συσχετίσεις, θετικές ή αρνητικές, αποκαλύφθηκαν μεταξύ κυκλοφορούντων miRNAs και διήθησης του όγκου από ανοσοκύτταρα, αλλά και με τα επίπεδα ορισμένων κυτταροκινών/χημειοκινών, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με τα miRNAs των PBMCs. Με τη βοήθεια αλγορίθμου, επιτράπηκε η δημιουργία τριών διακριτών συστάδων/clusters ασθενών βάσει των επιπέδων έκφρασης των miRNAs από τον ορό τους. Προέκυψε λοιπόν μία κατηγοριοποίηση ασθενών με διαφορετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, διαφορετικά επίπεδα κυκλοφορούντων κυτταροκινών/ χημειοκινών, διαφορετική διήθηση από ανοσοκύτταρα και διαφορετικό HLA γονότυπο. Λαμβάνοντας πάντα υπόψη τους περιορισμούς που τίθενται στη μελέτη μας όσον αφορά στο μικρό μέγεθος δείγματος, μπορούμε να υποστηρίξουμε πως έχουμε μια «υπογραφή» που για πρώτη φορά, εύκολα και ελάχιστα παρεμβατικά διαχωρίζει τους ασθενείς με διηθητικό, μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού σε τρεις διαφορετικές συστάδες με διακριτά χαρακτηριστικά. Επιπλέον κάποιες από τις συστάδες/ ομάδες που δημιουργήθηκαν φαίνεται να έχουν και διαγνωστικό ρόλο. Οι «υπογραφές» αυτές μένει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και με την πάροδο του

χρόνου, όταν θα έχουμε την κλινική παρακολούθηση των ασθενών αυτών, ώστε να μπορούμε να ελέγξουμε κατά πόσο η «εικόνα» που έχουμε από το περιφερικό αίμα, με τους παράγοντες που προτείνουμε για μελέτη, είτε από μόνοι τους ή σε συνδυασμό με το μικροπεριβάλλον του όγκου, θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως «υγρή βιοψία» ή/και ως συνδυαστικές «υπογραφές» με την ανοσοκυτταρική διήθηση του όγκου, δίνοντας κατά την αρχική διάγνωση και προγνωστική αξία στην «υπογραφή» μας.

SUMMARY

The purpose of this thesis was to study the infiltration level and the spatial distribution of the immune cell subpopulations within the tumor, as well as the level of their correlation with clinicoopathological characteristics and the clinical outcome of patients with invasive, non-metastatic, ductal breast cancer (BCa). Furthermore, we studied the possible correlations between circulating factors at the preoperative stage and tumor infiltration status by immune cells, in order to create a combinational signature of prognostic significance.

The study is divided in three parts. The first part includes the total number of patients with breast cancer (BCa). The second part includes patients with available follow-up that were analyzed retrospectively. Finally, the third part is a prospective cohort of patients, with an additional blood sample collected one day before operation.

In the total number of patients, tests were carried out in tissue specimens to evaluate the presence, as well as the spatial-architectural distribution of immune cell subpopulations in the tumor center (TC) or in the invasive margin (IM), or/and in both. The results from differential tumor infiltration by CD8+ lymphocytes and CD163+ macrophages in a group of 162 patients were correlated with established BCa clinicopathological features, such as TNM stage, Grade, Hormone Receptors status, HER2/neu over-expression, proliferation marker Ki67% and patient age. From our results, it was demonstrated for the first time that the combined evaluation of CD8+ or/and CD163+ cell densities in TC and IM improves patients' categorization and increases the prognostic value of the established TNM staging in BCa.

In the retrospective part of the study, 97 patients with available clinical follow-up were analyzed. Our data indicated that the combined assessment of the CD8+ and CD163+ cell densities in TC and IM could enhance the prognostic accuracy of disease-free survival-DFS and overall survival-OS. More specifically, two "signatures" were created, a favorable one –FCIS (Favorable Combined Immune Signatures) characterized by high CD8+ in TC and low in IM and/or low CD163+ in TC and high in

IM and an unfavorable one -UCIS (Unfavorable Combined Immune Signatures) characterized by low CD8+ in TC and high in IM or high CD163+ in TC and low in IM (without being CD8+ HL or CD163+ LH). These two signatures cover approximately 50% of the patients with invasive, non-metastatic ductal BCa. The other patients remain at a "gray area" (REST).

At the prospective part of the study, six miRNAs levels, from serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells-PBMCs, of 50 patients were evaluated. Furthermore, the expression levels of circulating cytokines/ chemokines were measured. Direct correlations, positive and negative, were revealed between circulating miRNAs and tumor infiltrated immune cell subpopulations, as well as with some cytokines/chemokines level. No correlation was observed between serum miRNAs of PBMCs miRNAs.

Using an algorithm, three distinguishable clusters of patients were created based on their serum-derived miRNA expression levels. There was a classification of patients with different clinicopathological characteristics, different levels of circulating cytokines/chemokines, different immune cell infiltration and a different HLA genotype.

Taking into account the limitations set in our study regarding the small sample size, we could argue that we have identified for the first time a "signature" that easily and with a minimally invasive method segregates patients with invasive, non-metastatic BCa into three different clusters with distinctive features. In addition, some of the clusters/groups, that have been created, seem to have a diagnostic role as well. These "signatures" remain to be confirmed in a larger sample of patients. Beside this, clinical follow-up over a period of time is essential to verify whether the factors measured in the peripheral blood, alone or in combination with the tumor microenvironment, could serve as a "liquid biopsy" and/or as a "signature" with the immune cell infiltration of the tumor giving at the time of the initial diagnosis an additional prognostic value to our "signature".

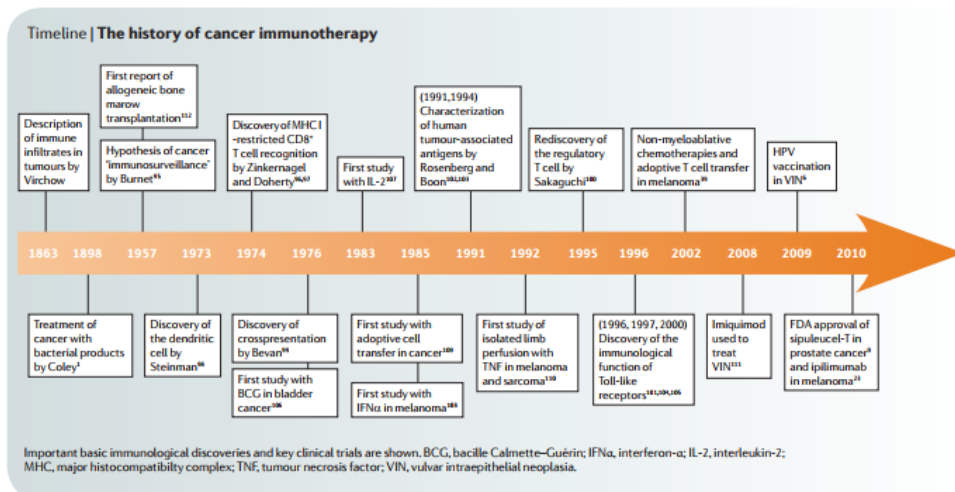
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η σχέση του ανοσοποιητικού συστήματος με τον καρκίνο άρχισε να γίνεται γνωστή και να διερευνάται στα τέλη του 19ου αιώνα, όταν ο χειρουργός ογκολόγος William Coley χορήγησε αδρανοποιημένα βακτήρια του είδους *Streptococcus pyogenes* και *Serratia marcescens*, που ονομάστηκε αργότερα Τοξίνη του Coley, σε ασθενείς για τη θεραπεία όγκων. Ο όγκος υπέστη εκτεταμένη νέκρωση και ο ασθενής παρέμεινε απαλλαγμένος από την ασθένεια για οκτώ χρόνια. Αυτή υπήρξε η πρώτη μορφή ανοσοθεραπείας. Η ανοσοθεραπεία είναι μια θεραπεία που χρησιμοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς για να βοηθήσει στην καταπολέμηση του καρκίνου και ως εκ τούτου έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία. Όταν ο Paul Ehrlich παρουσίασε τις μελέτες του για τα καρκινώματα το 1908, ήταν ένας από τους πρώτους επιστήμονες που προσέγγισαν την ιδέα ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να καταστέλλει την καρκινογένεση, μειώνοντας την ανάπτυξη όγκων [1]. Από το 1957 επανεξετάστηκε η υπόθεση για την ανοσοβιολογική επιτήρηση του καρκίνου από πολλούς επιστήμονες. Ο Frank Macfarlane Burnet πρότεινε ότι οι καρκίνοι έχουν νέες αντιγονικές ιδιότητες που μπορούν να προκαλέσουν αντικαρκινική ανοσία [2]. Ο Lewis Thomas εξέφρασε την άποψη ότι σε μακρόβιους οργανισμούς η απόρριψη αλλομοσχεύματος οφείλεται μάλλον στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ η κύρια λειτουργία του θα μπορούσε να είναι η προστασία του ξενιστή από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες και κακοήθη κύτταρα [3]. Την ίδια περίοδο, οι Richmond T. Prehn και J.M. Main περιέγραψαν την ανοσία στα σαρκώματα που προκαλούνται από μεθυλοχολανθρένιο και μια μελέτη που εκπονήθηκε από τον George Klein και τους συνεργάτες του κατέδειξε αντίσταση σε αυτό το είδος όγκων στους ασθενείς [4, 5]. Το 1968, ο Ingegerd Hellström παρουσίασε στοιχεία ότι τα συστατικά τόσο της κυτταρικής αλλά και της χυμικής ανοσίας έχουν αντικαρκινικές δράσεις σε ασθενείς. Κατά τις παρατηρήσεις αυτές, στους περισσότερους ασθενείς η νόσος εξελισσόταν παρά τις αντικαρκινικές αποκρίσεις που ανέπτυσαν, ένα εύρημα που ονομάστηκε «παράδοξο του

Hellström» [6]. Τα επόμενα χρόνια, τόσο ο Burnet όσο και ο Thomas υπέθεσαν ότι τα λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτήρηση του καρκίνου [7]. Βασίστηκαν στη σχέση αυτή του ανοσοποιητικού συστήματος με το καρκίνο και διατύπωσαν τη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης (Immunosurveillance theory), σύμφωνα με την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναγνωρίζει ειδικά τα καρκινικά κύτταρα και να τα εξαλείφει. Ωστόσο, οι λεπτομέρειες της παρουσίασης αντιγόνου και η αναγνώριση τους από τα T λεμφοκύτταρα παρέμεναν άγνωστες την εποχή εκείνη και περιγράφηκαν μερικά χρόνια αργότερα από τους Rolf Zinkernagel και Peter Doherty το 1974, όταν δημοσίευσαν την πρωτοποριακή εργασία τους για τη λειτουργία του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) [8, 9]. Αυτό ήταν μια ουσιαστική ανακάλυψη για να αποκαλυφθεί ο ρόλος της προσαρμοστικής κυτταρικής ανοσίας απέναντι σε παθογόνα και κακοήγη κύτταρα. Τα επόμενα ορόσημα στην ανοσοθεραπεία ήρθαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 και αυτά περιελάμβαναν α) τη κυτταρική θεραπεία, ως μορφή παθητικής ανοσοθεραπείας, που βασίζεται στη χορήγηση λεμφοκυττάρων που έχουν απομονωθεί από όγκους τους οποίους έχουν διηθήσει και έχουν στη συνέχεια ενεργοποιηθεί *in vitro* παρουσία αυξητικών παραγόντων, β) τη χορήγηση ανασυνδυασμένων κυτταροκινών όπως rIL-2, γ) τη ταυτοποίηση του πρώτου όγκο-σχετιζόμενου αντιγόνου και δ) την ανάπτυξη ειδικών εναντίον των όγκων μονοκλωνικών αντισωμάτων, ενώ ακολούθησαν εμβόλια δενδριτικών κυττάρων (DCs) αλλά και πεπτιδικά καθώς και άλλα εμβόλια. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος όσον αφορά στην κατανόηση των σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ όγκων και του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ανάπτυξη καινοτόμων τρόπων αύξησης της ανοσοανταπόκρισης κατά του όγκου.



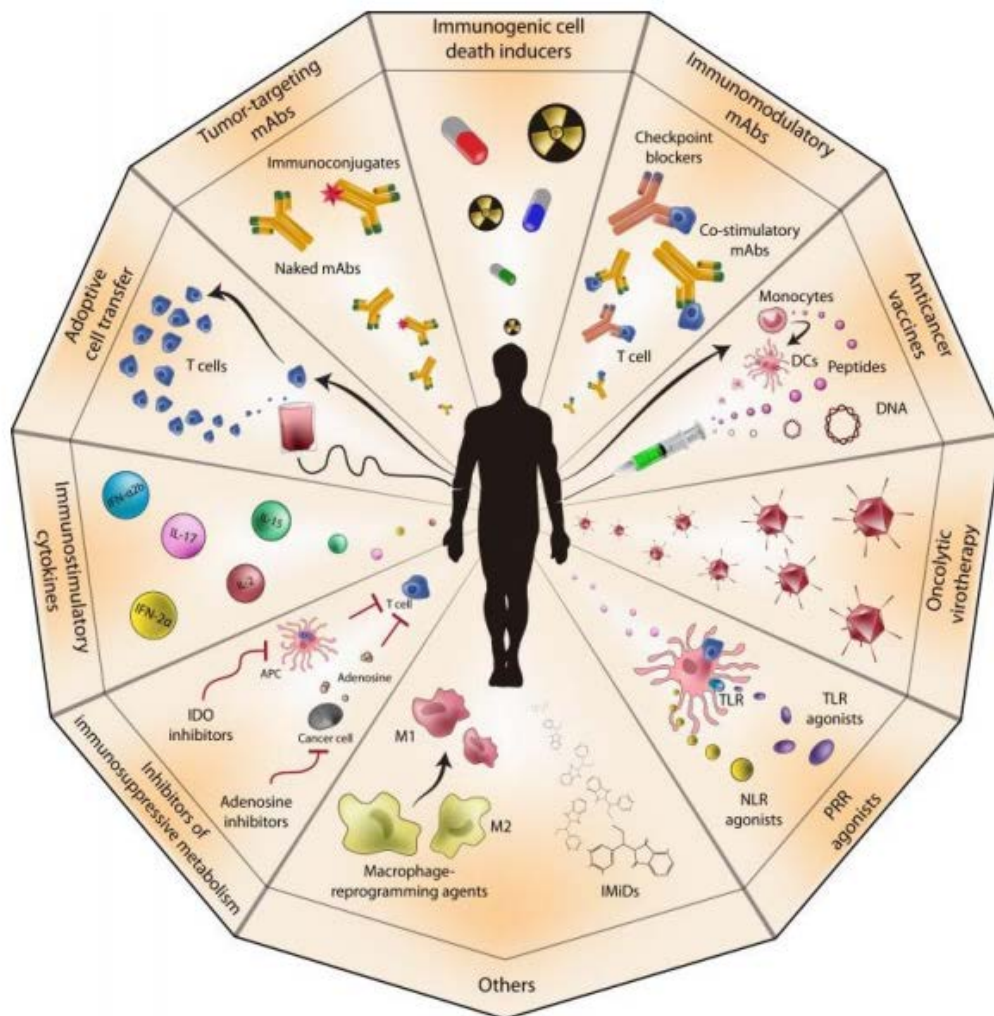
Εικόνα 1-1: Ορόσημα στην εξέλιξη της ανοσοθεραπείας (Lesterhuis et al., 2011).

Η σχέση του ανοσοποιητικού συστήματος με τον καρκίνο επιβεβαιώνεται και από ευρήματα μελετών σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς που είχαν λάβει μεταμόσχευση και είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου [10], αλλά και σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που έπασχαν από σοβαρές ανοσοανεπάρκειες όπου παρατηρήθηκε αύξηση των όγκων [11], όπως η έλλειψη του γονιδίου Rag2, απαραίτητου για την ανάπτυξη λειτουργικών T λεμφοκυττάρων, μέσω του ανασυνδυασμού των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών [12]. Βασικό κλινικό στοιχείο που επιβεβαιώνει την ανοσοεπιτήρηση των όγκων είναι η ύπαρξη T λεμφοκυττάρων μέσα στον όγκο (Tumor Infiltrating Lymphocytes TILs) και η θετική συσχέτισή τους με τη συνολική επιβίωση, σε διάφορους τύπους καρκίνου [13-15]. Χρειάστηκαν αρκετά χρόνια μέχρι να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα από μοντέλα ποντικών, που επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ανοσολογικής επιτήρησης [16, 17]. Εκτός από την IFN- γ , τα λεμφοκύτταρα επίσης φάνηκε να παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανάπτυξη πρωτοπαθών όγκων σε μελέτες από την ομάδα του Shankaran και σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μοντέλα ποντικών με έλλειψη του Rag2 [18]. Αυτή η μελέτη οδήγησε επίσης σε μια βελτιωμένη εκδοχή και εξέλιξη της θεωρίας της ανοσολογικής επιτήρησης, στη θεωρία της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι τα λεμφοκύτταρα όχι μόνο καταστέλλουν την ανάπτυξη του καρκίνου, αλλά και ότι ο καρκίνος δεν είναι μια στιγμιαία διαδικασία αλλά χρειάζεται χρόνος και στο χρονικό διάστημα που απαιτείται μέχρι την εμφάνιση του, ο καρκίνος «διαμορφώνεται» μέσω μιας συνεχούς αλληλεπίδρασης με το ανοσοποιητικό

σύστημα. Έκτοτε, το γενικό ενδιαφέρον για την ανοσολογία του καρκίνου έχει επανεμφανιστεί και ένας αυξανόμενος αριθμός μοντέλων ποντικών έχει καθιερωθεί για τη διερεύνηση μηχανισμών καταστολής όγκων [19]. Η ύπαρξη ανοσολογικής επιτήρησης του καρκίνου είναι πλέον γενικά αποδεκτή και η ανοσολογική διαφυγή του όγκου θεωρείται χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου, καθώς τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την αντιγονικότητα και την ανοσογονικότητα τους, λόγω της «πίεσης» που δέχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα σε ένα αναπτυσσόμενο και γενετικά ασταθές περιβάλλον. Ο καρκίνος χρησιμοποιεί τρεις βασικούς μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής: (α) πρωτογενή αντίσταση- primary resistance (κυρίως μέσω ογκογονιδίων), (β) επίκτητη αντίσταση- acquired resistance (με την συνεχή αλλαγή των κυτταρικών του ιδιοτήτων- αλλαγή φαινοτύπου- και την παραγωγή παραγόντων που ενισχύουν, άμεσα ή έμμεσα, τους ανοσοκατασταλτικούς μηχανισμούς) και (γ) προσαρμοστική αντίσταση- adaptive immune resistance [20].

Η έρευνα στον τομέα της Ανοσολογίας του καρκίνου έχει δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά από τους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Η αλματώδης πρόοδος στους τομείς της Βιοχημείας, της Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας και της Γενετικής, παρέχει πλέον τα κατάλληλα εργαλεία για την καλλιέργεια, την ανάπτυξη και τη μελέτη ανθρώπινων κυττάρων *ex vivo*, την παραγωγή ανασυνδυασμένων ανοσοτροποποιητικών μορίων (πχ. κυτταροκινών) σε μεγάλες ποσότητες και σε καθαρή μορφή και τη χρήση ζωικών πειραματικών μοντέλων για τον *in vivo* έλεγχο της αποτελεσματικότητας των σχεδιαζόμενων πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας. Έτσι, η ανοσοθεραπεία του καρκίνου θεωρείται πλέον μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος (μετά τη χειρουργική, τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία και τη στοχευμένη θεραπεία μέσω μικρών μορίων) αντινεοπλασματικής αγωγής [21, 22], καθώς συνδυάζει την υψηλή αποτελεσματικότητα με μειωμένη τοξικότητα, στοχεύοντας στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων με ελάχιστες παρενέργειες. Συνεπώς, η ανοσοθεραπεία του καρκίνου αποτελεί ένα πολύτιμο και πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την αντιμετώπιση νεοπλασιών και προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια μετά την ανακάλυψη των αναστολέων ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου (Immune checkpoint inhibitors)[23-26].

Στην Εικόνα 1-2 συνοψίζονται οι στρατηγικές ανοσοθεραπείας για τον καρκίνο, που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Νεότερα δεδομένα, αναφέρουν τη πιθανή συνεργιστική δράση της ανοσοθεραπείας με στοχευμένες θεραπείες εναντίον του όγκου (Targeted therapies). Όπως υποστηρίζεται, οι συνδυαστικές θεραπείες μπορεί να συμβάλλουν στην αύξηση του αριθμού των ασθενών που μπορούν να επωφεληθούν από ένα συγκεκριμένο ανοσοθεραπευτικό σχήμα. Πολλές στοχευμένες θεραπείες εναντίον των καρκινικών κυττάρων συμβάλλουν επίσης στη διαμόρφωση και προετοιμασία του ανοσοποιητικού συστήματος, συντελώντας στην επαγωγή μιας αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης [27].



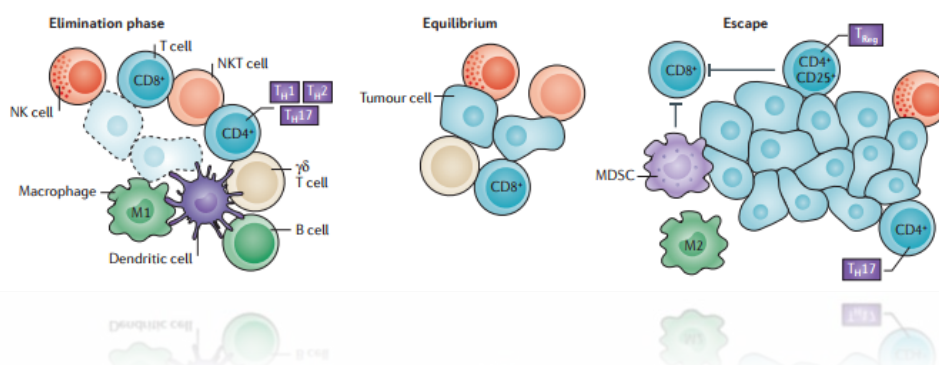
Εικόνα 1-2: Αντικαρκινικές ανοσοθεραπείες που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα (immunomodulatory) και αντισώματα εναντίον του όγκου (tumor-targeting), εμβόλια με δενδριτικά κύτταρα (DC), πεπτιδικά και DNA εμβόλια, ογκολυτικούς ιούς, αγωνιστές για πρωτεϊνικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων pattern recognition receptor (PRR), ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες, επαγωγείς ανοσογονικού θανάτου, αναστολείς ανοσοκατασταλτικού μεταβολισμού και κυτταρική θεραπεία. 1MT, 1-methyltryptophan; APC, antigen-presenting cell; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN, interferon; IL, interleukin; IMiD, immunomodulatory drug; NLR, NOD-like receptor; TLR, Toll-like receptor (Galuzzi et al., 2014).

1.1.1 Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (CANCER IMMUNOEDITING)

Η κλωνοποίηση του πρώτου καρκινικού αντιγόνου MAGE, που ανήκει στην κατηγορία των αντιγόνων ογκο-εμβρυικού τύπου, από την ομάδα του Thierry Boon [28] σήμανε την αρχή της εποχής κατά την διάρκεια της οποίας ανακαλύφθηκε μια πληθώρα από καρκινικά αντιγόνα διαφόρων τύπων με τη βοήθεια γενετικών, βιοχημικών και μοριακών προσεγγίσεων [29]. Η ταυτοποίηση αυτών των κοινών, για διάφορες νεοπλασίες, αντιγόνων έθεσαν τη βάση για την αντιγονο-ειδική θεραπεία του καρκίνου. Η έννοια της αντιμετώπισης του καρκίνου με τη βοήθεια της ανοσοθεραπείας, που στηρίζεται στη δημιουργία ανοσολογικής απάντησης ενάντια σε καρκινικά αντιγόνα, βασίστηκε στη διαπίστωση ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων ή/και μοριακές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα [30, 31]. Ο καρκίνος, συνεπώς, είναι και αντιγονικός (antigenic) και ανοσογονικός (immunogenic), μπορεί δηλαδή να αναγνωριστεί από το ανοσοποιητικό σύστημα και να προκαλέσει ανοσολογική απάντηση και επομένως υπόκειται σε ανοσοεπιτήρηση (immunesurveillance). Αυτή η ιδιότητα του καρκίνου αποτελεί τη βάση της ανοσοθεραπείας, της χρήσης δηλαδή του ανοσολογικού συστήματος για την εξάλειψή του. Ο καρκίνος, όμως, αναπτύσσει τρόπους διαφυγής από την ανοσοεπιτήρηση κατά την εξέλιξή του. Οι πιο σημαντικές είναι α) η μειωμένη ή καθόλου έκφραση διαφόρων MHC αλληλομόρφων (κυρίως τάξης I, ενώ εκείνα της τάξης II συνήθως δεν εκφράζονται), β) η μη έκφραση καρκινικών πεπτιδίων, έτσι ώστε να μην αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα (πράγμα που επίσης συμβαίνει και με τη χαμηλή ή καθόλου έκφραση των MHC τάξης I μορίων) και γ) η ενεργή καταστολή που εκδηλώνεται μέσω της έκκρισης κατασταλτικών ενζύμων από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα αλλά και με την ενεργοποίηση κατασταλτικών κυτταρικών πληθυσμών από τα καρκινικά κύτταρα.

Η θεωρία της ανοσολογικής επιτήρησης που είχε προταθεί 50 χρόνια πριν από τους Burnet και Thomas προέβλεπε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί ως «φρουρός» στην αναγνώριση και εξάλειψη μετασχηματισμένων κυττάρων. Εκτενείς έρευνες που άρχισαν πριν 15 χρόνια αποκάλυψαν ότι η εν λόγω ανοσοεπιτήρηση

από το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί το πρώτο στάδιο της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με τα καρκινικά κύτταρα. Μετά το στάδιο λοιπόν της ανοσοεπιτήρησης ακολουθεί το 2ο στάδιο που ονομάζεται στάδιο «ισορροπίας» κατά τη διάρκεια του οποίου, τα εναπομείναντα από το στάδιο της ανοσοεπιτήρησης, καρκινικά κύτταρα βρίσκονται σε μια τέτοια κατάσταση που δεν ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε αυτό να τα καταστρέψει, αλλά και τα ίδια δεν έχουν συσσωρεύσει επιγενετικές μεταλλάξεις ώστε να αυξάνονται ανεξέλεγκτα. Πρόκειται λοιπόν για μια φάση δυναμικής αδράνειας. Το στάδιο αυτό αποτελείται από πολλά επιμέρους στάδια, ενώ με την πάροδο του χρόνου τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν, πράγματι, επιγενετικές μεταλλάξεις ώστε, αφενός μεν να πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς και αφετέρου να παράγουν κατασταλτικούς παράγοντες. Έτσι λοιπόν, σταδιακά υπεισέρχεται το στάδιο της απόδρασης των καρκινικών κυττάρων, το οποίο είναι και το στάδιο εκείνο από τα τρία που είναι κλινικά ανιχνεύσιμο. Κατά το στάδιο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αφού εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, έχουν καταστεί την αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση, ταυτόχρονα με τη δημιουργία αγγειογένεσης, κυρίως μέσω των Myeloid-derived suppressor cells- MDSCs και των T-regulatory-Tregs (T-ρυθμιστικών κυττάρων) και με την έκκριση μεταλλοπρωτεασών, δημιουργούν μεταστάσεις με σοβαρές επιπτώσεις για την υγεία του ασθενούς. Η μελέτη των σταδίων της ανοσοδιαμόρφωσης των όγκων έχει βοηθήσει τα μέγιστα όχι μόνο για την ανεύρεση νέων ανοσοθεραπευτικών πρωτοκόλλων αλλά και για τον προσδιορισμό βιολογικών δεικτών πρόγνωσης και πρόβλεψης που είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες για τον σωστό σχεδιασμό πρωτοκόλλων θεραπείας του αρκίνου με συνδυαστικές θεραπείες. Στην Εικόνα 1-3 απεικονίζονται τα 3 στάδια της ανοσοδιαμόρφωσης των όγκων [32-34].

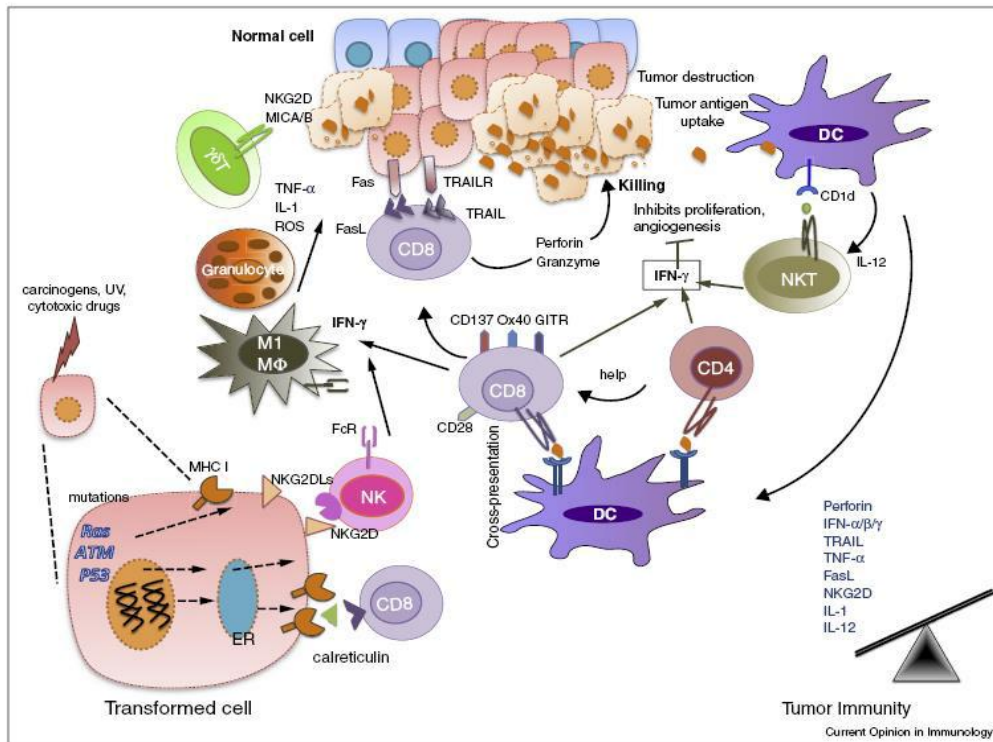


Εικόνα 1-3: Τα τρία στάδια της ανοσοδιαμόρφωσης (εξάλειψη-ισορροπία-διαφυγή του όγκου) (Kansara et al., 2014).

1.1.1.1 ΣΤΑΔΙΟ ΕΞΑΛΕΙΨΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η εξάλειψη αποτελεί ένα στάδιο της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου, όπου τόσο το έμφυτο όσο και το προσαρμοστικό σκέλος του ανοσοποιητικού συστήματος ανιχνεύουν και καταστρέφουν πρώιμα τα καρκινικά κύτταρα. Τα φυσιολογικά κύτταρα, μετασχηματίζονται σε καρκινικά υπό την επίδραση καρκινογόνων αλλά και λόγω αποτυχίας δράσης των εγγενών ογκοκατασταλτικών μηχανισμών τους (π.χ. p53, ATM). Αυτά τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν αντιγόνα μέσω των MHC Ι μορίων ή/και συνδετών NKG2D που αναγνωρίζονται από CD8+ και NK κύτταρα, αντίστοιχα. Δενδριτικά κύτταρα μπορούν επίσης να προσλάβουν αντιγόνα και να τα παρουσιάσουν στα T-κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των NK T-κυττάρων. Αυτά τα ενεργοποιημένα κύτταρα τελεστές απελευθερώνουν IFN- γ που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση. Επιπλέον, CD8+ T-κύτταρα μπορούν να επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς Fas και TRAIL στην επιφάνεια των κυττάρων του όγκου ή μέσω έκκρισης περφορίνης και συνενζύμων.

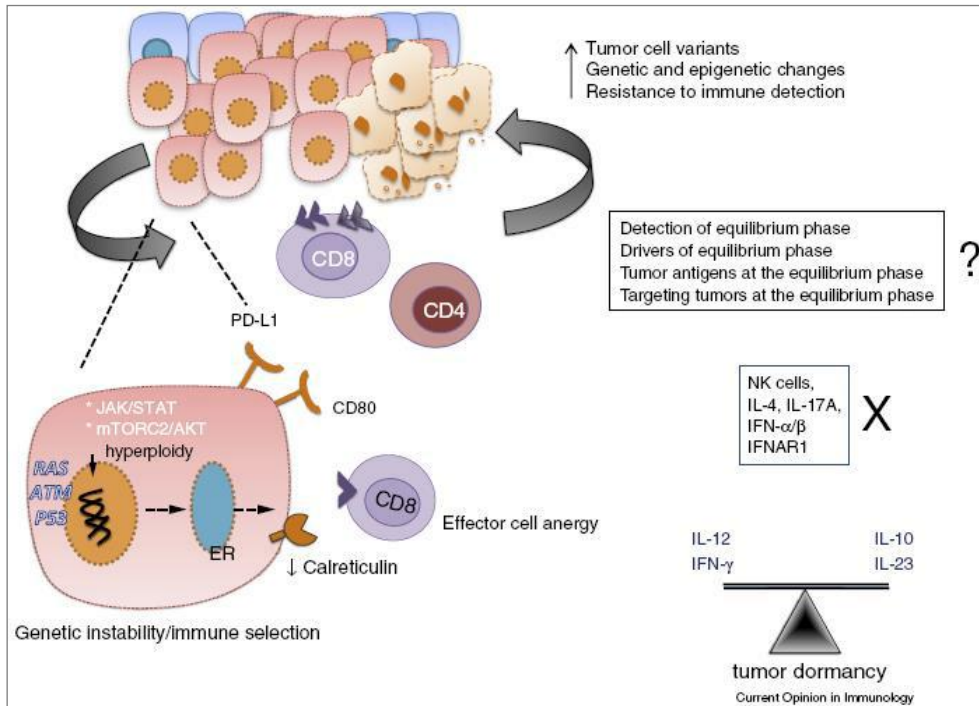
Δραστικά T-κύτταρα εκφράζουν συνδιεγερτικά μόρια όπως CD28, CD137, GITR, OX-40 που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους. Τα $\gamma\delta$ - T-κύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν και να σκοτώσουν τους όγκους που εκφράζουν NKG2D προσδέτες (MICA/B σε ανθρώπους). Κύτταρα του έμφυτου σκέλους του ανοσοποιητικού συστήματος [μακροφάγα (M1), κοκκιοκύτταρα] ασκούν, επίσης, αντικαρκινική δράση, εκκρίνοντας TNF- α , IL-1, IL-12 και ROS. Στο στάδιο της εξάλειψης, η ισορροπία γέρνει υπέρ του ανοσοποιητικού συστήματος και κατά του όγκου, γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της έκφρασης καρκινικών αντιγόνων, MHC μορίων τάξης Ι, υποδοχέων Fas και TRAIL σε κύτταρα του όγκου, καθώς και στην έκκριση περφορίνης, συνενζύμων, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL-1, IL-12, TNF- α στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Εικόνα 1-4).



Εικόνα 1-4: Το στάδιο της εξάλειψης των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα (Mittal et al., 2014).

1.1.1.2 ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

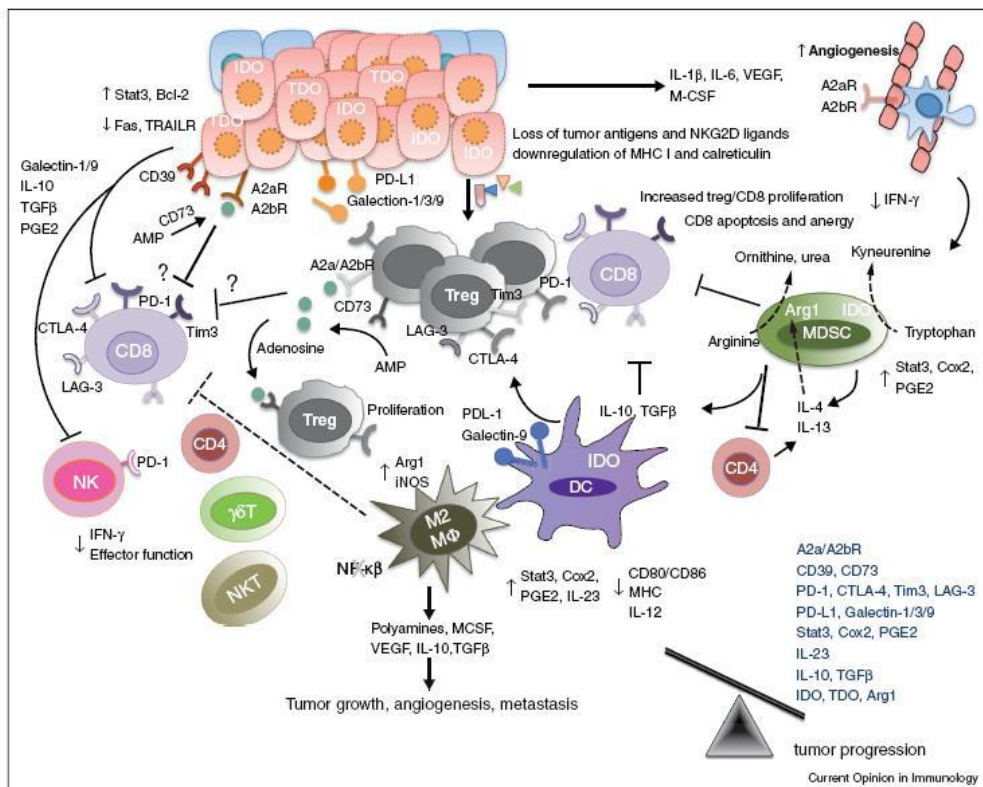
Στο στάδιο της ισορροπίας στην ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου, το ανοσοποιητικό σύστημα κρατά τον όγκο σε μια κατάσταση λειτουργικής αδράνειας. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα υφίστανται γενετικές και επιγενετικές αλλαγές και λόγω της συνεχούς πίεσης που δέχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, επιλέγονται κάποια καρκινικά κύτταρα που αντιστέκονται στην αναγνώριση από αυτό (είτε λόγω απώλειας των αντιγόνων τους, είτε λόγω της ελαττωματικής παρουσίας τους) και επάγουν ανοσοκαταστολή. Το στάδιο της ισορροπίας αντιπροσωπεύει μια ισορροπία μεταξύ κυτταροκινών που έχουν κατασταλτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων (IL-12, IFN-γ) και κυτταροκινών που προάγουν τον όγκο (IL-10, IL-23) (Εικόνα 1-5).



Εικόνα 1-5: Το στάδιο της ισορροπίας μεταξύ καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Mittal et al., 2014).

1.1.1.3 ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΠΟΔΡΑΣΗΣ/ΔΙΑΦΥΓΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατά το στάδιο της διαφυγής, το ανοσοποιητικό σύστημα αποτυγχάνει να περιορίσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και εμφανίζεται η νόσος. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα του όγκου διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης. Εκφράζουν μόρια επιβίωσης (BCL-2), ανοσοκατασταλτικά μόρια (IDO, TDO, PD-L1, galectin-1/3/9, CD39, CD73, υποδοχείς αδενοσίνης) και εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως VEGF, TGF-β, IL-6, M-CSF, οι οποίες προάγουν την αγγειογένεση. Επιπλέον, τα MDSCs, τα M2 μακροφάγα και τα DCs εκφράζουν ανοσορρυθμιστικά μόρια όπως αργινάση, iNOS και IDO και εκκρίνουν τις ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες IL-10 και TGF-β, οι οποίες αναστέλλουν τον CD8+ κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή επάγουν την απόπτωση. Τα MDSCs και τα DCs εκφράζουν IDO που προκαλεί την παραγωγή των ρυθμιστικών T-κυττάρων. Η IDO, η αργινάση, το CD39 και το CD73 είναι κύρια ανοσορρυθμιστικά ένζυμα. Στο στάδιο της απόδρασης, η ισορροπία γέρνει υπέρ της εξέλιξης του όγκου, εξαιτίας της παρουσίας ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών και μορίων όπως IL-10, TGF-β, VEGF, IDO, PD-L1 (Εικόνα 1-6).



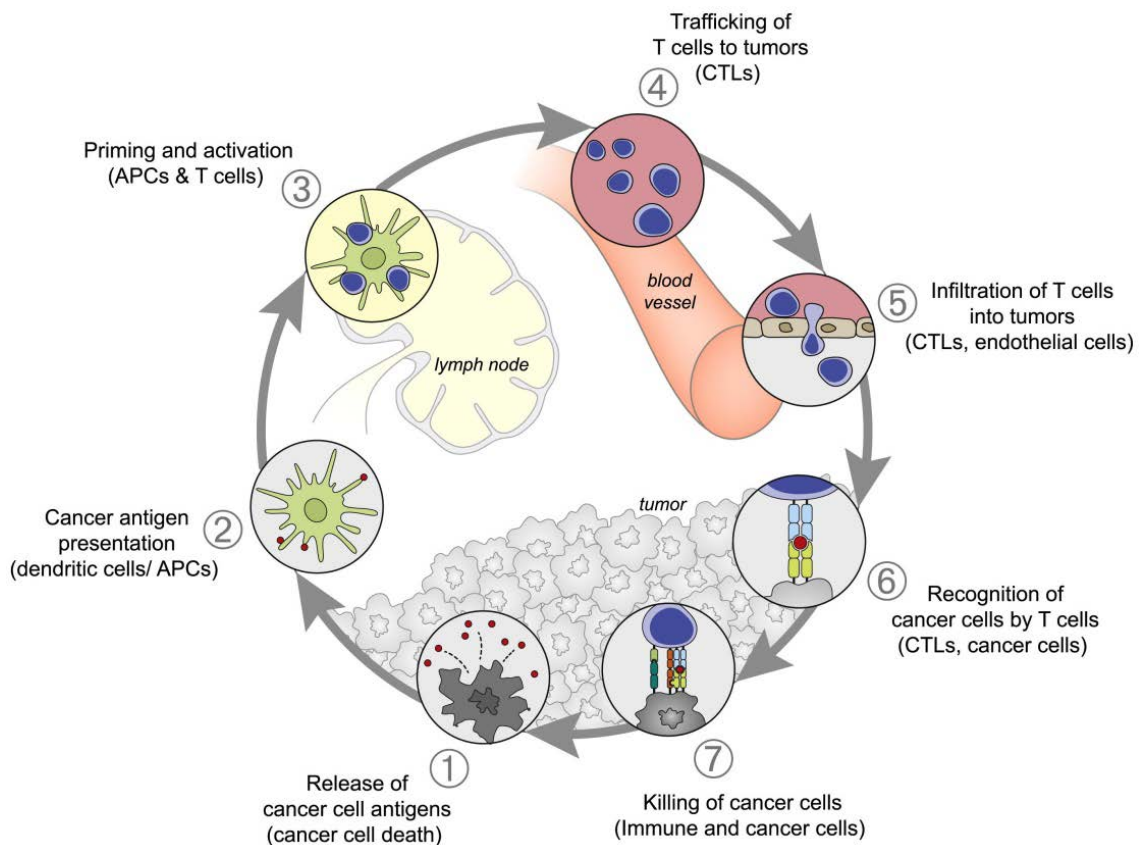
Εικόνα 1-6: Το στάδιο της αποδρομής των καρκινικών κυττάρων (Mittal et al., 2014).

Η δημιουργία ανοσολογικής απόκρισης ενάντια στον καρκίνο είναι μια διεργασία που μπορεί να είναι ιδιαίτερα δυναμική, οδηγώντας σε συσσώρευση ανοσοδιεγερτικών παραγόντων που θα πρέπει κατ' αρχήν να ενισχύσουν και να διευρύνουν τις αποκρίσεις των T-κυττάρων. Υπάρχει μία αλληλουχία γεγονότων που χαρακτηρίζει την ανοσολογική απόκριση εναντίον του καρκινικού όγκου και αποτελεί έναν κύκλο αλληλεπίδρασης καρκινικών κυττάρων με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτός ο κύκλος μπορεί να χωριστεί σε επτά σημαντικά στάδια, ξεκινώντας με την απελευθέρωση αντιγόνων από το καρκινικό κύτταρο και τελειώνοντας με τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Ο κύκλος χαρακτηρίζεται επίσης από ανασταλτικούς παράγοντες που οδηγούν σε μηχανισμούς ανατροφοδότησης της ανοσολογικής ρύθμισης, οι οποίοι μπορούν να σταματήσουν την ανάπτυξη ή να περιορίσουν την ανοσολογική απόκριση [35].

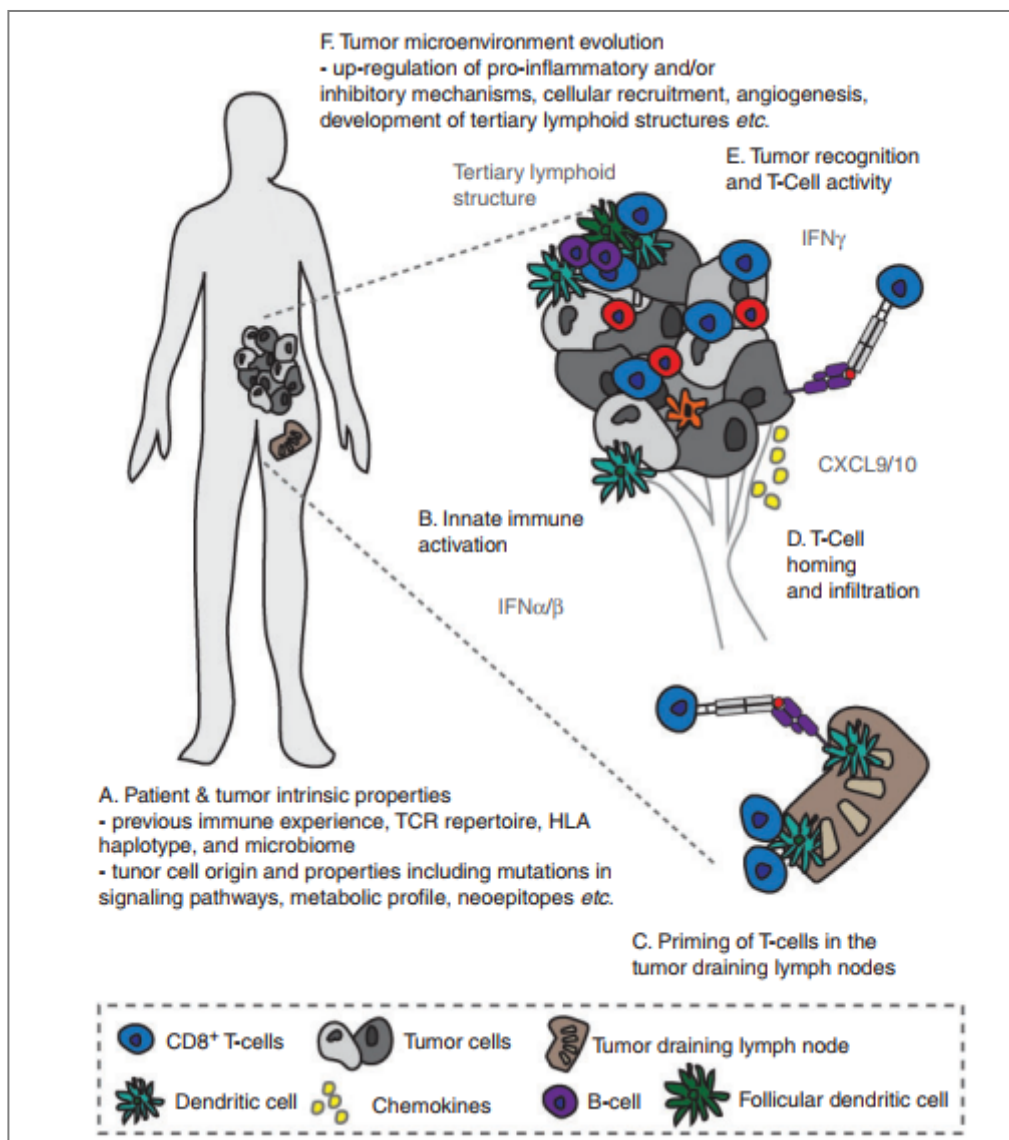
Για μια αποτελεσματική απόκριση έναντι των καρκινικών κυττάρων που οδηγεί σε θανάτωση των κυττάρων αυτών, πρέπει να ξεκινήσει μια σειρά διαδοχικών συμβάντων που θα επιτρέψει να λάβει χώρα και να επεκταθεί η ανοσολογική απόκριση. Στο πρώτο στάδιο, τα νεοαντιγόνα που δημιουργούνται από την ογκογένεση απελευθερώνονται και συλλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα-DCs για επεξεργασία (στάδιο 1). Στη συνέχεια, τα DCs παρουσιάζουν τα συλληφθέντα αντιγόνα στα μόρια MHC-I και MHC-II των T-κυττάρων (στάδιο 2), με αποτέλεσμα την εκκίνηση και την ενεργοποίηση T-κυττάρων τελεστών έναντι των ειδικών αντιγόνων του καρκίνου (στάδιο 3). Η φύση της ανοσοαπόκρισης προσδιορίζεται σε αυτό το στάδιο, με μια κρίσιμη ισορροπία που αντιπροσωπεύει την αναλογία των T-κυττάρων τελεστών έναντι των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) που είναι βασική για το τελικό αποτέλεσμα. Τέλος, η κυκλοφορία των ενεργοποιημένων T-κυττάρων τελεστών (στάδιο 4) οδηγεί σε διείσδυσή τους στον όγκο (στάδιο 5), όπου αναγνωρίζουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα T-κυττάρων (TCR) και του συγγενικού αντιγόνου στο καρκινικό κύτταρο, συνδεδεμένου με MHC-I (στάδιο 6) και σε θανάτωση του καρκινικού κυττάρου-στόχο (στάδιο 7). Η θανάτωση του καρκινικού κυττάρου απελευθερώνει επιπρόσθετα αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο, ώστε επαναλαμβάνεται το

στάδιο 1, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ανοσολογική απόκριση με μελλοντικές επαναλήψεις του κύκλου. Σε ασθενείς με καρκίνο, ο κύκλος Καρκίνου-Ανοχής δεν λειτουργεί άριστα. Τα αντιγόνα των όγκων μπορεί να μην ανιχνευθούν, τα DCs και τα T-κύτταρα μπορεί να αντιμετωπίζουν τα αντιγόνα ως εαυτά και όχι ως ξένα, δημιουργούν κυρίως αποκρίσεις από Tregs και όχι από κύτταρα τελεστές, τα T-κύτταρα μπορεί να μην είναι ικανά να διεισδύσουν στον όγκο και μπορεί η παρεμπόδιση να οφείλεται σε παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Εικόνα 1-7) [35].

Τα T-κύτταρα εκπαιδεύονται στον θύμο αδένα για να διακρίνουν τα εαυτά από τα μη εαυτά πεπτίδια/πρωτεΐνες μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα T-κύτταρα που έχουν TCR με πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή συγγένεια για το MHC εξαλείφονται κατά τη διάρκεια της θετικής και αρνητικής επιλογής στο θύμο, αντίστοιχα. Έχοντας περάσει αυτή τη διαδικασία, τα T-κύτταρα κυκλοφορούν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα ώστε να ενεργοποιηθούν από αντιγονοπαρουσιακικά κύτταρα (APC). Στο πλαίσιο του καρκίνου, αυτό μπορεί να λάβει χώρα στους παρακείμενους λεμφαδένες (Tumor draining Lymph Nodes) με DCs που παρουσιάζουν καρκινικούς επιτόπους.



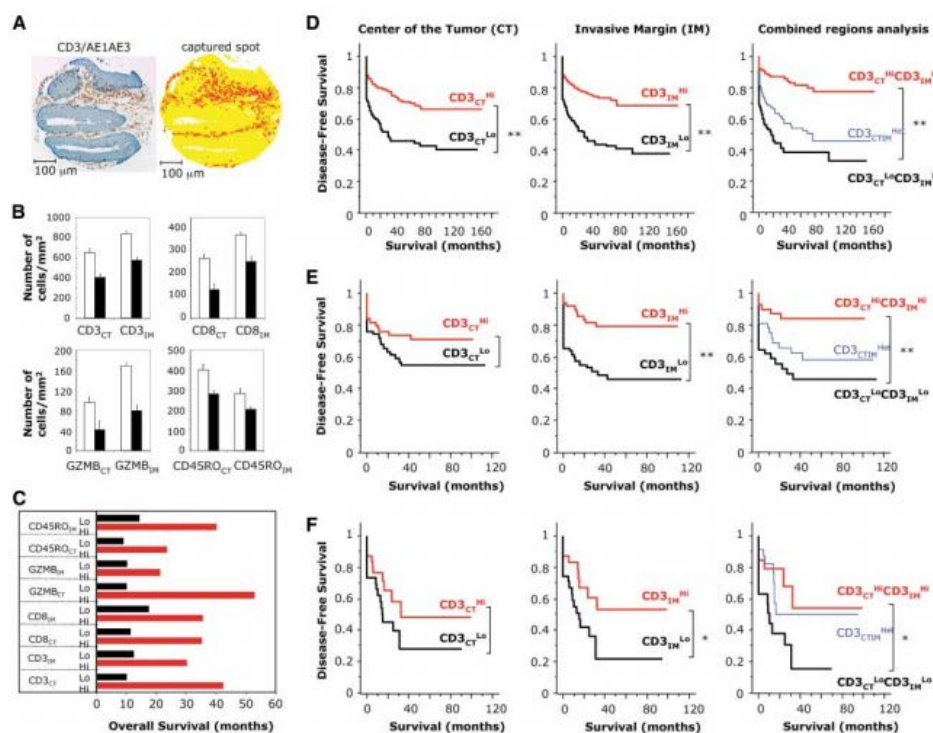
Εικόνα 1-7: Εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης εναντίον του καρκινικού όγκου (Chen and Mellman, 2013).



Εικόνα 1-8: Επισκόπηση των βημάτων και των μεταβλητών που οδηγούν στη διήθηση και τη δράση των T-κυττάρων στους όγκους. (A) Προηγούμενη ανοσολογική εμπειρία- μνήμη του ασθενούς και μεταλλάξεις κυττάρων του όγκου). (B) Η πρώιμη έμφυτη ανοσοποιητική ενεργοποίηση DCs που παράγουν IFN τύπου I είναι κρίσιμη για την προσέλκυση και αρχική ενεργοποίηση (priming) των T-κυττάρων στους παρακείμενους λεμφαδένες (TdLNs) (C). Τα T-κύτταρα που ενεργοποιούνται στα TdLNs πρέπει να κατευθύνονται χημειοτακτικά στον όγκο και παρακάμπτοντας διάφορα εμπόδια, τελικά να τον διηθούν (D). Τα T-κύτταρα στον όγκο πρέπει να είναι λειτουργικά (E). Η έκκριση της IFN- γ από ενεργοποιημένα T-κύτταρα θα προκαλέσει μια σειρά γεγονότων στον όγκο, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης έκφρασης του PD-L1, ενώ η ανάπτυξη τριτοταγών λεμφικών δομών (TLS) στον όγκο μπορεί να βοηθήσει στην προώθηση της τοπικής προσαρμοστικής ανοσίας (F). Εμπόδια σε πολλά από αυτά τα βήματα μπορούν δυνητικά να καταργήσουν την διήθηση ή/και δραστικότητα των T-κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Lanitis et al., 2017).

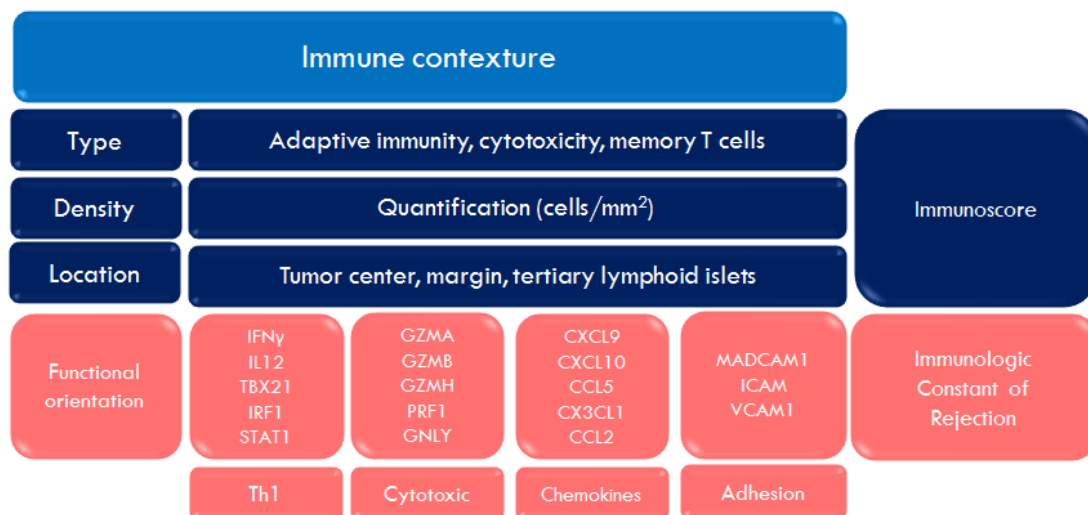
1.1.3 ΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

Η διήθηση Τ-κυττάρων στον όγκο, τόσο στο κέντρο (CT) όσο και στο διηθητικό μέτωπο (IM) του όγκου, έχουν σημαντική προγνωστική αξία. Οι πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, έδειξαν ότι ο αριθμός των Τ λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο (TIL) καθώς και η χωροταξική τους κατανομή, σχετίζονται με τη συνολική ή ελεύθερης νόσου επιβίωση [14, 36]. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα TILs στη διάγνωση, φαίνεται να σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό υποτροπής σε ασθενείς με πρώιμου σταδίου τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC) [37]. Έτσι, ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ο όρος immunoscore «ανοσοσκόρ», ως ένα προγνωστικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση διηθούντων ανοσοκυττάρων, τα οποία φαίνονται, σε κάποιες περιπτώσεις, να έχουν υψηλότερη προγνωστική αξία από την κλασική σταδιοποίηση κατά TNM. Ο όρος εισήχθη πρώτη φορά το 2006 από τον Jerome Galon, ο οποίος και όρισε το immunoscore τονίζοντας πως σημασία στη διήθηση των όγκων από ανοσοκύτταρα έχει τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα των κυττάρων αυτών (Εικόνα 1-9) [14].



Εικόνα 1-9: Το ανοσοσκόρ (immunoscore) όπως προτάθηκε από τον Galon το 2006 και καμπύλες επιβίωσης ασθενών που αποδεικνύουν τον προγνωστικό ρόλο των ανοσοκυττάρων που διηθούν τους όγκους.

Ένα χρόνο αργότερα, το 2007, ο Galon εμπλουτίζοντας και συμπληρώνοντας την έννοια του immunoscore κάνει λόγο για immune contexture/ ανοσολογικό περιεχόμενο και περιλαμβάνει τον τύπο, την πυκνότητα, τη λειτουργικότητα και την χωροταξική κατανομή των ανοσοκυττάρων εντός του όγκου [38]. Το 2013 και πάλι η ομάδα του Galon σε μια προσπάθεια δημιουργίας «ανοσολογικών υπογραφών» για την πρόγνωση και πρόβλεψη ασθενών με καρκίνο, συνδύασαν χαρακτηριστικά του immunoscore αλλά και του immune contexture. Οι προβλεπτικές, προγνωστικές και μηχανιστικές ανοσολογικές υπογραφές αλληλεπικαλύπτονται και συνδέονται με μια αλληλουχία ανοσολογικών αντιδράσεων με συγκεκριμένο λειτουργικό προσανατολισμό, όπως φαίνεται στην εικόνα [39].



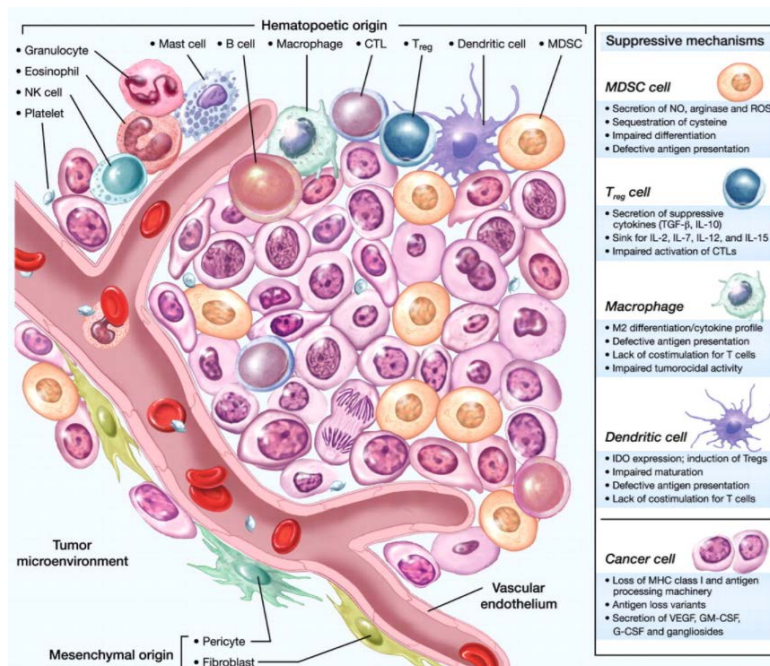
Εικόνα 1-10: Συνδυασμός του ανοσοσκόρ με παράγοντες του ανοσοποιητικού συστήματος περιγράφουν το immune contexture (Προσαρμοσμένο από Galon et al., 2013).

Πολλές ερευνητικές ομάδες παγκοσμίως άρχισαν να ασχολούνται με το immunoscore σε διάφορους τύπους καρκίνου. Ταυτόχρονα, άρχισε μια προσπάθεια να συνδυάζονται κι άλλα στοιχεία και χαρακτηριστικά του όγκου. Το 2013, ο Ascierto και η ομάδα του εισάγουν τον όρο immunoprofiling όπου πλέον χρησιμοποιείται η υπογραφή (ή προφίλ) του ανοσοποιητικού συστήματος ενός ατόμου για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης του συγκεκριμένου ασθενούς στην θεραπεία, με τη δυναμική που υπάρχει μέσω της αλληλεπίδρασης των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος [40].

Πίνακας 1-1: Διαφορές μεταξύ «ανοσοσκόρ» και «ανοσολογικού προφίλ»

Differences between Immunoscore and Immunoprofiling		
	Immunoscore Prognostic/Predictive(?)	Immunoprofiling Prognostic/Predictive(?)
Number of immune markers	2-4	1-several
Immunoscore markers	CD3/CD8	
Immunoscore-like markers	CD3/CD8/CD20/FoxP3 CD3/CD8/CD45RO CD3/CD8/CD68 CD3/CD8/CD20, CD3/GZMB CD8/FoxP3 CD8/IL-17 (others)	Immune gene signatures Multiplex assays CD137, Galectin1, LAG-3, OX40, PD-1
Possible application	Staging in colorectal cancer (already tested)	Prognostic assay
	Staging in Melanoma, Breast Cancer, Ovarian Cancer, NSCLC, Prostate Cancer, Pancreatic Cancer, Head and Neck Cancer (to be defined)	Predictive assay Personalized immune-treatment

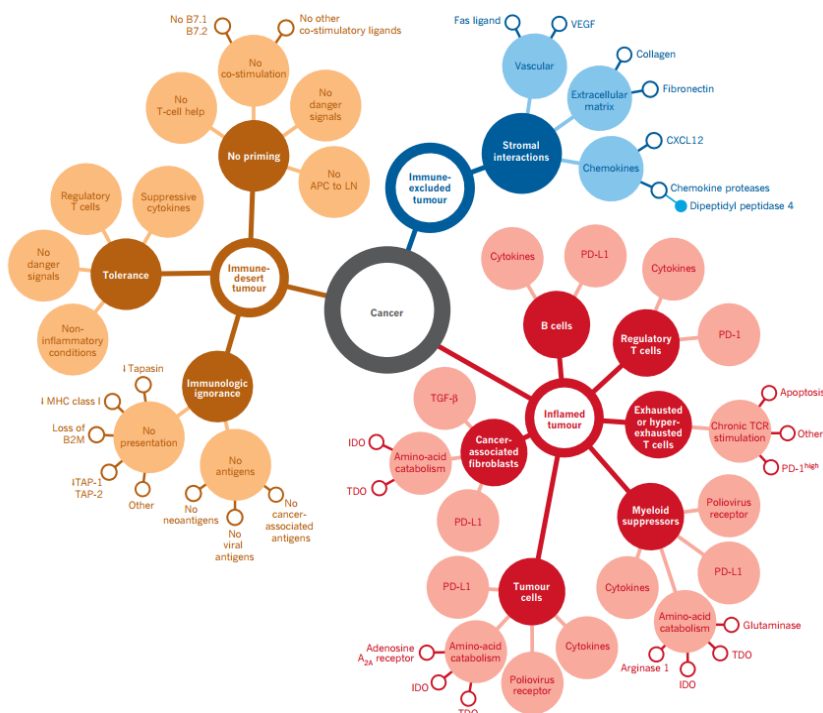
Το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι ένα χωρικά οργανωμένο «τοπίο» με διήθηση από Τ λεμφοκύτταρα και μακροφάγα που βρίσκονται τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου. Άλλες συνιστώσες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), τα μυελικής προέλευσης κατασταλτικά κύτταρα (MDSCs), τα μαστοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο διηθητικό μέτωπο του όγκου [14, 41]. Πρόσθετοι κυτταρικοί τύποι, όπως τα Β λεμφοκύτταρα και τα ώριμα DCs, καταλήγουν κατά προτίμηση σε γειτνιάζουσες τριτοταγείς λεμφικές δομές (TLSs) [42]. Η θέση αυτών των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον καθοδηγείται από το κυκλοφορικό και λεμφικό σύστημα, καθώς και από τα κύτταρα του στρώματος.



Εικόνα 1-11: Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Kerkar and Restifo, 2012).

1.1.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

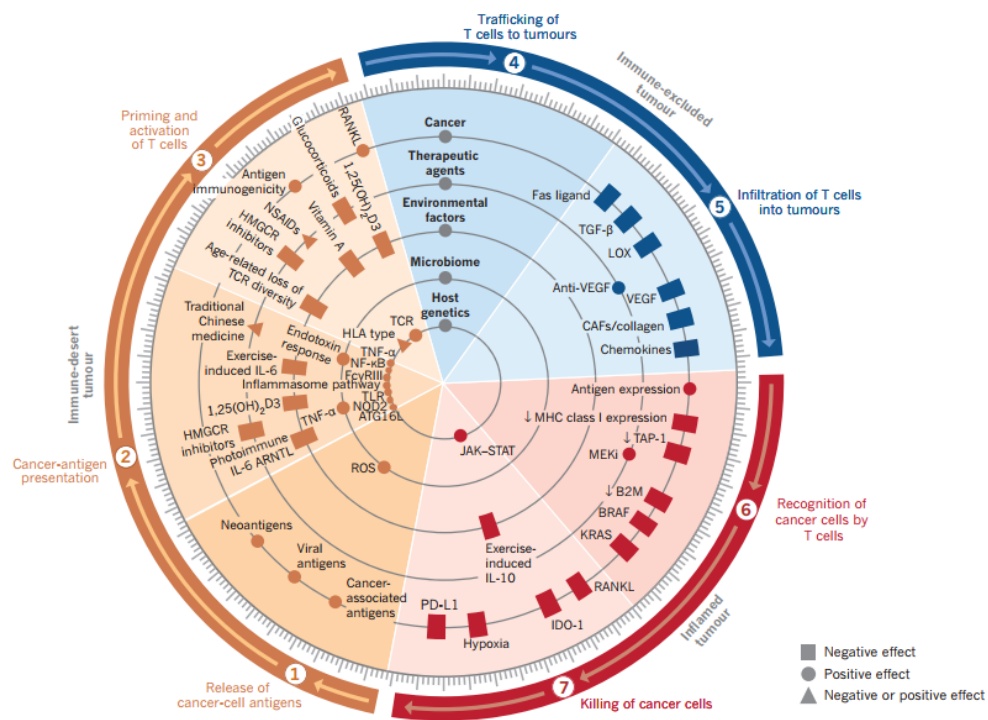
Η διήθηση του όγκου μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες: 1) «έρημος» από ανοσοκύτταρα όγκος, 2) όγκος αποκλεισμένος από ανοσοκύτταρα και 3) φλεγμονώδης όγκος. Κάθε μία σχετίζεται με συγκεκριμένους υποκείμενους βιολογικούς μηχανισμούς και μπορεί να εμποδίσει την ανοσολογική απόκριση εναντίον του όγκου. Ένας όγκος που χαρακτηρίζεται «έρημος» μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ανοσολογικής άγνοιας, της επαγωγής ανοχής ή της έλλειψης κατάλληλης ευαισθητοποίησης Τ-κυττάρων ή δραστικότητας αυτών. Οι ανοσολογικώς αποκλεισμένοι όγκοι μπορεί να αντανάκλουν μια συγκεκριμένη κατάσταση που επηρεάζεται από την παρουσία χημειοκινών, την παρουσία συγκεκριμένων αγγειακών παραγόντων ή φραγμών ή ειδικών παραγόντων του στρώματος που εμποδίζουν την ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης. Οι φλεγμονώδεις όγκοι μπορούν να διηθούνται από υποτύπους ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων Tregs, MDSCs, Β κατασταλτικών κυττάρων και ινοβλαστών που σχετίζονται με τον όγκο. Επίσης, λεμφοκύτταρα που διηθούν τους όγκους και εκφράζουν CD8 μπορούν επίσης να είναι μη λειτουργικά. Ενώ σε φλεγμονώδεις όγκους τα κύτταρα του όγκου μπορεί επίσης να εκφράζουν κατασταλτικούς



παραγόντες, μειωμένη έκφραση των μορίων MHC τάξης I ή άλλα μόρια που εμπλέκονται σε άλλα μονοπάτια και μειώνουν την αντικαρκινική ανοσία [43].

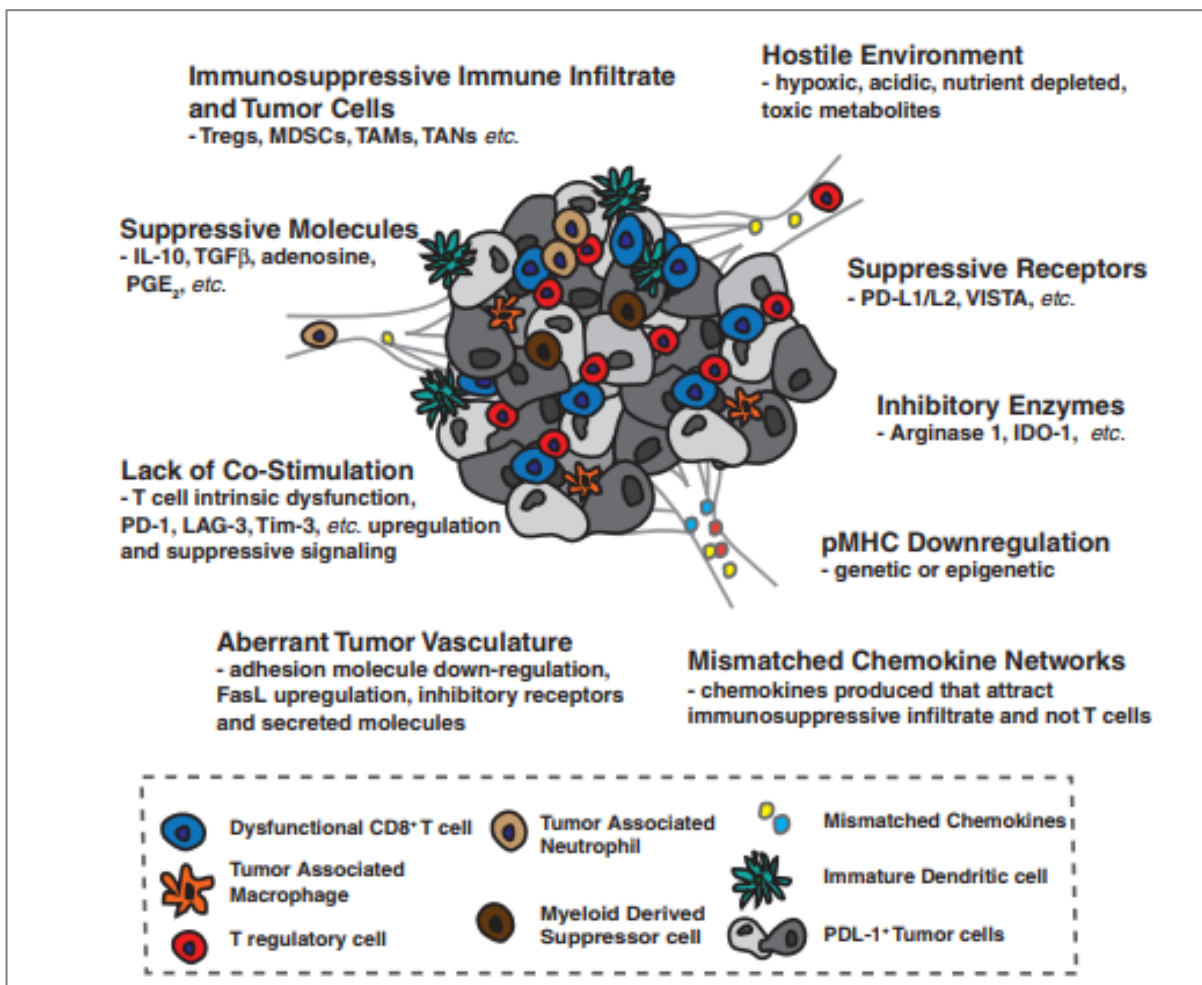
Εικόνα 1-12: Κατηγορίες διήθησης του όγκου από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (Chen & Mellman, 2017).

Η σχέση καρκίνου και ανοσοποιητικού συστήματος είναι πολυπαραγοντική και εμπλέκονται πάρα πολλά στοιχεία από την στιγμή που ένα καρκινικό αντιγόνο θα απελευθερωθεί και θα αναγνωριστεί από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μέχρι τη στιγμή που αντιγονο-ειδικά T-κύτταρα θα διηθήσουν τον όγκο, με τελικό στόχο να εξαλείψουν τα καρκινικά κύτταρα. Στην Εικόνα 1-13, παρουσιάζονται οι τρεις κατηγορίες διήθησης των όγκων και παράγοντες που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση εναντίον του καρκίνου.



Εικόνα 1-13: Παράγοντες που επηρεάζουν την στενή σχέση ανοσοποιητικού και καρκίνου (Chen & Mellman 2017).

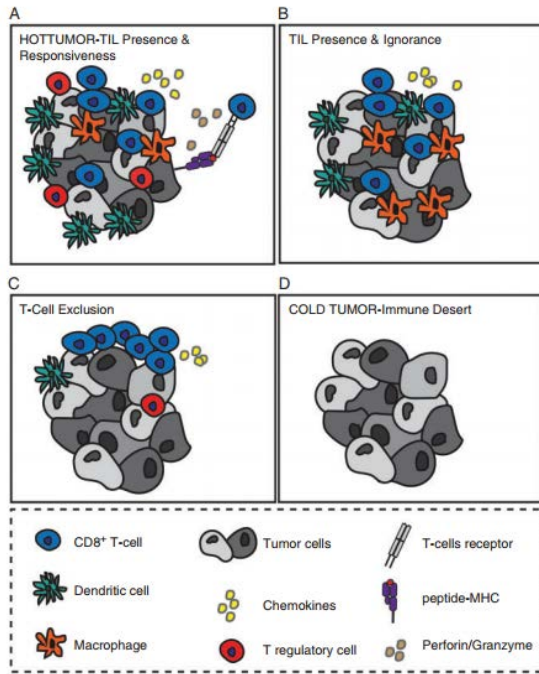
Από τη στιγμή που ανοσοκύτταρα διηθούν τους όγκους, πρέπει αυτή η διήθηση να είναι πέρα από ποσοτική και ποιοτική, και να συμπεριλαμβάνει πέρα από λειτουργικούς ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς και μόρια που εμπλέκονται σε μονοπάτια που ευνοούν την ανοσολογική απόκριση εναντίον των όγκων. Στην Εικόνα 1-14 φαίνεται ο κομβικός ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και οι «φραγμοί» που μπορούν να μπουν και να εμποδίσουν την ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου.



Εικόνα 1-14: «Φραγμοί» στην ενεργοποίηση T-κυττάρων στον όγκο (Lanitis et al., 2017).

1.1.3.2 ΔΙΗΘΟΥΝΤΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΑ

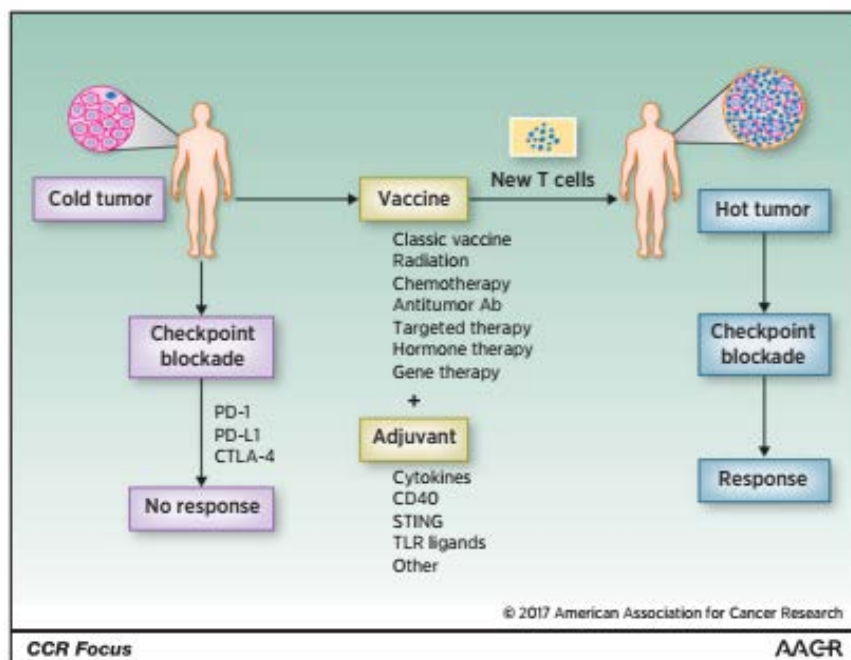
Μια πυκνή διήθηση λεμφοκυττάρων, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας τη χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H & E), είναι ένα κοινό



χαρακτηριστικό των όγκων που έχουν ευνοϊκή πρόγνωση [44-46]. Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από υψηλή διήθηση και από Τ-κύτταρα χαρακτηρίζονται ως «θερμοί» όγκοι (hot tumors), ενώ όγκοι που είναι απροσπέλαστοι για τα Τ-κύτταρα ονομάζονται «ψυχροί» όγκοι και αποτελούν ένα απομονωμένο περιβάλλον για το ανοσοποιητικό σύστημα [47].

Εικόνα 1-15: «Θερμοί και ψυχροί» όγκοι (Lanitis et al., 2017).

Στόχος πολλών αντικαρκινικών εμβολίων είναι η μετατροπή «ψυχρών» όγκων σε «θερμούς», η ενίσχυση δηλαδή της διήθησης από Τ-κύτταρα [48].

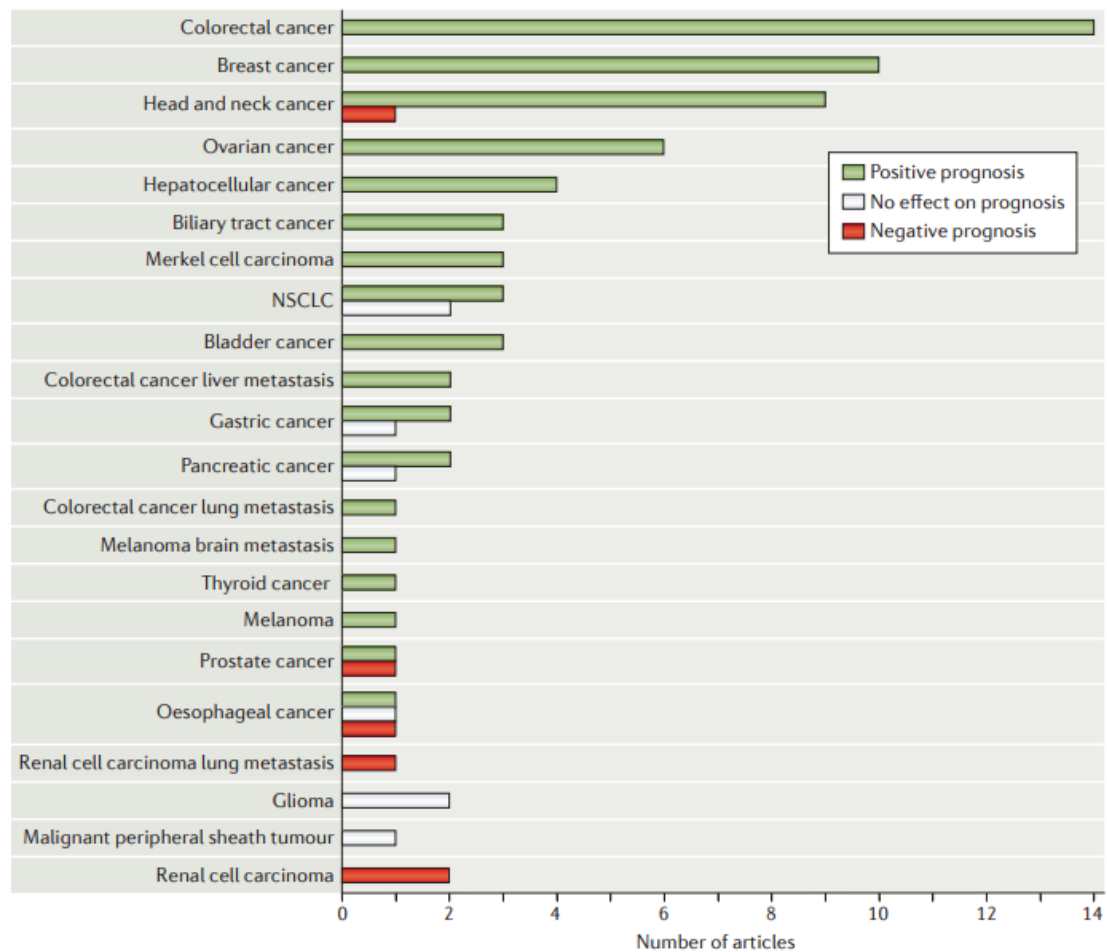


Εικόνα 1-16: Στόχος εμβολίων είναι η μετατροπή «ψυχρών» όγκων σε «θερμούς» (Vonderheide et al, 2017).

Ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου (CRC) με μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite instability- MSI), που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ανοσογονικότητας και υψηλή διήθηση από λεμφοκύτταρα, εμφανίζουν μικρότερη πιθανότητα μετάστασης [49]. Επιπλέον, υψηλός βαθμός διήθησης του όγκου από CD3+ T-κυττάρα συσχετίζεται με ευνοϊκή, χωρίς επιδείνωση, επιβίωση (PFS) και συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών [50]. Ομοίως, σε ασθενείς με CRC, η υψηλή διήθηση από T-κύτταρα μνήμης (ιδιαίτερως από CD8+ T δραστικά κύτταρα) συσχετίζεται με χαμηλή πιθανότητα μετάστασης και παρατεταμένη PFS και συνολικής διάρκειας επιβίωση [14]. Εκτενείς μελέτες σε ασθενείς με CRC στη διάγνωση έχουν αποκαλύψει ότι ο υψηλός βαθμός διήθησης του όγκου από T-κύτταρα μνήμης με προσανατολισμό T_H1 (που παράγουν IFN-γ) και κυτταροτοξικά CD8+ T-κύτταρα (που παράγουν περφορίνη και συνένζυμα) έχουν ευνοϊκότερη πρόγνωση [51].

Πληθώρα ανοσοϊστοχημικών μελετών έχει πραγματοποιηθεί και έχει αναδείξει τη σημαντικότητα της διήθησης κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα έχουν εστιάσει στη διαμερισματοποίηση της διήθησης στο κέντρο (TC) και στο διηθητικό μέτωπο (IM) του όγκου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχει θεσπιστεί το «ανοσοσκόρ», ως προσπάθεια πρόγνωσης μέσω αξιολόγησης του βαθμού διήθησης και της πυκνότητας από CD3 + και CD8+ T-κύτταρων στο κέντρο και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου ασθενών με CRC, σε μια παγκόσμια συνεργασία που περιλαμβάνει περίπου 4.000 ασθενείς [49]. Το «ανοσοσκόρ» φαίνεται να είναι ακριβέστερο από την συμβατική ιστολογία, ή ακόμη και από τον προσδιορισμό της κατάστασης μικροδορυφορικής αστάθειας, στην πρόγνωση ασθενών με CRC πρώιμου σταδίου [52]. Οι πρώιμες παρατηρήσεις των ευνοϊκών κλινικών επιπτώσεων της παρουσίας CD8+ T-κυττάρων σε ασθενείς με καρκίνο ωθηκών και CRC έχουν επιβεβαιωθεί και επεκταθεί και σε πολλούς άλλους τύπους καρκίνου, όπως μελανώματος, μαστού, ηπατοκυτταρικού, κεφαλής και τραχήλου, ουροδόχου κύστεως, πνεύμονα, παγκρεατικού και γαστρικού (Πίνακας 1-2). Περαιτέρω μετρήσεις συναινοούν πως οι πυκνότητες CD8+ T-κυττάρων τόσο στο TC όσο και στο IM των όγκων φαίνεται να ενισχύουν την προγνωστική εγκυρότητα του ανοσοσκόρ, αν και η συνολική πυκνότητα των CD8+ T-κυττάρων, από μόνη της ως παράμετρος έχει σημαντική κλινική σημασία [14]. Παραδόξως, έχει παρατηρηθεί μια

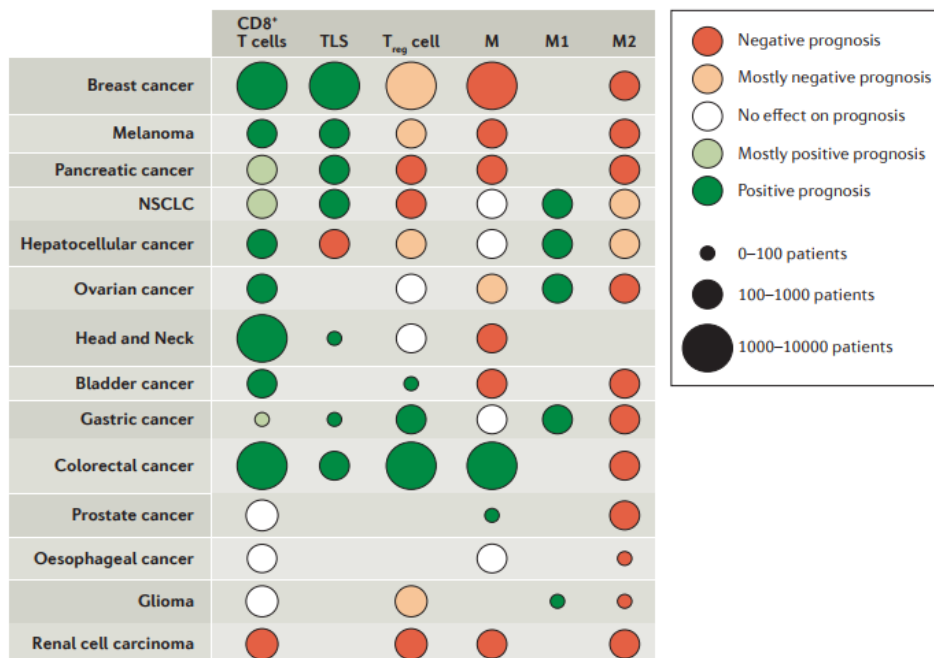
δυσμενής συσχέτιση μεταξύ υψηλής πυκνότητας διήθησης CD8+ T-κυττάρων στο διηθητικό μέτωπο του όγκου (συμπεριλαμβανομένου του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος του νεφρού [53, 54], του καρκίνου του προστάτη [55], του διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα [56] και του λεμφώματος Hodgkin [57]) με μικρότερο PFS και μικρότερη OS. Η συσχέτιση αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα αγγειογένεσης που επηρεάζουν τη διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, σε συνδυασμό με χαμηλή πυκνότητα TLS, υψηλό αριθμό ανώριμων DCs που στρατολογούν Tregs, CD8+ T-κύτταρα με περιορισμένη κυτταροτοξική ικανότητα που, πιθανώς, δεν αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο (TAA)- ένα αποτέλεσμα που συνδυάζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης PD-L1 [53]. Ωστόσο, σε μια υποομάδα ασθενών με ccRCC με υψηλή πυκνότητα διήθησης από λειτουργικά CD8+ T-κύτταρα που παράγουν περφορίνη παρατηρείται ευνοϊκή πρόγνωση [58]. Υπάρχει ένα σημαντικό ερώτημα σχετικά με την προέλευση των ειδικών T-κυττάρων για τα ογκοσχετιζόμενα αντιγόνα, μέσα στον όγκο. Χαμηλής κυτταροτοξικότητας κυκλοφορούντα δραστικά T-κύτταρα μνήμης μπορούν να εισέλθουν μέσω φλεβιδίων και στη συνέχεια να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν εντός των TLS ενώ βρίσκονται σε επαφή με ώριμα DCs. Εναλλακτικά, τα T-κύτταρα μπορεί να εισέλθουν απευθείας σε όγκους μέσω φλεγμονής ενδοθηλίου, ακολουθούμενη από τοπική διαφοροποίηση [59].



Εικόνα 1-17: Η συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας των CD8+ T-κυττάρων και της συνολικής επιβίωσης μεταξύ των ασθενών με πρωτοπαθείς ή μεταστατικούς συμπαγείς όγκους. Το γράφημα συνοψίζει τον αριθμό των άρθρων που περιέχουν πληροφορίες σχετικά με την επίδραση του CD8+ T-κυττάρων, όπως εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία, σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο. Το χρώμα των στηλών υποδεικνύει μια καλή πρόγνωση που σχετίζεται με τα CD8+ T κύτταρα (πράσινο) ή κακή πρόγνωση (κόκκινο) (Fridman et al., 2017).

1.1.3.3 ΔΙΗΘΟΥΝΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα μακροφάγα αποτελούν σημαντικό συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, και εντοπίζονται τόσο στο κέντρο του όγκου όσο και στο διηθητικό μέτωπο, αλλά και στα TLS. Στους περισσότερους όγκους, τα μακροφάγα είναι κυρίως M2 φαινοτύπου, ευνοώντας γενικά την ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός επιθετικού φαινοτύπου. Η πυκνότητα τέτοιων μακροφάγων συσχετίζεται με κακή πρόγνωση μεταξύ των ασθενών με καρκίνο μαστού, ουροδόχου κύστεως, ωθηκών, προστάτη, RCC και μελανώματος. Αντιστρόφως, η μεγάλη πυκνότητα M1 μακροφάγων συσχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση μεταξύ των ασθενών με NSCLC, HCC, καρκίνο ωθηκών ή γαστρικό καρκίνο (Πίνακας 1-2 [60]). Σε μερικούς καρκίνους, ωστόσο, η πρόγνωση εξαρτάται από την χωροταξική κατανομή των μακροφάγων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, και πιθανόν οφείλεται σε μια δυναμική μετάβαση από τον M1 στον M2 φαινότυπο, που μπορεί να συμβεί τοπικά [61]. Τα MDSCs μπορούν επίσης να είναι παρόντα και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος.



Εικόνα 1-18: Επιδράσεις της διήθησης υποπληθυσμών ανοσοκυττάρων στην πρόγνωση ασθενών με καρκίνο. Παρουσιάζονται δεδομένα από 200 μελέτες όπως παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1-2), στις οποίες συμμετείχαν περίπου 25.000 ασθενείς και αναλύθηκαν τα CD8+ T-κύτταρα, τριτοταγείς λεμφικές δομές (TLS), ρυθμιστικά T-κύτταρα (Tregs), CD68+ μακροφάγα (M) και πιο συγκεκριμένα, μακροφάγα υποτύπου M1 ή M2 ως προς την συνολική επιβίωση ασθενών. Τα έντονα χρώματα δείχνουν θετική (πράσινη) ή αρνητική (κόκκινη) προγνωστική αξία μετά από ανάλυση όλων των σχετικών μελετών. Τα ανοιχτά χρώματα δείχνουν θετική (ανοιχτό πράσινο) ή αρνητική (πορτοκαλί) προγνωστική συσχέτιση στην πλειονότητα των μελετών που αναλύθηκαν. Λευκοί κύκλοι δεν δείχνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ή ότι παρατηρήθηκε αμφίβολη προγνωστική συσχέτιση σε παρόμοιο αριθμό μελετών. Το μέγεθος των κύκλων υποδεικνύει τον αριθμό των ασθενών που συμμετείχαν στις μελέτες. Μικροί κύκλοι: 0-100 ασθενείς, κύκλοι μεσαίου μεγέθους: 100-1000 ασθενείς και μεγάλοι κύκλοι: 1.000-10.000 ασθενείς (Fridman et al., 2017).

Πίνακας 1-2: Επίδραση της πυκνότητας των διαφορετικών τύπων ανοσοκυττάρων που διηθούν τον όγκο στην πρόγνωση ασθενών με καρκίνο (Fridman et al., 2017).

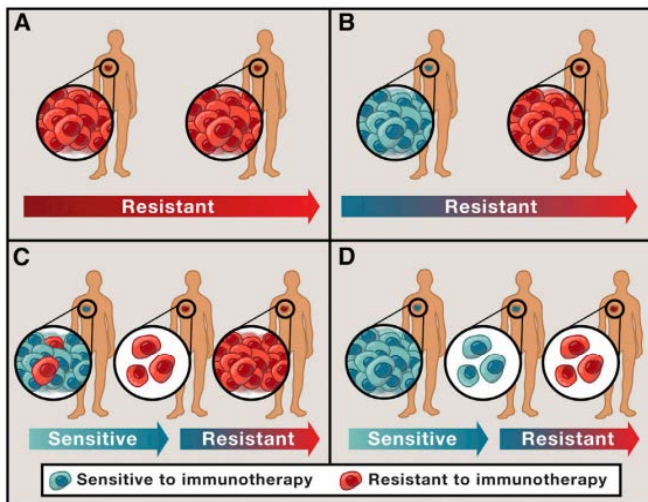
Cancer type	Impact of CD8+ T cells References	Patient No. (CD8)	Impact of TLSs References	Patient No. (TLS)	Impact of Tregs References	Patient No. (Tregs)	Impact of macroph. References	Patient No. (Macro)	Impact of M1 References	Patient No. (M1)	Impact of M2 References	Patient No. (M2)
<i>Breast cancer</i>	Good [62-71]	Good N=3868	Good [72-75]	Good N=1533	None [76] Poor [77-79]	None N=1445 Poor N=1523	Poor [68, 80-84]	Poor N=4143			Poor [84]	Poor N=144
<i>Pancreatic cancer</i>	Good [85, 86] None [87]	Good N=252 None N=81	Good [88]	Good N=534	Poor [89]	Poor N=138	Poor [90]	Poor N=141			Poor [91-94]	Poor N=401
<i>Gastric cancer</i>	Good [95, 96] None [97]	Good N=50 None N=82	Good [97]	Good N=82	Good [95, 96]	Good N=148	Good [98] None [99] Poor [100, 101]	Good N=84 None N=180 Poor N=215	Good [99, 102]	Good N=232	Poor [99, 101]	Poor N=434
<i>Melanoma</i>	Good [103]	Good N=152	Good [104, 105]	Good N=103	None [106, 107] Poor [108, 109]	None N=155 Poor N=166	Poor [110]	Poor N=227			Poor [110]	Poor N=227
<i>Colorectal cancer</i>	Good [14, 111-123]	Good N=4731	Good [124-128]	Good N=563	Good [112, 129-131]	Good N=2660	Good [132-136]	Good N=1098			Poor [137]	Poor N=289
<i>Lung carcinoma</i>	Good [138-140] None [141, 142]	Good N=355 None N=233	Good [138, 143, 144]	Good N=558	Poor [145-149]	Poor N=719	Good [139, 150, 151] Poor [152]	Good N=414 Poor N=170	Good [153-155]	Good N=140	None [153, 156] Poor [152, 155, 157]	None N=435 Poor N=378
<i>Head and neck cancers</i>	Good [158-166] Poor [167]	Good N=1031 Poor N=43	Good [168]	Good N=80	Good [169, 170] None [171] Poor [166, 172]	Good N=190 None N=60 Poor N=168	Poor [173-175]	Poor N=235				

<i>Hepatocellular carcinoma</i>	Good [176-179]	Good N=669	Poor [180]	Poor N=148	None [181] Poor [179, 182-185]	None N=141 Poor N=438	Good [186, 187] None [188] Poor [189-191]	Good N=597 None N=253 Poor N=364	Good [188]	Good N=253	None [187] Poor [188]	None N=295 Poor N=253
<i>Ovarian Cancer</i>	Good [13, 50, 192-195]	Good N=758			Good [196] Poor [197]	Good N=199 Poor N=104	None [198] Poor [199]	None N=110 Poor N=60	Good [200]	Good N=112	Poor [198]	Poor N=110
<i>Prostate Cancer</i>	Good [201] Poor [202]	Good N=325 Poor N=535					Good [203]	Good N=81			Poor [203] [204]	Poor N=305
<i>Bladder cancer</i>	Good [205-207]	Good N=380			Good [208]	Good N=37	Poor [209-211]	Poor N=359			Poor [212]	Poor N=171
<i>Oesophageal cancer</i>	Good [213] None [214] Poor [215]	Good N=70 None N=122 Poor N=103					Good [61] Poor [61, 216-218]	Good N=210 Poor N=396			Poor [219]	Poor N=70
<i>Glioma</i>	None [220, 221]	None N=152			None [221-224] Poor [220, 225]	None N=289 Poor N=91			Good [226]	Good N=50	Poor [226]	Poor N=50
<i>Renal cell cancer</i>	Poor [58, 227]	Poor N=356			Poor [228]	Poor N=100	Poor [229]	Poor N=185			Poor [229, 230]	Poor N=239
<i>Biliary Tract cancer</i>	Good [231-233]	Good N=562										
<i>Merkel cell carcinoma</i>	Good [234-236]	Good N=234										
<i>Thyroid Cancer</i>	Good [237]	Good N=263										
<i>Malignant peripheric nerve sheath tumor</i>	None [238]	None N=141										
<i>Lung cancer Brain metastasis</i>	Good [239]	Good N=32										

<i>Melanoma brain metastases</i>	Good [240]	Good N=40					
<i>Colorectal cancer liver metastasis</i>	Good [241, 242]	Good N=234					
<i>Colorectal cancer lung metastasis</i>	Good [124]	Good N=140					
<i>Renal cell cancer lung metastasis</i>	Poor [124]	Poor N=52					

1.1.4 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ, ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο καρκίνος χρησιμοποιεί τρεις βασικούς μηχανισμούς διαφυγής. Οι μηχανισμοί αυτοί προσαρμοσμένοι στην αντίσταση στην ανοσοθεραπεία παρουσιάζονται παρακάτω. Στην Εικόνα 1-19 παρουσιάζονται τα κλινικά σενάρια που μπορεί να οδηγήσουν σε αντίσταση στην ανοσοθεραπεία. (A) Ο όγκος του ασθενούς είναι ανθεκτικός στην ανοσοθεραπεία χωρίς το ανοσοποιητικό του σύστημα να είναι αποτελεσματικό και συνεπώς να μην υπάρχει ανοσολογική απόκριση. (B) Ο όγκος του ασθενούς είναι ανθεκτικός στην ανοσοθεραπεία. Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ενεργό εναντίον του όγκου, αλλά απενεργοποιείται από σημεία ελέγχου ή άλλους μηχανισμούς προσαρμοστικής αντίστασης. (C) Ο ασθενής έχει αρχική απόκριση στην ανοσοθεραπεία, αλλά αργότερα λόγω της ετερογένειας των κυττάρων που απαρτίζουν τον όγκο, έγινε επιλογή των ανθεκτικών κλώνων που υπήρχαν πριν



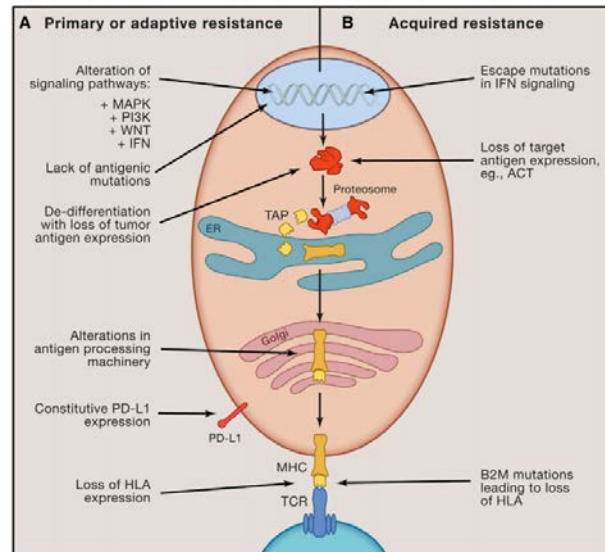
ξεκινήσει η θεραπεία. (D) Ο ασθενής έχει αρχική ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία αλλά αργότερα υποχωρεί, με αποτέλεσμα την αντίσταση στην ανοσοθεραπεία [20].

Στην Εικόνα 1-20 που ακολουθεί φαίνονται εγγενείς μηχανισμοί που ενοχοποιούνται για την αντίσταση

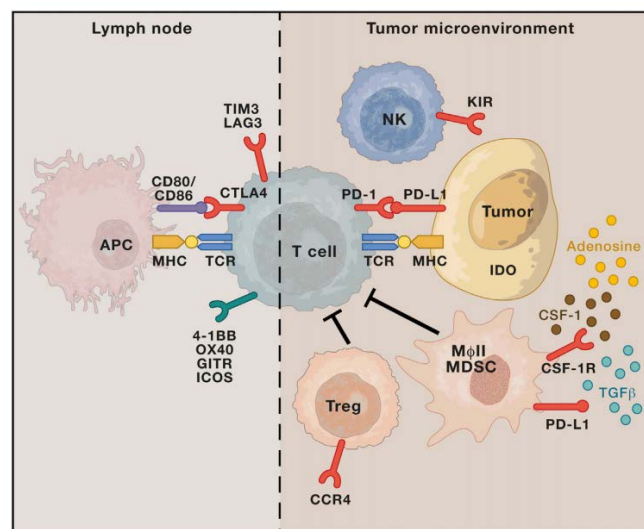
Εικόνα 1-19: Κλινικά σενάρια για την αντίσταση στην ανοσοθεραπεία (Sharma et al., 2017).

παράγοντες που οδηγούν σε πρωτογενή ή προσαρμοστική αντίσταση περιλαμβάνουν την έλλειψη αντιγονικών μεταλλάξεων, απώλεια έκφρασης αντιγόνων που σχετίζονται με τον όγκο, απώλεια έκφρασης HLA, μεταβολές στον μηχανισμό επεξεργασίας αντιγόνων, μεταβολές σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (MAPK, PI3K, WNT, IPN) και έκφραση του PD-L1. (B) Εγγενείς παράγοντες που σχετίζονται με την επίκτητη αντίσταση στην ανοσοθεραπεία, περιλαμβάνουν την απώλεια του αντιγόνο-στόχο,

απώλεια HLA, αλλαγές στην σηματοδότηση της ιντερφερόνης, καθώς και απώλεια της λειτουργικότητας των T κυττάρων.



Εικόνα 1-20: Γνωστοί ενδογενείς μηχανισμοί αντίστασης στην ανοσοθεραπεία (Sharma et al., 2017). Στην Εικόνα 1-21 που ακολουθεί φαίνονται εξωγενείς μηχανισμοί που παίζουν ρόλο στην αντίσταση στην ανοσοθεραπεία. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν το CTLA-4, το PD-1 και άλλα ανοσολογικά σημεία ελέγχου, εξάντληση T κυττάρων και αλλαγή φαινοτύπου, ανοσοκατασταλτικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (Tregs, MDSCs, Μακροφάγα τύπου II) και απελευθέρωση κυτταροκινών και μεταβολιτών στο μικροπεριβάλλον του όγκου (CSF-1, μεταβολίτες τρυπτοφάνης, TGF- β , αδενοσίνη) [20].



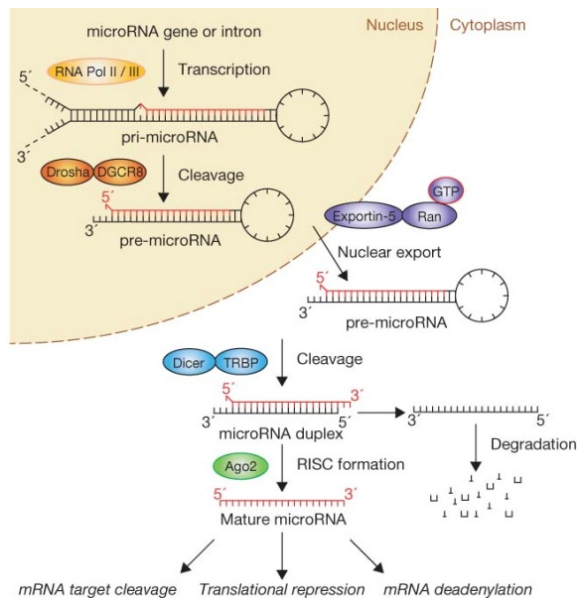
Εικόνα 1-21: Γνωστοί εξωγενείς μηχανισμοί αντίστασης στην ανοσοθεραπεία (Sharma et al., 2017).

Για δεκαετίες το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας υποστήριζε πως η ροή της γενετικής πληροφορίας μέσα στο κύτταρο έχει την εξής κατεύθυνση: από το DNA περνά στο RNA και από εκεί στις πρωτεΐνες. Με άλλα λόγια, τα γονίδια τα οποία είναι τμήματα DNA, περιέχουν την πληροφορία για τη δημιουργία των πρωτεϊνών την οποία μεταβιβάζουν μέσω του RNA (mRNA). Η αρχική διατύπωση του δόγματος, το οποίο σχηματικά συνοψίζεται ως DNA→RNA→πρωτεΐνη [243], υπέστη μια αρχική τροποποίηση όταν ανακαλύφθηκαν οι RNA-ιοί. Το γενετικό υλικό των ιών αυτών δεν είναι το DNA, όπως συμβαίνει με την πλειονότητα των οργανισμών, αλλά το RNA. Αργότερα, η παραπάνω αρχή υπέστη και άλλη τροποποίηση, μία που διαπιστώθηκε ότι μεταξύ των κομματιών του DNA τα οποία μελέτησαν οι ερευνητές κατά την τελευταία δεκαετία πολλά δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά RNA. Η πληροφορία δηλαδή η οποία εμπεριέχεται σε αυτά τα τμήματα DNA δεν χρησιμοποιείται μόνο για τη δημιουργία πρωτεϊνών, αλλά για τη δημιουργία μορίων RNA, τα οποία ονομάστηκαν μικρά RNA (microRNAs ή miRNAs).

Τα miRNAs είναι ενδογενή μικρά μη κωδικά (nc)RNAs, με μόλις 22 νουκλεοτίδια μήκος, κατά μέσο όρο, που είναι κρίσιμα για τη ρύθμιση γονιδίων σε μια ευρεία ποικιλία ευκαρυωτικών ειδών από φυτά μέχρι ζώα [244]. Τα miRNAs lin-4 και let-7 ήταν τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και βρέθηκαν να ενεργοποιούν έναν καταρράκτη γονιδιακής έκφρασης μέσω αρνητικής ρύθμισης στα αναπτυξιακά στάδια στον *Caenorabditis elegans* [245, 246]. Αρχικά υποστηρίχτηκε ότι διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο μόνο στο σκώληκα, όμως το 2001 η σημασία τους έγινε γνωστή όταν αναγνωρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν μόρια miRNA από αρκετούς οργανισμούς, ανάμεσα σε αυτούς και ο άνθρωπος. Βρέθηκε ότι οι νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες ήταν συντηρημένες [247-252]. Η ανάλυση του γονιδιώματος των θηλαστικών έδειξε ότι τα miRNAs αντιπροσωπεύουν μία από τις πιο άφθονες ομάδες ρυθμιστικών μορίων [253]. Στον άνθρωπο περισσότερα από δύο χιλιάδες miRNAs έχουν εντοπιστεί έως τώρα και υπάρχουν καταγεγραμμένα στη βάση δεδομένων miRBase [254]. Τα miRNAs ασκούν τη δράση τους μέσω αλληλεπίδρασης με τους mRNA στόχους τους.

1.2.1 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ miRNAs

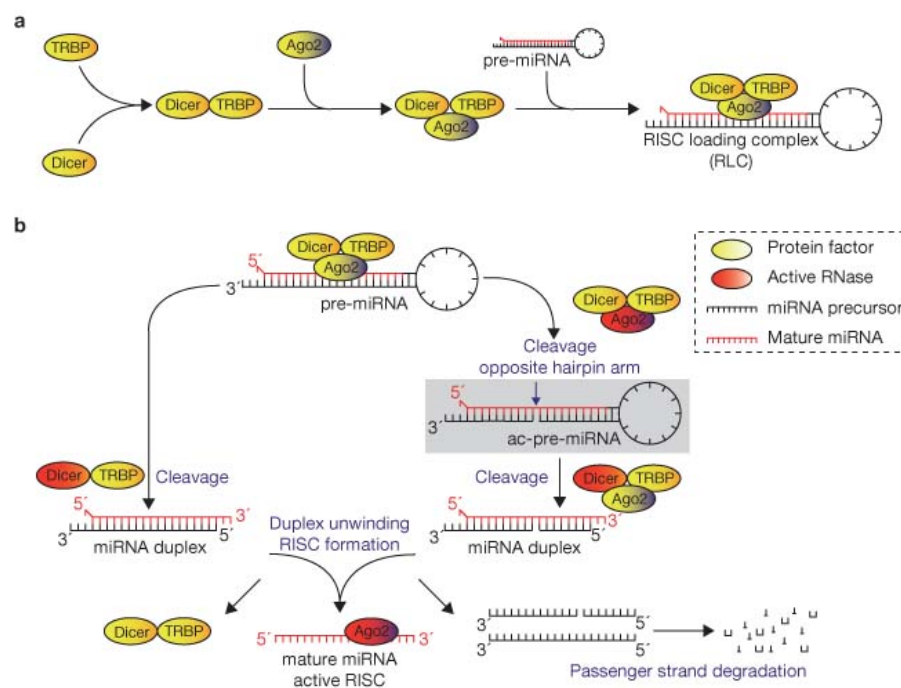
Μια κανονική οδός βιογένεσης miRNA ξεκινά με τη μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs από την RNA πολυμεράση II. Η πλειοψηφία των miRNAs στον άνθρωπο εκφράζεται από εσώνια, που συγκαταλέγονται στις μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος. Ένα εσώνιο με μήκος περίπου 400 νουκλεοτίδια αποκόπτεται από το πρωτογενές μετάγραφο και γίνεται το πρόδρομο miRNA (primary miRNA, pri-miRNA). Η RNάση Drosha (η οποία για να δράσει απαιτεί την παρουσία του DGCR8 στον άνθρωπο) πέπτει το pri-miRNA και καταλήγει στη μορφή βρόχου φουρκέτας με μήκος περίπου 70 νουκλεοτίδια, σχηματίζοντας το pre-miRNA. Αυτό στη συνέχεια εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από μια πρωτεΐνη της πυρηνικής μεμβράνης, την εξπορτίνη 5 (exportin-5) και αποκόπτεται από το ένζυμο Dicer, το οποίο συνδέεται με την πρωτεΐνη TRBP. Οι πρωτεΐνες Exp-5 και RAN-GTP δημιουργούν σύμπλοκο με το pre-miRNA το οποίο συνδεόμενο με νουκλεο-πορίνες περνά μέσα από τους πυρηνικούς πόρους στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση των pre-miRNAs στο κυτταρόπλασμα συνδέεται με την υδρόλυση του συνδεδεμένου στη RAN GTP σε GDP από την RAN-GAP. Η RAN-GDP και η Exp-5 στη συνέχεια μεταφέρονται πίσω στον πυρήνα και η RAN-GDP αναγεννάται από την RCC1 (παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου της RAN). Μόνο ο ένας από τους δύο κλώνους του miRNA, που ονομάζεται ώριμος κλώνος (ή



καθοδηγητής RNA), ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC, που αποτελείται κυρίως από τις πρωτεΐνες Argonaute, ενώ ο άλλος κλώνος, που ονομάζεται επιβάτης RNA, διασπάται. Αφού μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα η RNάση Dicer ολοκληρώνει την επεξεργασία του μορίου, έτσι ώστε να προκύψει το ώριμο miRNA [255, 256] (Εικόνα 1-22).

Εικόνα 1-22: Η «γραμμική» κανονική οδός της επεξεργασίας των miRNAs (Winter et al., 2009).

Το σύμπλοκο RLC (αποτελούμενο από την Dicer, την TRBP και την Ago2) δεσμεύεται στο pre-miRNA και προκαλεί τη διάσπασή του, τον διαχωρισμό των δύο κλώνων και τον σχηματισμό του συμπλόκου miRISC. Το δεύτερο μοντέλο επικαλείται, πρώτα την διάσπαση του συμπληρωματικού κλώνου από την Ago2, επιτρέποντας το σχηματισμό μιας μεταβατικής miRNA μορφής που ονομάζεται Ac-pre-miRNA (Ago2-cleaved προ-miRNA) και ακολούθως τη διάσπαση από την Dicer. Σε αυτό το μοντέλο, ο κλώνος επιβάτης αποικοδομείται στη συνέχεια [257] (Εικόνα 1-23).



Εικόνα 1-23: Το Ago2 δημιουργεί ένα επιπλέον ενδιάμεσο, το ac-pre-miRNA (Winter et al., 2009).

Από την ανακάλυψη των miRNAs φάνηκε ότι αυτά εμπλέκονται στα περισσότερα βιοχημικά και αναπτυξιακά μονοπάτια και τους έχει αποδοθεί σημαντικός ρόλος. Τα miRNA ελέγχουν τη μετάφραση ορισμένων mRNA μέσω πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένες θέσεις στην 3' UTR. Παρατηρήθηκε ότι περιοχές στην 3' UTR ορισμένων γονιδίων στην Δροσόφιλα παρουσίαζαν μερική ομολογία με κάποια miRNA [258]. Συγκεκριμένα, τα έξι πρώτα νουκλεοτίδια στη 5' περιοχή ορισμένων miRNA ήταν πλήρως συμπληρωματικά με γνωστά μοτίβα τα οποία εντοπίζονται στην 3' UTR ορισμένων mRNA, και εμπλέκονταν στην μετάφραση τους. Εκτός από τα 5-6

νουκλεοτίδια την 5' περιοχής των miRNA, τα υπόλοιπα προσδένονται με μερική συμπληρωματικότητα. Αυτή η παρατήρηση αποσαφήνισε την λειτουργία των miRNAs καθώς φαίνεται ότι τα miRNAs ελέγχουν την μετάφραση ενός mRNA μέσω πρόσδεσης τους στην 3' UTR. Η πρόσδεση αυτή γίνεται με μερική συμπληρωματικότητα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες παρεμποδίζοντας την μετάφραση τους. Η ισχυρή πρόσδεση του miRNA στο στόχο του οδηγεί στην αποικοδόμηση του RNA όπως γίνεται και στην περίπτωση των siRNAs. Το συμπέρασμα ότι ελέγχουν την μετάφραση προκύπτει από το γεγονός ότι ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώνονται, η ποσότητα του mRNA παραμένει σταθερή [259]. Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας για την λειτουργία των miRNA επικεντρώνεται στην ανίχνευση γονιδίων που ελέγχονται από miRNA, καθώς μία συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχος ενός miRNA μπορεί να υπάρχει σε πολλά διαφορετικά γονίδια. Από την άλλη μεριά, ένα γονίδιο μπορεί να είναι στόχος πολλών διαφορετικών miRNAs [260].

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο των miRNAs στην εμβρυική ανάπτυξη, την κυτταρική διαφοροποίηση, την ομοιόσταση και άλλες κυτταρικές λειτουργίες και παθολογικές καταστάσεις (καρκίνος/αυτοανοσία). Σημαντικό κομμάτι της δράσης τους αφορά στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος [261]. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη, ωρίμανση και λειτουργικότητα όλων σχεδόν των υποπληθυσμών των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος [262, 263]. Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό των αλλαγών των επιπέδων miRNAs τόσο στο καρκινικό κύτταρο σε σχέση με το φυσιολογικό [264], ρυθμίζοντας πολλές παραμέτρους που σχετίζονται με την ανάπτυξη του όγκου, τη μετάσταση, και την χημειο-αντοχή [260, 265], όσο και στον ορό ασθενών με καρκίνο. Ειδικότερα, μελέτες που αφορούν στον καρκίνο του μαστού έχουν ως στόχο να συσχετίσουν κυκλοφορούντα, στον ορό, miRNAs με την κλινική έκβαση της νόσου αλλά και με τη διαφορική αντίδραση των ασθενών σε θεραπευτικά σχήματα που ακολουθήθηκαν [266-268]. Μερικά παραδείγματα miRNAs που μελετώνται είναι τα miR-21, miR-146a κ.α. Ταυτόχρονα όμως τα miRNAs επιδρούν ποικιλοτρόπως και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας είτε σε ενίσχυση, είτε σε καταστολή της δράσης υποπληθυσμών κυττάρων [269, 270].

1.2.2 miRNAs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.2.2.1 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

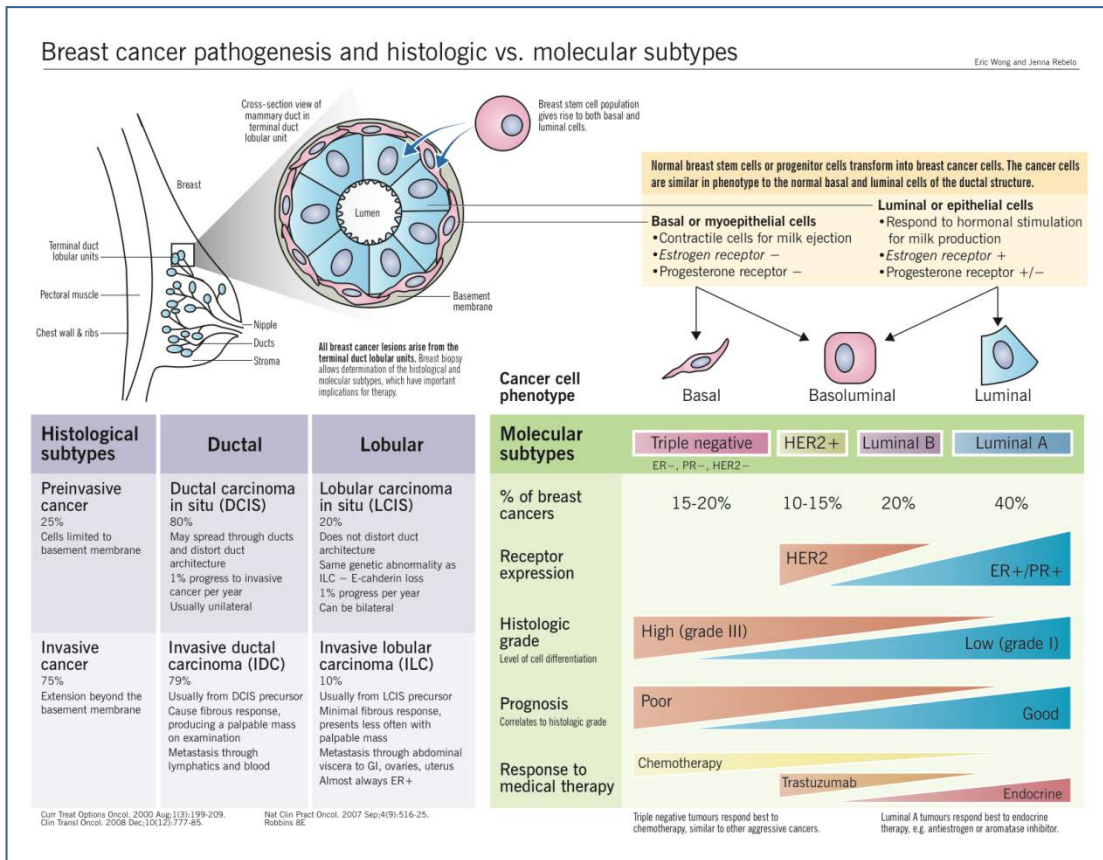
Ο καρκίνος αποτελεί μία σύνθετη ασθένεια και χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, εισβολή τους στους γύρω ιστούς καθώς και μετάστασή τους σε άλλα όργανα. Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός καρκίνος και αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου που οδηγεί σε θάνατο τις γυναίκες παγκοσμίως [271].

Οι πιο συχνές ανωμαλίες που εντοπίζονται στο μαστό είναι στην πλειονότητά τους καλοήθειες. Οι ανωμαλίες αυτές διακρίνονται σε 3 βασικές ομάδες, με διαφορετική πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου στο μέλλον [272]: 1) Βλάβες χωρίς κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως κύστες και ινώσεις, οι οποίες δεν έχουν σχεδόν καμία επικινδυνότητα για να οδηγήσουν σε καρκίνο, 2) Βλάβες στις οποίες υπάρχει κυτταρικός πολλαπλασιασμός, χωρίς ατυπίες, όπως το ινωαδένωμα μαστού, στις οποίες υπάρχει πιο αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου 3) Βλάβες στις οποίες εντοπίζονται κύτταρα με έντονο πολλαπλασιασμό, που εμφανίζουν ατυπίες, όπως στην ατυπική υπερπλασία σε γαλακτοφόρους αδένες/αγωγούς. Σε αυτή την περίπτωση αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό η πιθανότητα για μετέπειτα ασθένεια [273, 274].

Παρά την ύπαρξη πολλών τύπων καλοηθειών στο μαστό, το μεγαλύτερο κομμάτι της έρευνας εστιάζει στους κακοήθεις όγκους. Σε αυτούς ανήκουν το μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα, το μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, το διηθητικό λοβιακό και το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα. Τα 2 πρώτα θεωρούνται λιγότερο επιθετικές περιπτώσεις καρκίνου, αν και μπορούν μερικές φορές να δώσουν μεταστάσεις [275]. Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου, ξεκινώντας από τους γαλακτοφόρους αγωγούς του μαστού, που περνάει το τοίχωμα του αγωγού και εξαπλώνεται μέσα στο λιπώδη ιστό του. Σε αυτό το επίπεδο μπορεί να δώσει μεταστάσεις σε άλλα σημεία του σώματος, μέσω του κυκλοφορικού και του λεμφικού συστήματος. Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα ξεκινάει από τους γαλακτοφόρους αδένες και αντίστοιχα με το διηθητικό πορογενές, μπορεί να δώσει μεταστάσεις. Περίπου 5-15% των καρκίνων του μαστού είναι διηθητικά λοβιακά καρκινώματα και εμφανίζουν μεγαλύτερη δυσκολία εντοπισμού μέσω εξέτασης, μαστογραφίας αλλά και

γενικότερης παθολογικής αξιολόγησης [276]. Ο καρκίνος εδώ και πολύ καιρό χαρακτηρίζεται ως γενετική ασθένεια. Καθώς όμως μαθαίνουμε περισσότερα πράγματα για τη μοριακή βιολογία του καρκίνου του μαστού, γίνεται κατανοητό ότι δεν μιλάμε για μία ασθένεια, αλλά για ένα σύνολο ασθενειών με διαφορετική πρόγνωση, ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο [277, 278]. Συγκεκριμένα η έκφραση ορμονικών υποδοχέων (οιστρογόνων και προγεστερόνης) καθώς και η έκφραση του HER2/neu επηρεάζουν καθοριστικά τόσο την πρόγνωση, όσο και τη θεραπεία, ανεξαρτήτως από το στάδιο TNM, που βασίζεται στο μέγεθος και το βάθος του όγκου (T), στην εξάπλωση σε λεμφαδένες (N) και την ύπαρξη ή όχι μετάστασης (M) [279]. Το Ki-67 χρησιμοποιείται επίσης ως προγνωστικός δείκτης στην κλινική πρακτική [280], καθώς είναι ενδεικτικός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης (>15%) να συνδέονται με χειρότερο κλινικό αποτέλεσμα.

Χάρη στην ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και τη χρήση μικροσυστοιχειών, μπορούμε να χωρίσουμε τον καρκίνο του μαστού σε 4 καθοριστικές ομάδες ανάλογα με το μοριακό προφίλ [277, 278, 281-283]. Η έκφραση οιστρογονικών (Estrogen Receptors, ERs) και/ή προγεστερονικών υποδοχέων (Progesteron Receptors, PRs) και του HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2- HER2) είναι αυτά που καθορίζουν σε ποιά ομάδα κατηγοριοποιείται ο κάθε καρκίνος. Τα μοριακά προφίλ είναι: 1) Luminal A-Αυλικού τύπου A (ER+, HER2-), 2) Luminal B-Αυλικού τύπου B (ER+, HER2+/ HER2-), 3) HER2-ενισχυμένο και 4) Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (ER-, PgR-, HER2-). Οι Luminal A όγκοι χαρακτηρίζονται από καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους άλλους μοριακούς τύπους. Οι Luminal B χαρακτηρίζονται από υψηλό κυτταρικό πολλαπλασιασμό (υψηλό ποσοστό Ki-67), μπορούν να είναι θετικοί για HER2 και έχουν γενικότερα χειρότερη πρόγνωση από του Luminal A. Τα επίπεδα του HER2 βέβαια στους Luminal B όγκους, είναι χαμηλότερα από τα επίπεδα που βλέπουμε στους HER2-ενισχυμένους. Οι HER2-ενισχυμένοι όγκοι συνδέονται με μεταστάσεις στους λεμφαδένες [284]. Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από χειρότερη πρόγνωση.



Εικόνα 1-24: Υπότυποι καρκίνου μαστού (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/>).

1.2.2.2 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

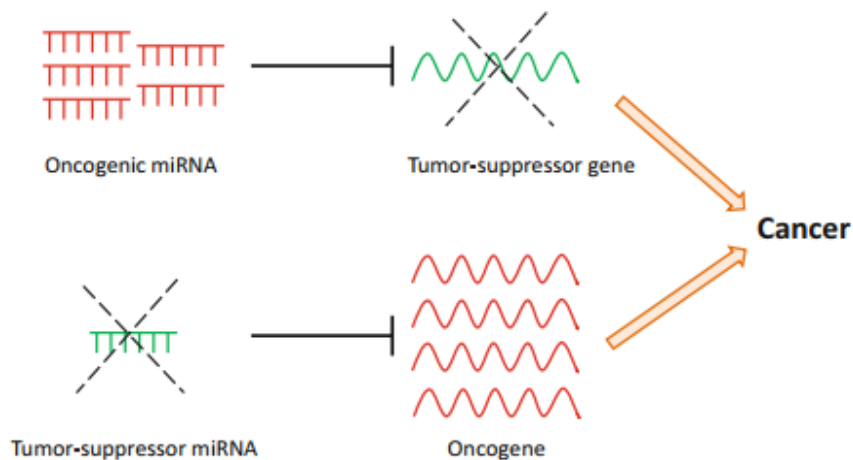
Οι βιοδείκτες είναι στοιχεία (μόρια ή/και κύτταρα) που μπορούν να εντοπισθούν σε διαφορετικά βιολογικά υλικά (ιστό, κύτταρα, βιολογικά υγρά) και αποτελούν μετρήσιμους δείκτες φυσιολογικών, παθολογικών βιολογικών διεργασιών, ή απόκρισης σε θεραπεία [285]). Οι καρκινικοί βιοδείκτες χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με τη χρήση τους: 1) βιοδείκτες, ενδεικτικοί της πιθανότητας εμφάνισης μιας ασθένειας, 2) διαγνωστικοί βιοδείκτες και 3) προγνωστικοί, προβλεπτικοί βιοδείκτες. Ειδικοί του τομέα υγείας βρίσκονται πλέον σε μια συνεχή διαδικασία ανάδειξης και ανεύρεσης αξιόπιστων βιοδεικτών που θα παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την σωστή διάγνωση, επιλογή θεραπείας ή ακόμα και την πιθανότητα κινδύνου ενός ασθενούς να νοσήσει. Η εύρεση βιοδεικτών υψηλής ειδικότητας και αξιοπιστίας θα μπορούσε μέσω του έγκαιρου εντοπισμού της ασθένειας, να μειώσουν σημαντικά τα ποσοστά θνησιμότητας σε ασθενείς με καρκίνο.

Με την καθιέρωση της σταδιοποίησης TNM το 1985 [286], οι γιατροί απέκτησαν ένα σημαντικό εργαλείο ομαδοποίησης των ασθενών για την πιο σωστή πρόγνωση του κλινικού αποτελέσματος και την επιλογή της θεραπείας, δημιουργώντας ταυτόχρονα ένα κοινό σύστημα αναφοράς. Στο βασικό αυτό σύστημα ορισμένες φορές προστίθεται ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων, ο ιστολογικός υπότυπος και η ηλικία του ασθενούς, δεδομένης της χρησιμότητας τους στην πρόβλεψη. Σήμερα, ολοένα και περισσότεροι βιοδείκτες προστίθενται στη διάθεση κλινικών γιατρών σε όλο τον κόσμο. Εκτός από τις γενετικές αλλαγές, πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του καρκίνου παίζουν και μετα-μεταγραφικές, μετα-μεταφραστικές και μεταβολικές αλλαγές [287, 288]. Με την καλύτερη κατανόηση των αρκετά πολύπλοκων μηχανισμών του καρκίνου, καινούριοι βιοδείκτες κάνουν την εμφάνιση τους. Παρόλα αυτά, αν και η χρησιμότητα τους φαίνεται να προμηνύει ένα ελπιδοφόρο μέλλον, ακόμα, δεν είναι δυνατόν να αντικατασταθούν οι κλασικοί βιοδείκτες, όπως η TNM σταδιοποίηση και η ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση.

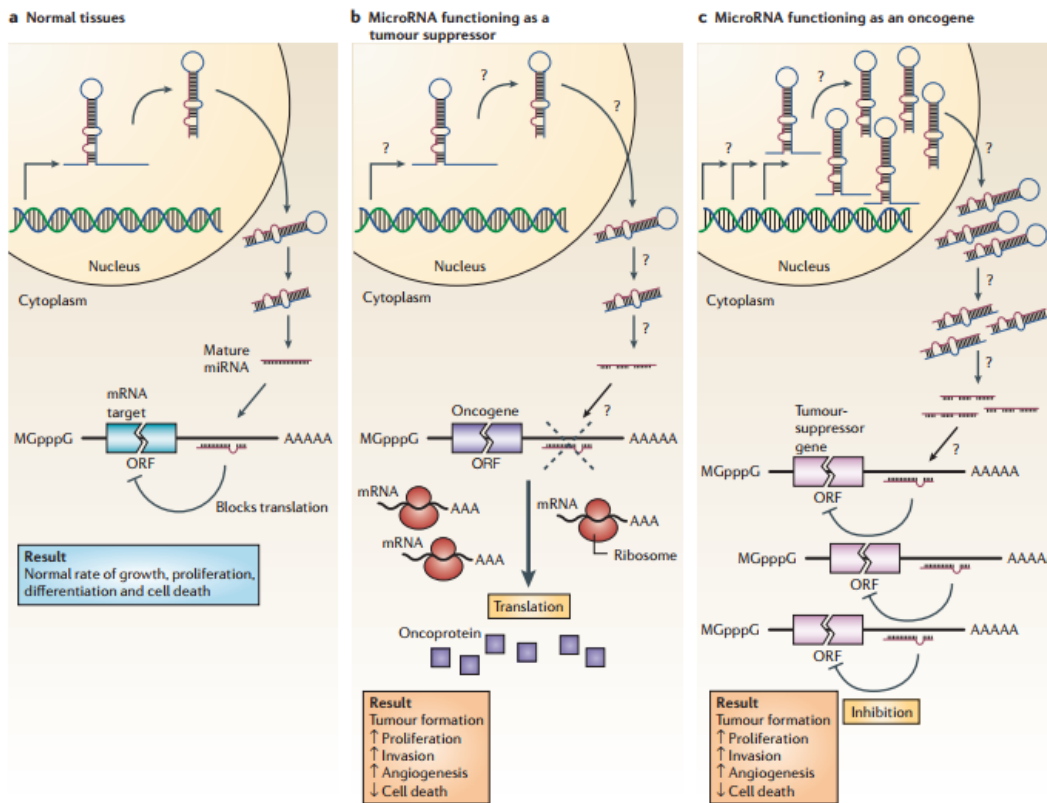
1.2.2.3 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η πρώτη ανακάλυψη της εμπλοκής των miRNAs στον καρκίνο παρατηρήθηκε στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία Β κυττάρων (CLL) με την εύρεση καταστολέων στο χρωμόσωμα 13q14, το οποίο συνήθως διαγράφεται σε ασθενείς με CLL [289]. Σε αυτή τη μελέτη, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το miR-15a και το miR-16-1 βρίσκονται στην περιοχή αυτή. Δεδομένου ότι η απώλεια αυτού του χρωμοσώματος ήταν συχνή στην CLL, και συνεπώς η απώλεια και αυτών των miRNA, τέθηκε το ερώτημα αν τα miRNAs εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου. Αργότερα, η ίδια ομάδα αναγνώρισε διάφορα miRNAs που βρίσκονται σε συχνά διαγραμμένες ή ενισχυμένες περιοχές του γονιδιώματος σε διάφορους όγκους [290]. Η πρώτη miRNA-υπογραφή στον καρκίνο του μαστού που επιχείρησε να διακρίνει τους όγκους από τους φυσιολογικούς ιστούς περιγράφηκε το 2005 [48]. Οι μεταγενέστερες μελέτες έχουν αποσαφηνίσει τη συμμετοχή πληθώρας miRNAs στον καρκίνο του μαστού και εντοπίστηκαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης miRNA που σχετίζεται με την επιβίωση, τη μετάσταση, το στάδιο,

τον πολλαπλασιασμό, τον μοριακό υποτύπο, μεταλλάξεις στο TP53, ορμονικούς υποδοχείς και την ανταπόκριση στη θεραπεία [291-293]. Οι μελέτες αποκάλυψαν ότι οι μεταβολές στα προφίλ έκφρασης miRNA μπορούν να χρησιμεύσουν ως φαινοτυπικές υπογραφές συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Παρεκκλίνουσα έκφραση miRNAs που σχετίζονται με την ογκογένεση μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων μηχανισμών. Αρκετές μελέτες υπογραμμίζουν τη μεταγραφική απορρύθμιση, τον αριθμό αντιγράφων, τις μεταλλάξεις, τις επιγενετικές αλλαγές και ελαττώματα στους μηχανισμούς βιογένεσης των miRNAs ως συνιστώσες της απορρύθμισης των miRNAs στον καρκίνο [54]. Ορισμένα miRNAs συνδέονται άμεσα με την ογκογένεση, με τροποποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ογκογονιδίων. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση των miRNAs μπορεί να αναστέλλει ογκοκατασταλτικά γονίδια σε ένα μονοπάτι σηματοδότησης. Αντίστροφα, μειωμένη έκφραση miRNA μέσω μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας θα μπορούσε να προκαλέσει αύξηση στην έκφραση ογκογονιδίων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου [294, 295] (Εικόνα 1-25).



Εικόνα 1-25: Τα miRNAs μπορεί να έχουν ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική δράση στον καρκίνο. Αυξημένη έκφραση των ογκογόνων miRNAs οδηγεί σε αυξημένη καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων -στόχων. Αντίθετα, η μειωμένη έκφραση του ογκοκατασταλτικών miRNAs έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένη καταστολή και έτσι αυξημένη έκφραση ογκογονιδίων στόχων. Και τα δυο αυτά σενάρια μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου (Tahiri et al., 2018).



Εικόνα 1-26: Τα MicroRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως όγκο-κατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια. α) Σε φυσιολογικούς ιστούς, το κατάλληλο miRNA, η επεξεργασία και η δέσμευση σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στο mRNA-στόχου έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου μέσω αναστολής της πρωτεϊνικής μετάφρασης ή της μεταβολής στη σταθερότητα του mRNA. Το αποτέλεσμα είναι κανονικοί ρυθμοί κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου. β) Η μείωση ή διαγραφή ενός miRNA που έχει ογκοκατασταλτική δράση οδηγεί σε σχηματισμό όγκου. Μείωση ή εξάλειψη των ώριμων επιπέδων miRNA μπορεί να οφείλεται σε βλάβες σε οποιοδήποτε στάδιο της βιογένεσης miRNA (που υποδεικνύεται από ερωτηματικά) και τελικά οδηγεί στη μεταβολή της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης στόχου miRNA (μωβ τετράγωνα). Το συνολικό αποτέλεσμα μπορεί να συνεπάγεται αύξηση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού, διεισδυτικότητα ή αγγειογένεση, μειωμένα επίπεδα απόπτωσης ή μη διαφοροποιημένο ή απο-διαφοροποιημένο ιστό, οδηγώντας τελικά σε σχηματισμό όγκου. γ) Η ενίσχυση ή υπερέκφραση ενός miRNA που έχει έναν ογκογόνο ρόλο θα είχε επίσης ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό όγκου. Σε αυτή την περίπτωση, αυξημένες ποσότητες miRNA, που θα μπορούσαν να παραχθούν σε ακατάλληλη χρονική στιγμή ή σε λανθασμένους ιστούς, θα εξάλειψαν την έκφραση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου στόχου miRNA (ροζ) και θα οδηγούσαν σε πρόοδο του καρκίνου. Αυξημένα επίπεδα ώριμου miRNA μπορεί να οφείλονται σε ενίσχυση του γονιδίου του miRNA, σε έναν ενεργοποιημένο εκκινητή, αυξημένη αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία miRNA ή αυξημένη σταθερότητα του miRNA (υποδεικνύεται με ερωτηματικά). ORF, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Esquele-Kerscher and Slack, 2006).

Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες [296-299]. Απορρυθμισμένη έκφραση των προφίλ των miRNAs έχει ανακαλυφθεί σε μια μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του γλοιώματος, του λεμφώματος και του καρκίνου του προστάτη [300-302].

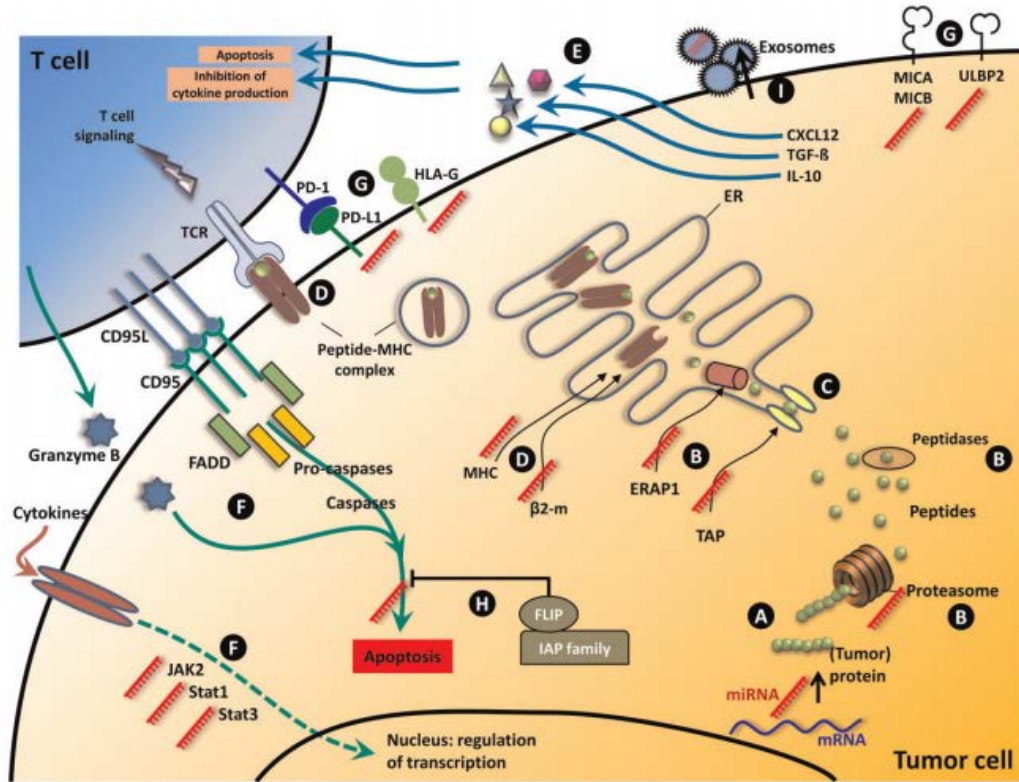
Η πρόγνωση και η επιβίωση ενός ασθενούς εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο του όγκου τη στιγμή της ανίχνευσης. Όσο νωρίτερα ανιχνευθεί ένας όγκος, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση. Έτσι, μια σημαντική κλινική πρόκληση στον καρκίνο είναι η ταυτοποίηση των βιοδεικτών που μπορούν να ανιχνεύσουν τον καρκίνο σε πρώιμο στάδιο. Τα miRNAs μπορούν να απομονωθούν και να ανιχνευθούν από ιστούς που έχουν διατηρηθεί σε βαθειά κατάψυξη, αλλά και από μονημοποιημένους ιστούς, σκηνωμένους σε παραφίνη. Αυτά επιπλέον, κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα ή μέσω εξωσωμάτων και σε διάφορα σωματικά υγρά όπως ούρα, σάλιο, και πτύελα [299, 303].

Το γεγονός ότι τα miRNAs είναι σταθερά στα σωματικά υγρά, και ότι είναι εύκολα ανιχνεύσιμα μέσω μη επεμβατικών διαδικασιών, κάνει τα miRNAs ελκυστικούς υποψήφιους βιοδείκτες. Για παράδειγμα, οι miRNA υπογραφές στο πλάσμα είχαν ισχυρή διαγνωστική και προγνωστική αξία στον καρκίνο του πνεύμονα 1-2 χρόνια πριν από την έναρξη της νόσου [304]. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη από τους Cava et al. [305] έδειξε ότι ο χαρακτηρισμός miRNA βελτίωσε την ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού και μπορούσε να διαχωρίσει τους ασθενείς σε αυτούς που ήταν πιο πιθανό να ανταποκριθούν στην θεραπεία και σε αυτούς που μάλλον δεν θα ανταποκρίνονταν, με ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Η σωστή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού αποτελεί βασικό παράγοντα για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και είναι πλέον προφανές ότι τα miRNA έχουν τη δυνατότητα διάγνωσης, πρόγνωσης και πρόβλεψης.

Οι μηχανισμοί διαφυγής των όγκων περιλαμβάνουν μεταβολές 1) στη δημιουργία, επεξεργασία και παρουσίαση των T-κυττάρων που προέρχονται από αντιγόνα που σχετίζονται με HLA τάξης I ή/και τάξης II, 2) σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, 3) στην έκφραση συν-διεγερτικών και συν-κατασταλτικών μορίων, 4) στην έκφραση μορίων που

σχετίζονται με την απόπτωση και 5) την έκκριση ανοσοκατασταλτικών μεσολαβητών καθώς και πολύ εξειδικευμένων κυστιδίων, των εξωσωμάτων, τα οποία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στο τοπικό μικροπεριβάλλον και τη διακυτταρική επικοινωνία [306, 307]. Η συχνότητα αυτών των μηχανισμών διαφυγής ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου και συσχετίζονται συχνά με χειρότερη πρόγνωση και βραχύτερη επιβίωση των ασθενών. Η συχνότητα και η λειτουργικότητα των κυττάρων τελεστών και των επαγγελματιών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC), όπως τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα Β κύτταρα και τα μακροφάγα συχνά μειώνονται στο περιφερικό αίμα ασθενών, ενώ ο αριθμός των κατασταλτικών κυττάρων όπως τα MDSCs, των NK κύτταρα, τα Tregs και τα ογκοσχετιζόμενων μακροφάγων (TAM) αυξάνονται [308, 309]. Το μικροπεριβάλλον του όγκου απαρτίζεται από Τ και Β λεμφοκύτταρα, TAMs, Tregs, MDSC, DCs, στρωματικά κύτταρα, όπως ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs) και ενδοθηλιακά κύτταρα, μαζί με διάφορους διαλυτούς παράγοντες, δημιουργώντας ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον. Η εξωκυττάρια μήτρα του μικροπεριβάλλοντος περιέχει ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες, για παράδειγμα ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και τον παράγοντα ανάπτυξης μετασχηματισμού (TGF-β), προαγγειογόνους παράγοντες, χημειοκίνες, πρωτεάσες, μεταβολίτες, αργινάση και προσταγλανδίνες, δημιουργώντας ένα περιβάλλον που δρα αρνητικά στις ανοσοαποκρίσεις έναντι του όγκου [310-312]. Φλεγμονή που οφείλεται στον καρκίνο (cancer driven inflammation) μεσολαβείται κυρίως από TAMs τύπου M2 που προάγουν την αγγειογένεση, την ανάπτυξη, τη μετάσταση και την ανοσοκαταστολή [313]. Επιπλέον, τα MDSCs μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη του όγκου με ενίσχυση της αγγειογένεσης ή μέσω καταστολής του έμφυτου και του προσαρμοστικού σκέλους του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της μείωσης της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων, μείωσης της δραστηριότητας των ώριμων DCs και καταστολή των αποκρίσεων των Τ-κυττάρων, επάγοντας την απόπτωση, εκκρίνοντας ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες, τροποποιώντας τον μεταβολισμό αμινοξέων, περιορίζοντας τη διήθηση Τ-κυττάρων και αυξάνοντας τα Tregs [314, 315]. Τα CD4+ CD25+ FoxP3+ Tregs καταστέλλουν τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, διατηρώντας έτσι την ανοσολογική ανοχή στα αυτοαντιγόνα, ενώ μεταναστεύουν αποτελεσματικά στους

όγκους [316]. Διαλυτοί παράγοντες, όπως μεταβολίτες, αλλά και η υποξία και το χαμηλό pH, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση της αντινεοπλασματικής δράσης μέσω εξασθένησης της λειτουργίας των ανοσοκυττάρων.



Εικόνα 1-27: Μηχανισμοί ανοσολογικής διαφυγής όγκων. Η εικόνα παρουσιάζει μηχανισμούς που βασίζονται σε (A) απώλεια της αντιγονικής έκφρασης του όγκου. (B) αλλοίωση της παραγωγής και επεξεργασίας των επιτόπων. (C) εισαγωγή πεπτιδίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. (D) μειωμένη έκφραση της βαριάς αλυσίδας μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και β2-μικροσφαιρίνης, (E) απελευθέρωση αντι-φλεγμονοδών κυτταροκινών. (F) μειωμένη έκφραση, εξάλειψη ή τροποποιημένη φωσφορυλίωση μορίων σηματοδοτικών μονοπατιών, (G) μη φυσιολογική έκφραση ανοσοανασταλτικών μορίων (π.χ. προσδέτης PD, MHC-I), (H) προστασία από απόπτωση που προκαλείται από T-κύτταρα και (I) έκκριση ανοσοκατασταλτικών μεσολαβητών και εξωσωμάτων. Η συμμετοχή των miRNAs σε διαφορετικά σημεία των παραπάνω μονοπατιών καταδεικνύουν την σημαντικότητά τους (Eichmuller et al., 2017).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά ρυθμιστικά RNA με μήκος περίπου 20 νουκλεοτιδίων, τα οποία κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα. Έχουν αναδειχθεί ως βασικοί παράγοντες στο μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μέσω δέσμευσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) των mRNA μορίων στόχων, επηρεάζοντας έτσι τη σταθερότητα ή/και τη μετάφραση του mRNA. Με βάση τις αναλύσεις βιοπληροφορικής του προγνωστικού προφίλ δέσμευσης τους, τα miRNAs εμπλέκονται άμεσα στην έκφραση τουλάχιστον στο 50% όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στα θηλαστικά [317, 318]. Ένα μόνο miRNA θα μπορούσε να στοχεύσει πολυάριθμα mRNAs, ενώ ένα mRNA μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορα miRNAs [319]. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες εστίασαν στη σύγκριση των προτύπων έκφρασης miRNAs μεταξύ των όγκων και των αντίστοιχων υγιεινών ιστών, επιδεικνύοντας μεταβολές στα προφίλ έκφρασης miRNAs σε διάφορες κακοήθειες. Είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια miRNA εντοπίστηκαν συχνά σε εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος και κοντά σε χρωμοσωμικές περιοχές που σχετίζονται με τον καρκίνο [320]. Κάνοντας μία σύνοψη όσων διεξοδικά αναπτύχθηκαν παραπάνω, μεταβολή κατά την βιογένεση στα επίπεδα των miRNAs επιδρά στην έναρξη και εξέλιξη των όγκων, στο σχηματισμό μεταστάσεων και στην αντίσταση σε θεραπευτική αγωγή, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ογκογόνων και ογκο-κατασταλτικών miRNAs [321-324]. Τα miRNAs συνδέουν τη φλεγμονή με τον καρκίνο [325] και εμφανίζονται ως κρίσιμοι διαμορφωτές της ανοσοποιητικής ομοιόστασης και της ανοσίας των T-κυττάρων ελέγχοντας την ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και τη λειτουργία αυτών [326], καθώς και την παρουσίαση μέσω των DCs [327]. Τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των miRNAs έχουν επίσης μελετηθεί και μεμονωμένα σε ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, για παράδειγμα σε T-κύτταρα, NK κύτταρα, TAMs, CAFs και MDSCs, τα οποία ρυθμίζουν το προκαρκινικό δυναμικό και συμμετέχουν στον επαναπρογραμματισμό των κυτταρικών συστατικών του μικροπεριβάλλοντος [328].

1.2.2.6 miRNAs ΠΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Όπως αναφέρθηκε, τα miRNAs δεν έχουν μόνο ογκογόνο ή ογκο-κατασταλτική λειτουργία, αλλά μπορεί επίσης να επηρεάσουν την ανοσογονικότητα των όγκων ή/και τις ανοσοαποκρίσεις εναντίον των όγκων [329] και επομένως ονομάστηκαν ανοσοδιαμορφωτικά miRNAs (im-miRNAs). Ενώ τα ογκο-κατασταλτικά im-miRNAs βελτιώνουν την ανοσογονικότητα και ενισχύουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, προωθώντας με τον τρόπο αυτό την ανοσοεπιτήρηση, τα ογκογονικά im-miRNAs έχουν ανοσοκατασταλτικό ρόλο και εμπλέκονται στην ανοσολογική διαφυγή [330]. Τα im-miRNAs που επηρεάζουν την ανοσολογική διαφυγή του όγκου και την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων παρατίθενται στον Πίνακα 1-3 [331].

Target miRNA	miRNA	Host cells	Reference
b2-microglobulin	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
TAP-1	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
	miR-346	HAEC	Bartoszewski et al. [333]
PSMB8	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
	miR-451	LC	Yin et al. 2015 [334]
PSMB10	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
HLA-A	miR-181a	HBV-infected cells	Liu et al. 2009 [335]
HLA-B	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
HLA-C	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
	miR-148a	PBLs	Kulkarni et al. 2013 [336]
HLA-F	miR-9	NPC	Gao et al. 2013 [332]
HLA-G	miR-152	NSCLC	Cheng et al. 2014 [337]
	miR-133	RCC	Jasinski-Bergner et al. 2015 [338]
	miR-148a	RCC	Jasinski-Bergner et al. 2015 [338]
	miR-548	RCC	Jasinski-Bergner et al. 2016 [339]
	miR-628-5p	RCC	Jasinski-Bergner et al. 2016 [339]
HLA-H	miR-9	Nasopharyngeal cancer	Gao et al. 2013 [332]
HLA class I	miR-US4-1†	HCMV-infected HFF cells	Kim et al. 2011 [340]
ERAP1	miR-US4-1†	HCMV-infected HFF cells	Kim et al. 2011 [340]
MICA	miR-25	HCC	Kishikawa et al. 2013 [341]
	miR-93	HCC	Kishikawa et al. 2013 [341]
	miR-106b	HCC	Kishikawa et al. 2013 [341]
MICB	miR-376	Melanoma	Paschen et al. 2014 [342]
	miR-433	Melanoma	Paschen et al. 2014 [342]
	miR-10b	Various	Paschen et al. 2014 [342]
MICA/MICB	miR-20a	BCSC, OC	Wang et al. 2014; Xie et al. 2014 [343, 344]
ULBP2	miR-34a/c	Melanoma	Paschen et al. 2014 [342]
	miR-140-5p	Hela, Jurkat	Himmelreich et al. 2011 [345]
	miR-302c	Kasumi-1	Min et al. 2013 [346]
	miR-409-3p	Hela, Jurkat	Himmelreich et al. 2011 [345]
	miR-433-p	Hela, Jurkat	Himmelreich et al. 2011 [345]
	miR-520c	Kasumi-1	Min et al. 2013 [346]
B7/CD28	miR-21-3p	CRC	Wu et al. 2015 [347]
	miR-186-5p	CRC	Wu et al. 2015 [347]
	miR-323b-5p	CRC	Wu et al. 2015 [347]
	miR-1207-5p	CRC	Wu et al. 2015 [347]
	miR-1279	CRC	Wu et al. 2015 [347]
	miR-2117	CRC	Wu et al. 2015 [347]
	miR-3692-3p	CRC	Wu et al. 2015 [347]
PD-L1	miR-513	Cholangiocytes	Gong et al. 2009 [348]
	miR-570	Gastric cancer	Wang et al. 2013 [349]
	miR-34a	AML	Wang et al. 2015 [350]
	miR-200	NSCLC	Chen et al. 2014 [351]
	miR-138-5p	CRC	Zhao et al. 2016 [352]
	miR-424	Ovarian cancer	Xu et al. 2016 [353]
B7-H2	miR-24	Gastric cancer	Yang et al. 2013 [354]
B7-H3	miR-29a	Neuroblastoma	Cheung et al. 2014 [355]
	miR-29c	BC	Nygren et al. 2014 [356]
	miR-187	RCC	Zhao et al. 2013 [357]
SOCS3, IRF2	miR-221	Prostate cancer	Kneitz et al. 2014 [358]
IFNc	miR-155	NK cells	Trotta et al. 2012 [359]
IFNcR	miR-155	T cells	Benerjee et al. 2010 [360]
JAK2	miR-375	Gastric cancer	Ding et al. 2010 [361]
	miR-135a	Gastric cancer	Wu et al. 2012 [362]
	miR-216a	Pancreatic cancer	Wang et al. 2014 [363]
	miR-101	Breast cancer	Wang et al. 2014 [364]
STAT1	miR-145	CRC	Gregersen et al. 2010 [365]
	miR-150	Transformed T cells	Moles et al. 2015 [366]
	miR-223	Transformed T cells	Moles et al. 2015 [366]
STAT3	miR-124-3p	NPC	Xu et al. 2016 [367]
IRF-1	miR-29b	Colorectal cancer	Yuan et al. 2015 [368]
IRF-4	miR-125b	Macrophages	Chaudhuri et al. 2011 [369]
PTEN	miR-494	MDSC	Liu et al. 2012 [370]
CYLD	miR-181-1b	Breast cancer	Iliopoulos et al. 2010 [371]
	miR-362-5p	NK cells	Ni et al. 2015 [372]

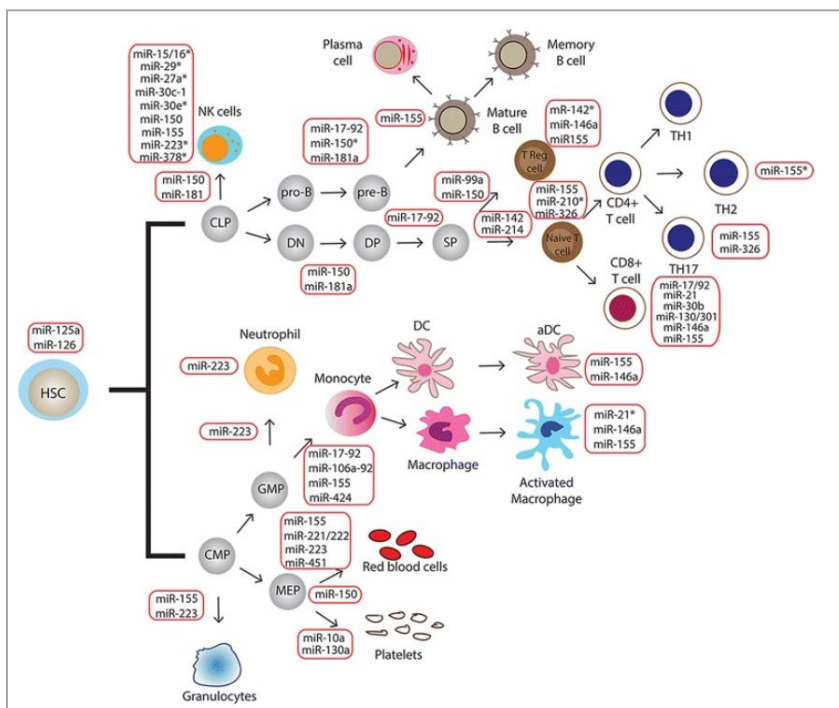
Πίνακας 1-3: Τα im-miRNAs που επηρεάζουν την ανοσολογική διαφυγή του όγκου και την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων (Eichmuller et al., 2017).

Πρόσφατα, τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως κρίσιμοι ρυθμιστές σχεδόν όλων των τύπων ανοσοκυττάρων [263, 373, 374], και ορισμένα miRNAs, για παράδειγμα, τα miR-24, miR-30b και miR-142-3p, έχει αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο τόσο στο έμφυτο όσο και στο προσαρμοστικό σκέλος της ανοσίας [375]. Ενώ μερικά miRNAs εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα σε λευκοκυτταρικούς υποτύπους, όπως τα Β κύτταρα [376], τα Τ-κύτταρα [377], τα μακροφάγα [373], τα DCs [376] και σε πληθυσμούς προγονικών/αρχέγονων κυττάρων παίζοντας ρόλο στην επαγωγή μίας αποτελεσματικής ανοσοαπόκρισης, άλλα miRNAs που εκφράζονται από TAMs, MDSCs, κύτταρα NK και Τ-κύτταρα ρυθμίζουν το προκαρκινικό (protumorigenic) δυναμικό των κυττάρων αυτών. Αλλαγές στα μοτίβα έκφρασης των miRNA εντός των κυττάρων του όγκου ή και στρωματικών κυττάρων μπορούν να διαμορφώσουν το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον και να επηρεάσουν την στρατολόγηση ανοσοκυττάρων, περιορίζοντας έτσι τις αντικαρκινικές αποκρίσεις [328, 378, 379].

1.2.2.6.1 T-ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα miRNAs έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη λειτουργία τόσο των λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στην κυκλοφορία όσο και εκείνων που διηθούν τον όγκο. Το προφίλ έκφρασης των miRNAs στα Τ-κύτταρα μπορεί να διαμορφώνεται από τα καρκινικά κύτταρα, αντισταθμίζοντας έτσι τις αποκρίσεις Τ-κυττάρων που κατευθύνονται ενάντια στον όγκο. Κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής διαφυγής των όγκων, τα καρκινικά κύτταρα μεταβάλλουν την έκφραση των miRNAs για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μείωση της έκφρασης του miR-124-3p αυξάνει την διήθηση από Tregs και μειώνει την παραγωγή κυτταροκινών μέσω του STAT3, το οποίο αποτελεί στόχο του miR-124-3p [367]. Αντιθέτως, το miR-214 που προέρχεται από τον όγκο, και μεταφέρεται μέσω μικροαγγείων σε CD4+ Τ-κύτταρα, έχει δειχθεί ότι στοχεύει το PTEN και οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των Tregs [380]. Τα Tregs στρατολογούνται επίσης στο μικροπεριβάλλον HBV+ ηπατοκυτταρικού καρκινώματος μέσω του CCL2 που εκκρίνεται από τα CD4+ Τ-κύτταρα σε απόκριση της καταστολής μέσω miR-34 με τη μεσολάβηση του TGF-β. Βρέθηκε ότι οι όγκοι με έκτοπη έκφραση

miR-34 περιείχαν λιγότερα διηθούντα Tregs και εμφάνισαν μειωμένες μεταστάσεις [381]. Στο ανθρώπινο μελάνωμα, η αύξηση του miR-30b/-30d συσχετίζεται με το στάδιο του όγκου, το μεταστατικό δυναμικό, τον βραχύτερο χρόνο έως την υποτροπή και τη μειωμένη συνολική επιβίωση. Η αυξημένη έκφραση του miR-30d σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια πυροδότησε τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες με τις μεταστάσεις στους πνεύμονες να χαρακτηρίζονται από αυξημένη διήθηση από Tregs [382]. Έτσι, τα Tregs παρουσιάζουν ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης miRNA, το οποίο αντανακλά τις ανοσοκατασταλτικές τους δράσεις. Μέχρι στιγμής, λίγα είναι γνωστά για την έκφραση και ρύθμιση των miRNAs σε CTLs. Έχει αποδειχθεί ότι η επαγόμενη από TGF-β καταστολή της δράσης προκαλείται από μια αυξημένη έκφραση του miR-23a [383], επηρεάζοντας έτσι την έκφραση των BLIMP-1 και Bcl-xL, αντίστοιχα. Παρομοίως, η αυξημένη έκφραση του miR-491 που επάγεται από την TGF-β καταστέλλει τη δράση των CTL μέσω στόχευσης των CDK4 και TCF1 [384]. Έχει αποδειχθεί περαιτέρω ότι η αναστολή του miR-23 στα CTL αντιστρέφει την ανοσοκαταστολή, περιορίζοντας έτσι την επιθετικότητα του όγκου [383].



Εικόνα 1-28: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης στην ανάπτυξη και δραστηριότητα ανοσοκυττάρων από miRNAs. Τα miRNA έχουν αποδειχθεί ότι λειτουργούν ως σημαντικοί ρυθμιστές τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης και των λειτουργιών διαφορετικών ανοσοκυττάρων (Paladini et al., 2016).

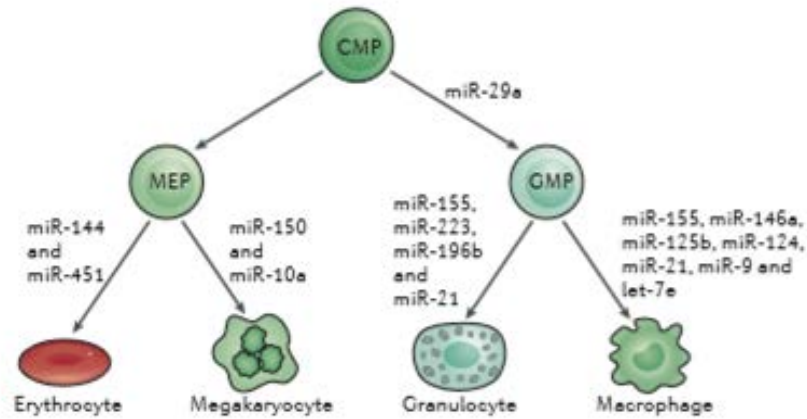
1.2.2.6.2 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΟΓΚΟ

Όπως προαναφέραμε, τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (TAM) χαρακτηρίζονται από μια λειτουργική πλαστικότητα, επιτρέποντάς τους να αποκτήσουν ανοσοδιεγερτική (M1) ή ανοσοκατασταλτική (M2) δράση, καθώς και ένα εύρος λειτουργικών φαινοτύπων των δύο αυτών καταστάσεων [385]. Τα TAMs που βρίσκονται στους όγκους παρουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό τον φαινότυπο M2 και γενικά έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση [386], με λίγες εξαιρέσεις στην βιβλιογραφία που φαίνεται να έχουν καλή πρόγνωση [134]. Είναι ενδιαφέρον ότι έχει βρεθεί ότι τα miRNAs εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένων των TAM [387].

Το miR-511-3p ήταν το πρώτο miRNA που βρέθηκε να εκφράζεται επιλεκτικά σε TAMs τύπου M2. Η υπερέκφραση αυτού του miRNA έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη έκφραση των σχετιζόμενων με το M2 γονιδιακών προϊόντων και μειώνει την ανάπτυξη όγκου σε ποντικούς. Το miR-511-3p στοχεύει την ROCK2, εμποδίζοντας έτσι τη φωσφορυλίωση μέσω ROCK2 του μεταγραφικού παράγοντα IRF4 που επάγει τον M2 φαινότυπο. Έτσι, το miR-511-3p μπορεί να δράσει ως ένας ευαίσθητος ρυθμιστής της έκφρασης που προάγει τα M2 μακροφάγα [388].

Τα miR-146 και miR-222 βρέθηκαν να είναι τα πιο μειωμένα miRNAs σε TAM που απομονώθηκαν από μοντέλο 4T1 καρκίνου του μαστού ποντικού, ενώ η μειωμένη έκφραση τους επιβεβαιώθηκε σε ανθρώπινα δείγματα καρκίνου του μαστού, παχέος εντέρου και γαστρικό καρκίνο [389]. Παρά την κοινή χαμηλή τους έκφραση στα TAMs, τα miR146a και miR-222 έδειξαν απροσδόκητα τα αντίθετα αποτελέσματα στην έκφραση γονιδίων M1/M2 και τον έλεγχο ανάπτυξης όγκων όταν υπερεκφράζονται σε μακροφάγα. Μακροφάγα που υπερεκφράζουν miR-146a σε 4T1 μοντέλο προήγαγαν την ανάπτυξη όγκων σε συγγενικά BALB/c ποντίκια, ενώ η υπερέκφραση του miR-222 ανέστειλε την μετανάστευση των μακροφάγων και κατέστειλε την ανάπτυξη του όγκου. Έτσι λοιπόν, ο λειτουργικός φαινότυπος των TAMs φαίνεται να εξαρτάται, τουλάχιστον εν μέρει, από τις αντικρουόμενες δράσεις των miR-146a και miR-222 [331].

Η έκφραση του miR-155 έχει συσχετιστεί ευρέως με χειρότερη πρόγνωση και δυσμενές κλινικό αποτέλεσμα σε διάφορες μορφές καρκίνου [390, 391]. Η αποσιώπηση του miR-155 εντός των μυελοειδών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του όγκου, δείχνοντας ότι το miR-155 που εκφράζεται από μακροφάγα τύπου M1 μπορεί να έχει δυναμικό καταστολής όγκων. Έτσι, το miR-155 εμφανίζεται πολυλειτουργικό, ικανό να επάγει ανοσοδιεγερτικά καθώς και ογκογονικά σήματα, ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης του κυτταρικού τύπου. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί ότι το miR-155 θα πρέπει να ονομάζεται "ανοσοποιητικό" και όχι "oncomiR" [392].



Εικόνα 1-29: miRNAs που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και λειτουργία κυττάρων του έμφυτου σκέλους του ανοσοποιητικού συστήματος. Μια σχηματική περιγραφή ορισμένων βασικών miRNAs που εμπλέκονται στις αναπτυξιακές διεργασίες κυττάρων του έμφυτου σκέλους (Mehtaand Baltimore, 2016).

ΣΚΟΠΟΣ

2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί το κατά πόσο ο βαθμός διήθησης και η χωροταξική κατανομή ανοσοκυττάρων που διηθούν τον όγκο σχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την κλινική πορεία ασθενών με διηθητικό, μη μεταστατικό, πορογενή καρκίνο του μαστού. Ένας επιπλέον στόχος της μελέτης είναι η πιθανή συσχέτιση κυκλοφορούντων παραγόντων προεγχειρητικά με την εικόνα διήθησης του όγκου από ανοσοκύτταρα και η προσπάθεια δημιουργίας συνδυαστικής προγνωστικής υπογραφής που θα ενσωματώνει όλα ή μέρος των στοιχείων που θα αποκαλυφθούν από τη μελέτη.

Η μελέτη χωρίζεται σε τρία τμήματα. Το πρώτο τμήμα αφορά στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο του μαστού (BCa), το δεύτερο στο αναδρομικό τμήμα της μελέτης όπου έχουμε διαθέσιμη την κλινική παρακολούθηση των ασθενών και το τρίτο τμήμα αφορά σε ένα προοπτικό τμήμα της μελέτης όπου έχουμε επιπλέον αιμοληψία μια ημέρα πριν το χειρουργείο ασθενών.

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΟΣΩΝ ΑΦΟΡΑ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Ο πρώτος στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος της παρουσίας ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών είτε στο κέντρο του όγκου (Tumor Center, TC) είτε στο διηθητικό μέτωπο (Invasive Margin, IM), ή/και στα δύο και ο ρόλος της χωροταξικής-αρχιτεκτονικής κατανομής των κυττάρων αυτών σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Οι πληροφορίες που θα εξαχθούν από τη διαφορική διήθηση των όγκων από CD8+ λεμφοκύτταρα και CD163+ μακροφάγα θα συσχετίσουν με τα εγκαθιδρυμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά στον καρκίνο του μαστού (BCa), όπως είναι το στάδιο (TNM stage), ο βαθμός διαφοροποίησης (Grade), η παρουσία ορμονικών υποδοχέων (Hormone Receptors), η υπερέκφραση του HER2/neu, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67% και η ηλικία με στόχο τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων.

2.2 ΣΚΟΠΟΣ ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθούν τον όγκο είναι σημαντικά για την εξέλιξη του καρκίνου, ενώ σε διάφορους τύπους καρκίνου έχουν βρεθεί να συμπληρώνουν ή/και να υποκαθιστούν τη σταδιοποίηση κατά TNM. Τα CD8+ και CD163+ κύτταρα έχουν προγνωστικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού, αλλά η χωροταξική τους κατανομή δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς. Στην παρούσα εργασία, θα εξεταστεί η παρουσία και ο συνδυασμός αυτών ως πιθανών προγνωστικών βιοδεικτών στο κέντρο του όγκου (TC) και το διηθητικό μέτωπο (IM). Σκοπός του αναδρομικού τμήματος της μελέτης είναι η πιθανή δημιουργία ευνοϊκών ή μη, προγνωστικών «ανοσολογικών υπογραφών» που θα χαρακτηρίζουν ομάδες ασθενών ως προς την κλινική εξέλιξη (ελεύθερη νόσου και συνολική επιβίωση).

2.3 ΣΚΟΠΟΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Εκτός της διήθησης του όγκου από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς που θα μελετηθεί στις ασθενείς του προοπτικού τμήματος, μια μέρα πριν το χειρουργείο θα πραγματοποιηθεί αιμοληψία στις ίδιες ασθενείς και ακολούθως απομόνωση PBMCs και ορού. Θα μελετηθούν παράγοντες στην κυκλοφορία που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στον καρκίνο αλλά και στο ανοσοποιητικό σύστημα και τις λειτουργίες του. Τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη διερεύνηση της διαφορικής έκφρασης miRNAs μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Επιπλέον, έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι miRNAs ανιχνεύονται σχετικά εύκολα στο περιφερικό αίμα. Και στις δύο περιπτώσεις, το μοτίβο έκφρασης πολλών miRNAs έχει συσχετισθεί με την έκβαση της νόσου. Όλες οι παραπάνω πληροφορίες συνηγορούν στο ότι τα miRNAs αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη τάξη μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση ή/και την πρόγνωση εξέλιξης του καρκίνου. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα διερευνηθεί το μοτίβο έκφρασης κάποιων miRNAs στο περιφερικό αίμα και συγκεκριμένα στον ορό αλλά και σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος [PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells] ασθενών με καρκίνο του μαστού, καθώς και στον καρκινικό ιστό

από FFPEs [Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (tissue)]. Θα μελετηθούν miRNAs που έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στον καρκίνο όσο και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Θα επιχειρηθεί να γίνουν συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασής τους με άλλες εξέχουσες σημασίας παραμέτρους της περιφέρειας (κυτταροκίνες/χημειοκίνες) αλλά και με τη διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Απώτερος στόχος είναι να εξεταστεί αν ο συνδυασμός άμεσα και εύκολα μετρήσιμων παραμέτρων στο περιφερικό αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια «μοριακή-ανοσολογική υπογραφή» που θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει το μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως αυτό σκιαγραφείται από τη διήθησή του από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς αλλά και από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που τον περιγράφουν.

2.4 ΤΕΛΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός είναι να ελεγχθούν τα αποτελέσματα τόσο του αναδρομικού όσο και του προοπτικού σκέλους και πιθανές συσχετίσεις που θα επιτρέψουν τη δημιουργία ανοσολογικών ή/και μοριακών «υπογραφών» που θα συμβάλουν στην πρόγνωση ασθενών με καρκίνο του μαστού (BCa). Οι «υπογραφές» αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν νέα «όπλα» στη φαρέτρα μας και να οδηγήσουν σε έγκαιρη θεραπεία μετά τη διάγνωση και σε αποφυγή του φαινομένου της υπερθεραπείας, καθώς ο «χαρακτηρισμός» των ασθενών θα επιτρέπει την επιλογή της καλύτερης αντιμετώπισης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι μέθοδοι/ τεχνικές που ακολουθήθηκαν, καθώς και τα αναλώσιμα/ όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε πειραματική διαδικασία. Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που είναι απαραίτητος για τη διεξαγωγή όλων σχεδόν των πειραματικών διαδικασιών περιλαμβάνει τα παρακάτω.

3.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

3.1.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Πιπέττες μεταβλητού όγκου Pipetman 2, 20, 200 και 1000 μ L (Gilson Inc, USA)
- Ρύγχη πιπεττών 10, 200 και 1000 μ L (Greiner, Bio-one, Germany)
- Ρύγχη πιπεττών με φίλτρο 10, 200 και 1000 μ L (Greiner, Bio-one, Germany)
- Πλαστικές πιπέττες μίας χρήσης 1, 2, 5, 10 και 25 mL (Greiner, Bio-one, Germany)
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης τύπου falcon 15 και 50 mL (Greiner, Bio-one, Germany)
- Κρυστάλλια φιαλίδια αποθήκευσης των 2mL (Greiner, Bio-one, Germany)
- Αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρος πλάκα τύπου Neubauer (Sigma-Aldrich)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 0,5 & 1,5 mL (SARSTEDT AG & Co, Germany)
- PCR tubes (0,2mL) (Greiner, Bio-one, Germany)
- RT-PCR tubes (0,2mL) flat cap (Greiner, Bio-one, Germany)
- BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tubes
- rSSO-Luminex (LIFECODES_HLA SSO Typing— RAPID, Immucor Transplant Diagnostics, INC, Stamford, CT, USA)
- Qiagen miRNeasy Serum / Plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- Qiagen miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Thermo Fisher Scientific, USA)
- miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

3.1.2 ΟΡΓΑΝΑ

- Θάλαμοι νηματικής ροής (Laminar Flow) (MSC-Advantage™ Class II Biological Safety Cabinet Thermo Scientific, USA)
- Επωαστικοί κλίβανοι 37°C και 5% CO₂ (Thermo Scientific, USA)
- Θερμο κυκλοποιητής, iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, California, U.S.A.)
- Μηχάνημα Real-Time PCR, Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia)
- Υδατόλουτρο (Mettler, Germany)
- Περιστρεφόμενος αναδευτήρας (vortex mixer) VX100 (Labnet International Inc, USA)
- Οπτικά μικροσκόπια (OLYMPUS & Nikon) και ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Euromex, Holland & Wilovert, Germany)
- Ηλεκτροκίνητος επαναφορτιζόμενος ελεγκτής πιπέτας (pipette controller) FastPette (0,5-100 mL) (Labnet International Inc, NJ, USA)
- Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με αποσπώμενες κεφαλές (Beckman Coulter Inc., USA & Thermo Scientific, USA)
- Μικροφυγόκεντρος (Eppendorf, USA)
- Ψυγείο (LIEBHERR, Germany)
- Καταψύκτες -20°C (LIEBHERR, Germany & BOSCH, Germany)
- Καταψύκτης -80°C (Thermo Scientific, USA)
- Παγομηχανή (Fiocchetti, Italy)
- Αυτόκαυστο (Tuttnauer Europe B.V., Netherlands)

3.1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA)
- Ορός νεογνού μόσχου (Fetal bovine serum, FBS) (Biochrom AG, Germany)
- Αντιβιοτικό-αντιμυκητιακό (Antibiotic-Antimycotic) (Life Technologies, USA)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (καλλιεργητικό μέσο RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% Antibiotic/Antimycotic) για την καλλιέργεια των κυττάρων
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate buffer saline, PBS) (Lonza, Belgium)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Applichem, Darmstadt, Germany)
- Διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Germany)

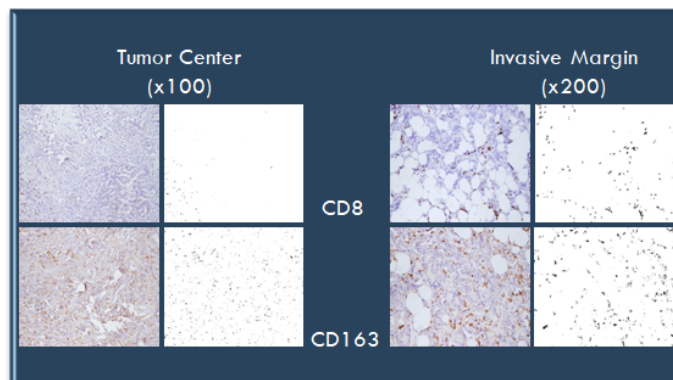
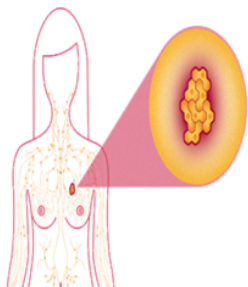
3.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ: ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΟ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη, συμμετείχαν γυναίκες με ιστολογικά επιβεβαιωμένο πορογενή, διηθητικό μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Οι ασθενείς δεν είχαν λάβει νέο-επικουρική θεραπεία. Αποκλείστηκαν από την μελέτη ασθενείς με μεταστατική ή αμφίπλευρη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης. Αποκλείστηκαν επίσης, ασθενείς με ιστορικό οποιουδήποτε άλλου τύπου καρκίνου ή τοπική υποτροπή κατά τη διάρκεια της κλινικής παρακολούθησης (follow-up) καθώς και όσοι ανέπτυξαν δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο. Το περιεχόμενο της διατριβής κατατέθηκε και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας».

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από δύο σκέλη, το προοπτικό και το αναδρομικό. Τα CD8+, CD4+, CD163+ & FoxP3+ κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία στο κέντρο του όγκου (Tumor Center-TC) και στο διηθητικό

μέτωπο (Invasive Margin-IM) στο σύνολο των ασθενών (n=162) τόσο του αναδρομικού όσο και του προοπτικού τμήματος. Για το σύνολο των ασθενών είχαμε διαθέσιμα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους. Όσον αφορά το αναδρομικό τμήμα, είχε πραγματοποιηθεί ο εντοπισμός των περιστατικών που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη, τόσο από άποψη κλινικών κριτηρίων όσο και της ύπαρξης του αρχειακού υλικού. Διερευνήθηκαν περισσότεροι από 2000 φάκελοι, τις προϋποθέσεις πληρούσαν 138, για 112 υπήρχαν διαθέσιμα ιστολογικά παρασκευάσματα (μπλοκ παραφίνης), από τους οποίους τελικά προέκυψαν οι συνολικά 97 ασθενείς που είχαν χειρουργηθεί (μεταξύ 2000-2010) στην κλινική και για τους οποίους διαθέταμε στοιχεία επαρκούς κλινικής παρακολούθησης (διάμεσος 6.9 χρόνια, εύρος: 0,11-10 χρόνια). Ασθενείς του αναδρομικού σκέλους της μελέτης, που εμφανίστηκαν στο νοσοκομείο για να δώσουν αίμα για μία άλλη μελέτη (τα δεδομένα δεν περιλαμβάνονται εδώ), υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης για χρήση των κλινικών τους δεδομένων. Όλες οι υπόλοιπες ασθενείς του αναδρομικού σκέλους (οι οποίοι ενημερώθηκαν τηλεφωνικά ή οι αποθανούσες ασθενείς) εισήχθησαν στην μελέτη ανώνυμα-κωδικοποιημένα από τους θεράποντες ογκολόγους και παθολόγους ιατρούς και οι κλινικές πληροφορίες τους καταγράφηκαν σε βάση δεδομένων από τον υπεύθυνο ιατρό της μελέτης.

Στο προοπτικό τμήμα της μελέτης αυτής συμμετείχαν 50 ασθενείς μετά από έγγραφη συγκατάθεση τους. Στις ασθενείς αυτές, επιπλέον της ποσοτικοποίησης των ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών, πραγματοποιήθηκε μια μέρα πριν το χειρουργείο αιμοληψία και απομονώθηκαν μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος [PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)] και ορός για μελλοντική χρήση. Ο ορός αποθηκεύτηκε στους -80°C και τα PBMCs σε υγρό άζωτο. Στην Εικόνα 3-1 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη.

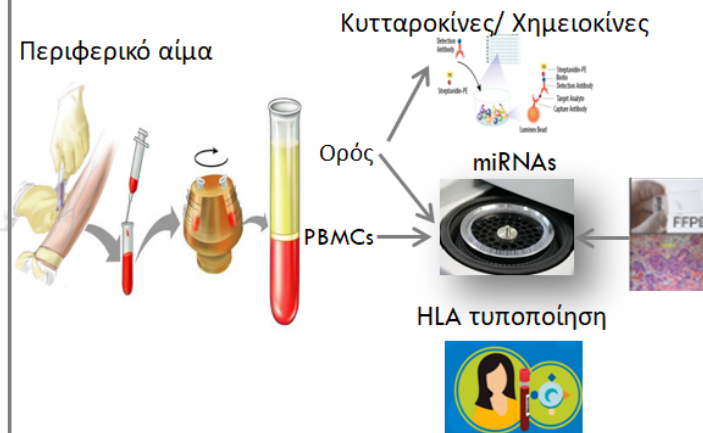


162 ασθενείς

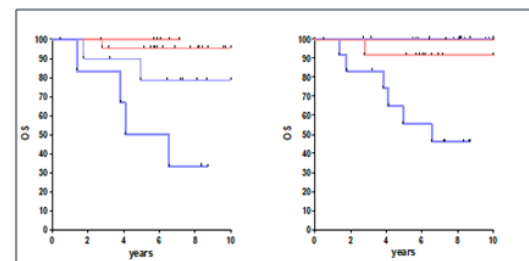
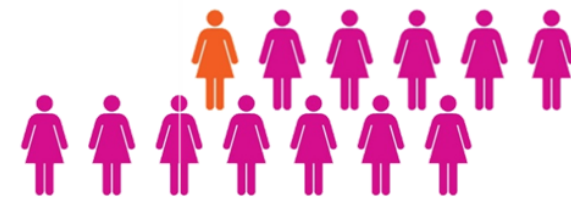
**Κλινικοπαθολογικά
χαρακτηριστικά**

- TNM στάδιο
- Grade
- Διηθημένοι λεμφαδένες
- Ηλικία
- Ki67%
- HER2/neu
- Ορμονικοί υποδοχείς (ER/PgR)

Προοπτικό τμήμα μελέτης



Αναδρομικό τμήμα μελέτης



97 ασθενείς με follow-up: 6.9 χρόνια

Εικόνα 3-1: Αναπαράσταση των μεθοδολογιών που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη.

3.3 ΚΟΠΗ, ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΤΟΜΩΝ

Η κοπή των μπλοκ παραφίνης (FFPE), η αποπαραφίνωση και χρώση των αντίστοιχων τομών πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γ.Α.Ο.Ν.Α. «ο Άγιος Σάββας». Παρατίθεται συνοπτικά η διαδικασία. Από τα επιλεγμένα FFPE κόπηκαν τομές 4-5 μm, βάφτηκαν με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H-E) και έγινε ανεξάρτητη παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο από δύο εξειδικευμένους παθολογοανατόμους προκειμένου να επιλεγούν τα αντιπροσωπευτικότερα πλακίδια κάθε όγκου. Στις επιλεγμένες τομές έγινε μεμονωμένα χρώση με αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD8 (SP16, 1:80, Thermo Scientific, USA), CD163 (10D6, 1: 400, Biocare, USA), CD4 (4B12, 1:40; Biogenex, USA) και FoxP3 (236A/E7, 1:100; Abcam, UK). Οι βέλτιστες αραιώσεις των αντισωμάτων προσδιορίστηκαν μετά από χρώση τομών μάρτυρα και συγκεκριμένα τομών υπερπλαστικών αμυγδαλών ύστερα από αμυγδαλεκτομή. Η χρώση διεξήχθη σε αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας Bond III (Leica Biosystems, Germany) με το αντίστοιχο kit ανίχνευσης (Bond Polymer Refine detection kit, Leica Biosystems). Το πρωτόκολλο περιελάμβανε ανάκτηση αντιγονικών επιτόπων με υψηλό pH για την περίπτωση των CD4, CD163 και FoxP3 και χαμηλό pH για την περίπτωση του CD8 για 30 λεπτά και ίδιο χρόνο επώασης με τα πρωτογενή αντισώματα. Η οπτικοποίηση της χρώσης έγινε με χρήση διαμινοβενζιδίνης (DAB).

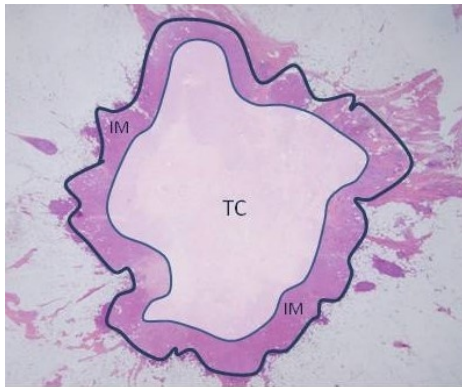
3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΙΗΘΟΥΝΤΩΝ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Στις τομές από το παραπάνω υλικό αναλύθηκε ανοσοϊστοχημικά η ύπαρξη διηθούντων ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση T λεμφοκυττάρων ο δείκτης CD4 και ο δείκτης CD8 (χωρίς να μπορεί να αποκλεισθεί η ανίχνευση και ενός μικρού υποπληθυσμού NK φυσικών φονέων λεμφοκυττάρων που εκφράζει τον τελευταίο δείκτη), για τον προσδιορισμό μακροφάγων ο δείκτης CD163 (προτιμήθηκε από τον ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη CD68 ως πιο αξιόπιστος για τον χαρακτηρισμό M2 μακροφάγων που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τον καρκίνο

[393, 394]) και ο δείκτης FOXP3 για τον προσδιορισμό (πιθανών) κατασταλτικών Τ λεμφοκυττάρων.

3.4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΗΘΟΥΝΤΩΝ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

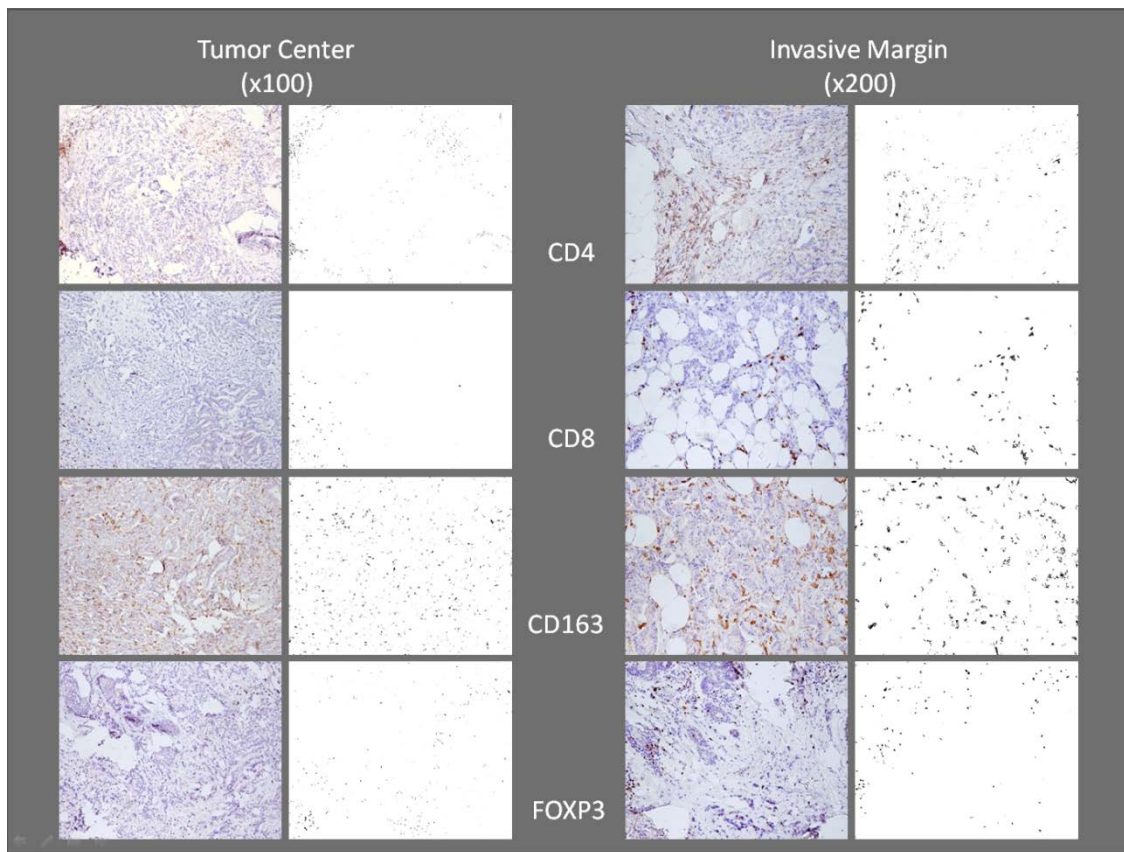
Οι διηθούντες ανοσοκυτταρικοί υποπληθυσμοί σε διάφορους τύπους καρκίνου μελετώνται από πολλές ερευνητικές ομάδες παγκοσμίως όπου ειδικά μηχανήματα με εξειδικευμένα λογισμικά προγράμματα επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση τους με μεγάλη ακρίβεια [38]. Ωστόσο πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει δικές τους,



αξιόπιστες μεθόδους ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των υποπληθυσμών αυτών με ευρέως χρησιμοποιούμενα λογισμικά προγράμματα [395]. Η δική μας μελέτη βασίστηκε εν μέρει στις επίσημες οδηγίες-προτάσεις του «International TILs Working Group 2014» σχετικά με την επιλογή των περιοχών του όγκου [396].

Εικόνα 3-2: Φωτογραφία του όγκου, όπου φαίνεται το κέντρο του όγκου-TC και το διηθητικό μέτωπο-IM

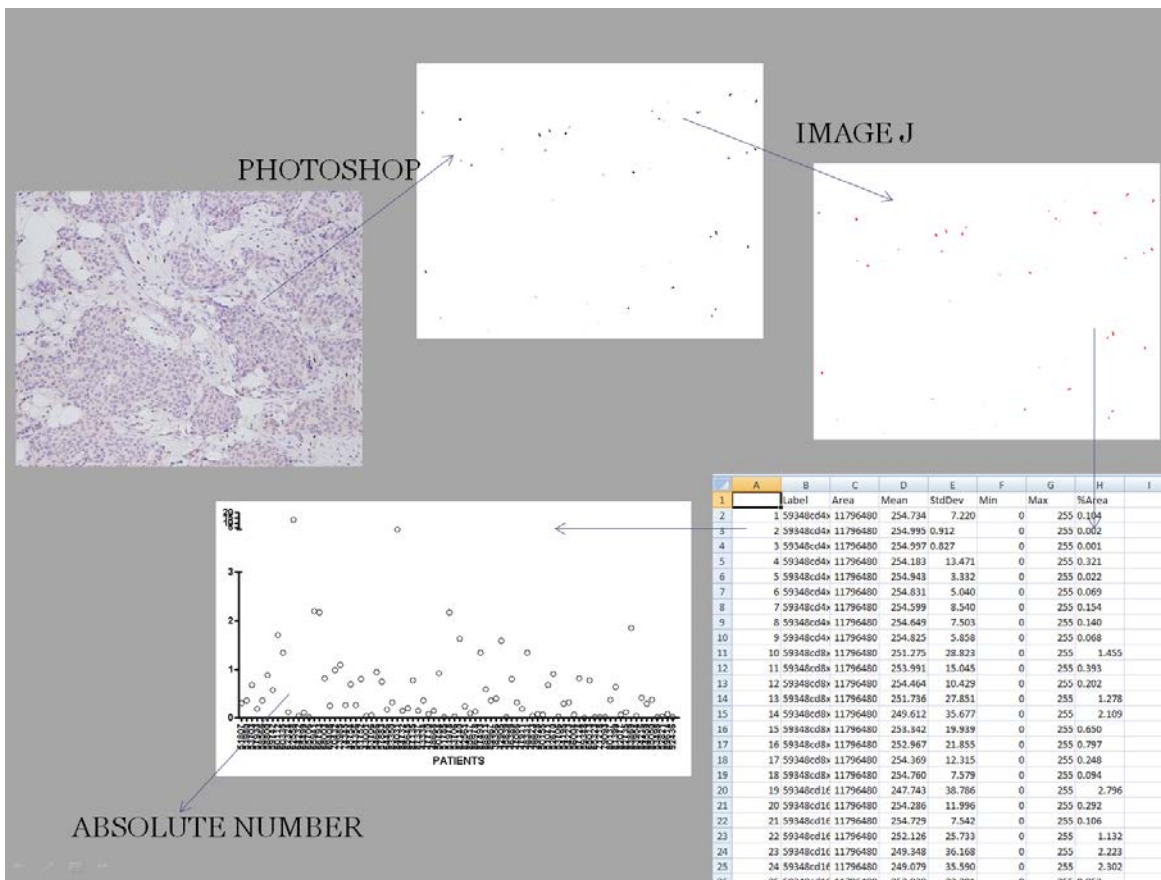
Στη δική μας μελέτη, για τον υπολογισμό του αριθμού των διηθούντων κυττάρων στα ανοσοϊστοχημικά παρασκευάσματα μετά την χρώση, έγινε φωτογράφιση 3-7 αντιπροσωπευτικών περιοχών του TC και του IM του όγκου σύμφωνα με τις υποδείξεις ιατρού παθολογοανατόμου της ομάδας μας. Για την ανάλυση των φωτογραφιών και ποσοτικοποίηση των διηθούντων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά AdobePhotoshop CS6 και ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Με το πρώτο καθορίστηκε ο ακριβής χρωματισμός των θετικών για κάθε δείκτη κυττάρων και η μετατροπή της εικόνας σε μαύρη-άσπρη, με μαύρα τα θετικά κύτταρα.



Εικόνα 3-3: Ενδεικτικές φωτογραφίες μετά την χρώση και στη συνέχεια με την επιλογή μόνο των «βαμμένων» περιοχών.

Οι ασπρόμαυρες εικόνες αναλύθηκαν με το λογισμικό ImageJ ως προς το ποσοστό της επιφάνειας που καλύπτεται από τα ειδικά βαμμένα κύτταρα. Σε δέκα αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών για κάθε δείκτη έγινε από δύο ανεξάρτητους ερευνητές της ομάδας μας, οπτική καταμέτρηση των διηθούντων θετικών κυττάρων στα συγκεκριμένα παρασκευάσματα (φωτογραφίες) και έγινε αντιστοίχιση της επιφανειακής κάλυψης που προκύπτει από το ImageJ με τον αριθμό κυττάρων που αυτή αντιπροσωπεύει. Με βάση τον μέσο όρο από τα διαφορετικά παρασκευάσματα προσδιορίστηκε η σχέση επιφάνειας/αριθμού κυττάρων και με αυτόν τον αριθμητικό παράγοντα έγινε η αναγωγή της καλυπτόμενης επιφάνειας σε αριθμό κυττάρων. Το τελικό αποτέλεσμα των κυττάρων ανά mm^2 έγινε εφόσον λήφθηκε υπ' όψιν η μεγέθυνση 100x για το TC, 200x για το IM του όγκου και το εμβαδόν του οπτικού πεδίου, το οποίο υπολογίσθηκε από ειδικά βαθμονομημένη αντικειμενοφόρο πλάκα. Η

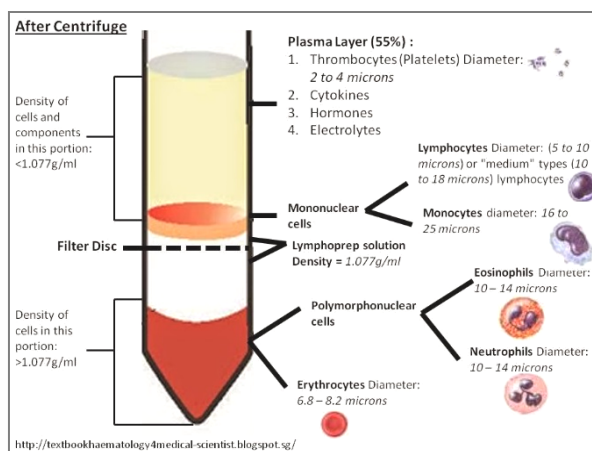
μεγέθυνση 100x επιλέχθηκε για το TC καθώς θέλαμε να έχουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη κάλυψη εμβαδού. Για το IM η μεγέθυνση 200x επιλέχθηκε καθώς η περιοχή αυτή του όγκου είναι αρκετά περιορισμένη και η μεγαλύτερη μεγέθυνση μας βοηθάει ώστε να αποφευχθεί στο να συμπεριληφθούν στην καταμέτρηση μας και κύτταρα τα οποία αποτελούν μέρος του TC και όχι του IM (Εικόνα 3-3). Στην Εικόνα 3-4 φαίνονται διαγραμματικά όλα τα στάδια της επεξεργασίας εικόνων των ιστολογικών παρασκευασμάτων.



Εικόνα 3-4: Στάδια επεξεργασίας εικόνων.

Οι οροί των ασθενών συλλέχθηκαν, όπως αναφέρθηκε, μία μέρα πριν το χειρουργείο και καταψύχθηκαν. Όταν συγκεντρώθηκε το σύνολο των δειγμάτων, αποψύχθηκαν στους 37°C και στη συνέχεια αναμίχθηκαν καλά. Η μέτρηση των IL-1Ra, IL-9, IL-8 IL-10 πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα, με την τεχνολογία του Lumipex χρησιμοποιώντας το (kit) πολλαπλών προαναμειχθέντων αναλυτών (R&D systems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι ποσοτικοποιήσεις των RANTES και TGF-β διεξήχθησαν με την τεχνολογία του Lumipex (R&D systems) με ξεχωριστά εμπορικά διαθέσιμα συστήματα (kit). Ο πλήρης πίνακας των κυτταροκινών/ χημειοκινών που διερευνήθηκαν επιπλέον περιελάμβανε IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 p70, IL-15, IL-17A, TNFα, IFNγ και GM- CSF, αλλά τα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών δεν ήταν ανιχνεύσιμα στις περισσότερες ασθενείς. Η εταιρία που διέθετε το kit ανέφερε πως το σύνολο το 15 κυτταροκινών/ χημειοκινών (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 p70, IL-15, IL-17A, TNFα, IFNγ, GM- CSF, IL-1Ra, IL-9, IL-8, IL-10 & RANTES) μπορούσε να μετρηθεί ταυτόχρονα, αυτό όμως δεν κατέστη δυνατό καθώς τα επίπεδα κάποιων παραγόντων ήταν πολύ υψηλά (π.χ RANTES) ενώ άλλων πολύ χαμηλά και σε πολλές περιπτώσεις κάτω από το διακριτικό όριο της μεθόδου. Για να βελτιστοποιήσουμε την απόδοση της μεθόδου και να αυξήσουμε την ικανότητα ανίχνευσης των χαμηλών επιπέδων έκφρασης κυτταροκινών, αυξήσαμε τον χρόνο επώασης από 2 ώρες σε ολονύκτια επώαση των ορών με το μίγμα των μικροσφαιριδίων. Όσον αφορά το RANTES που τα επίπεδα του ήταν ιδιαίτερα υψηλά, έγινε η ανίχνευσή του σε ξεχωριστό kit πραγματοποιώντας την κατάλληλη αραιώση στα δείγματα του ορού.

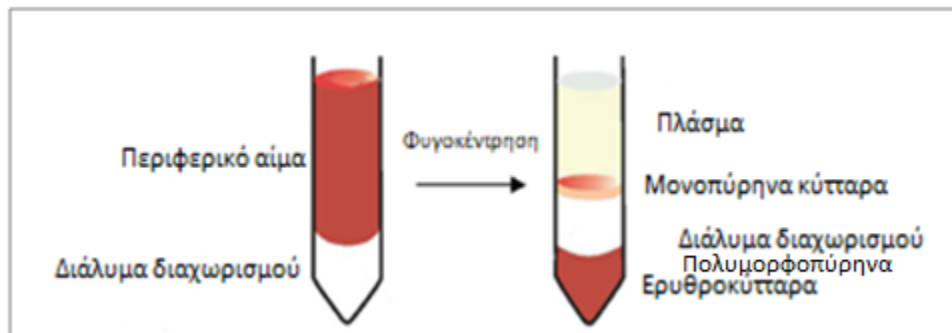
Τα μονοπύρνα κύτταρα (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) μπορούν να απομονωθούν από ολικό περιφερικό αίμα μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας. Η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική ειδική πυκνότητα των κυτταρικών συστατικών του αίματος σε σχέση με το μέσο διαχωρισμού (Ficoll: ένα υδατικό διάλυμα πολυμερούς με πυκνότητα 1,077g/mL). Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι τα μονοπύρνα λευκοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα (που δημιουργούν συσσωματώματα στο συγκεκριμένο υλικό) και τα κοκκιοκύτταρα. Η διαφορική μετακίνηση των κυτταρικών υποπληθυσμών κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης, λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών τους, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό στοιβάδων, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων. Στον πυθμένα του σωλήνα συγκεντρώνονται τα ερυθροκύτταρα, τα οποία συγκολλούνται παρουσία του πολυσακχαρίτη, και τα κοκκιοκύτταρα, τα οποία λόγω της υψηλής πυκνότητάς τους διαπερνούν το διάλυμα. Λόγω της χαμηλότερης πυκνότητάς τους, τα μονοπύρνα εντοπίζονται στην επιφάνεια του διαλύματος του πολυσακχαρίτη, μαζί με τα αιμοπετάλια.



Εικόνα 3-5: Εικόνα του σωληναρίου πριν και μετά τη φυγοκέντρηση δείγματος αίματος επιστοιβαγμένου σε διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων. Μετά τη φυγοκέντρηση τα μονοπύρνα κύτταρα του αίματος εντοπίζονται στη δεύτερη κατά σειρά, υπόλευκη στοιβάδα πάνω από το διάλυμα διαχωρισμού.

Πρωτόκολλο εργασίας

1. Υπό στείρες συνθήκες, τοποθετούμε σε σωλήνα 50ml με κωνικό πυθμένα (falcon), 15 mL διαλύματος διαχωρισμού λεμφοκυττάρων ώσπου να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.
2. Επιστοιβάζουμε αργά και προσεκτικά στα τοιχώματα του σωλήνα falcon (χωρίς να αναμείξουμε) 35 mL αίματος το οποίο έχουμε αραιώσει με PBS (Lonza, Belgium) 1:1.
3. Φυγοκεντρούμε το σωλήνα στα 1800rpm για 30 λεπτά, χωρίς φρένο στη φάση της επιβράδυνσης.
4. Μετά τη φυγοκέντρηση, διακρίνουμε τέσσερις ζώνες-στοιβάδες στο σωλήνα, με τα μονοπύρηννα να περιέχονται στη δεύτερη (από επάνω προς τα κάτω), υπόλευκη στοιβάδα.
5. Με πιπέττα pasterur συλλέγουμε και μεταφέρουμε σε καινούριο σωλήνα φυγοκέντρου τη στοιβάδα των μονοπύρηννων.
6. Προσθέτουμε περίσσεια διαλύματος PBS και ξεπλένουμε με φυγοκέντρηση στα 1200rpm για 10 λεπτά.
7. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6 δύο φορές.
8. Επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε 5-10 mL PBS και προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση και τη βιωσιμότητα των μονοπύρηννων λευκοκυττάρων (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) στο δείγμα μας.



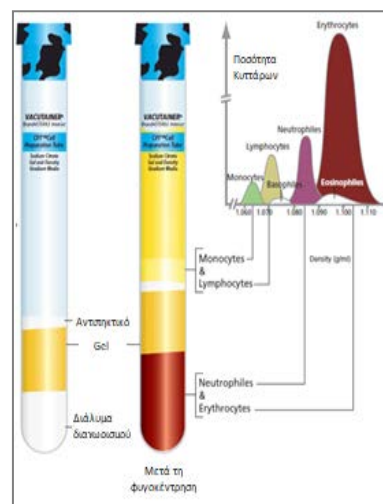
Εικόνα 3-6: Διαχωρισμός κυττάρων περιφερικού αίματος μετά την φυγοκέντρηση σε διάλυμα διαχωρισμού.

3.6.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΩΛΗΝΑΡΙΩΝ

Πλέον είναι εμπορικά διαθέσιμα σωληνάκια που επιτρέπουν άμεσα την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα. Η τεχνική βασίζεται πάλι στη διαφορετική ειδική πυκνότητα των κυτταρικών συστατικών του αίματος σε σχέση με το μέσο διαχωρισμού. Στην παρούσα κλινική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tubes. Τα σωληνάκια αυτά περιέχουν αντιπηκτικό (ηπαρίνη) και το διάλυμα διαχωρισμού τα οποία διαχωρίζονται από ένα gel πολυεστέρα.

Πρωτόκολλο εργασίας

1. Τα σωληνάκια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C)
2. Το αίμα συλλέγεται και μεταφέρεται αμέσως στα ειδικά σωληνάκια (μέγιστη χωρητικότητα 8mL/ σωληνάριο).
3. Ακολουθεί ήπια ανάδευση των σωληναρίων (8-10 φορές) και στην συνέχεια φυγοκέντρηση για 25 λεπτά στα 1700xg.
4. Μετά την φυγοκέντρηση έχουν προκύψει οι στιβάδες που φαίνονται στην εικόνα. Ακολουθεί ανάδευση των σωληναρίων (8-10 φορές). Έτσι το πλάσμα και η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων έχουν αναμιχθεί.
5. Μεταφέρονται σε σωλήνα falcon και προστίθεται διάλυμα PBS +5%FCS (Biochrom AG, Germany) έως τα 50mL.
6. Ακολουθεί μια ακόμη φυγοκέντρηση στα 1700 rpm για 10 λεπτά.
7. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναδιασπείρεται σε όγκο διαλύματος PBS +5% FCS και με τη χρήση Trypan Blue γίνεται προσδιορισμός βιωσιμότητας και αριθμού κυττάρων.



Εικόνα 3-7: Εικόνα του σωληναρίου BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube πριν και μετά τη φυγοκέντρηση δείγματος αίματος. Μετά τη φυγοκέντρηση φαίνονται οι διαφορετικές ομάδες κυττάρων.

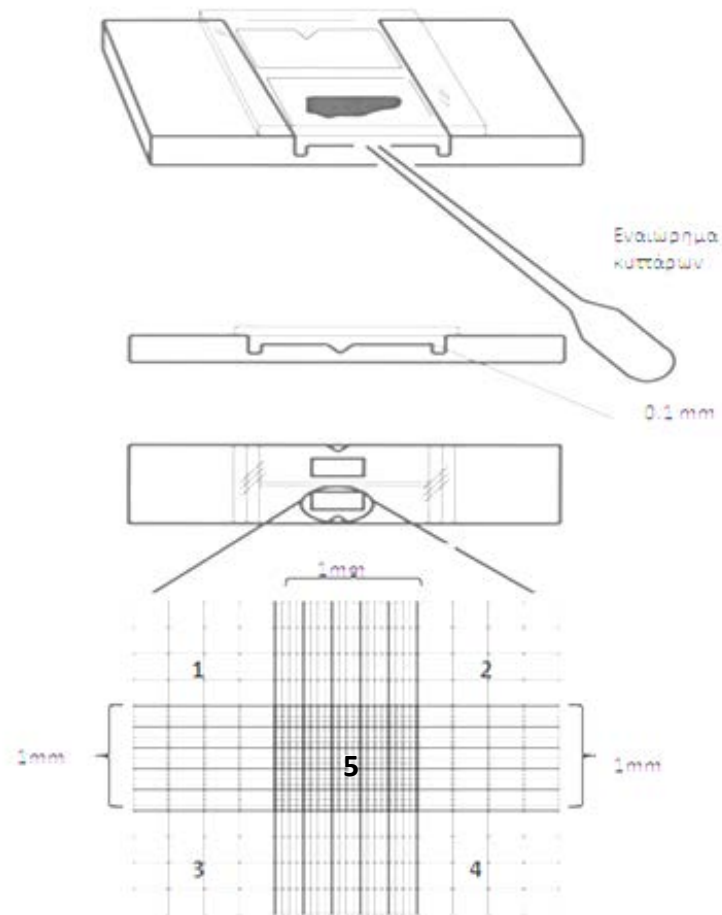
Η εκτίμηση του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων γίνεται με τη χρήση της χρωστικής του κυανού του τρυπανίου (Trypan blue). Το Trypan blue διαπερνά την πλασματική μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων, με αποτέλεσμα να τους προσδίδει μπλε χρώμα και να τα καθιστά ευδιάκριτα από τα ζωντανά κύτταρα που παραμένουν διαυγή. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

Πρωτόκολλο εργασίας

1. 50-100 μL κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρονται σε φρεάτιο μικροπλάκας 96 φρεατίων και αναμειγνύονται με ορισμένη ποσότητα χρωστικής Trypan blue διαλυμένης σε PBS, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 0,2%.
2. Μετά την τοποθέτηση καλυπτρίδας, μεταφέρεται μικρή ποσότητα του κυτταρικού εναιωρήματος στο θάλαμο μέτρησης της πλάκας Neubauer, η οποία με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στη βαθμονομημένη επιφάνεια.
3. Ο φακός εστιάζεται στην περιοχή μέτρησης που αποτελείται από κάθετες και οριζόντιες γραμμές και περιέχει εννέα επιμέρους μικρότερες περιοχές, ίσου εμβαδού (1 mm^2) και ίσου όγκου ($0,1 \text{ mm}^3$).
4. Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται στα 25 κεντρικά τετράγωνα της δομής του σταυρού του αιμοκυτταρόμετρου. Μετρώνται ξεχωριστά τα ζωντανά (άχρωμα) και τα νεκρά (μπλε) κύτταρα.
5. Υπολογίζονται η συγκέντρωση και η βιωσιμότητα των κυττάρων από τις ακόλουθες σχέσεις:

Αριθμός κυττάρων/mL διαλύματος = αριθμός ζωντανών κυττάρων \times συντελεστής αραιώσης $\times 10^4$ (για κάθε τετράγωνο 1,2,3,4 ή 5, Εικόνα 2-8)

% βιωσιμότητα = αριθμός ζωντανών κυττάρων $\times 100$ / συνολικός αριθμός κυττάρων



Εικόνα 3-8: Αναπαράσταση της αιμοκυτταρομετρικής πλάκας Neubauer και της εικόνας του θαλάμου μέτρησης κατά την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Η κάθε περιοχή μέτρησης στο κέντρο του θαλάμου έχει πλευρές 1 mm, ενώ ο όγκος της μετά την τοποθέτηση της καλυπτρίδας ισούται με 0,1 mm³. Μπορούν να μετρηθούν τα κύτταρα στα τετράγωνα 1,2,3,4 ή 5.

3.8 ΨΥΞΗ ΚΑΙ ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την ψύξη των κυττάρων χρησιμοποιείται η κρυοπροστατευτική ουσία διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO (Applichem, Darmstadt, Germany). Πρόκειται για μία οργανοσουλφινυλική, άχρωμη και άοσμη ένωση η οποία έχει τη μορφή παχύρευστου υγρού. Η προσθήκη του DMSO στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων που προορίζονται για ψύξη αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο καλύπτοντας τις κυτταρικές μεμβράνες και προλαμβάνοντας την καταστροφή των κυττάρων από την κρυστάλλωση του ύδατος. Κατά τη διαδικασία της απόψυξης, το DMSO πρέπει να απομακρυνθεί άμεσα από τα κύτταρα, καθώς επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητά τους, ενώ μπορεί να έχει κι άλλη βιολογική δράση (π.χ. οδηγεί στη διαφοροποίηση κάποιων τύπων κυττάρων).

3.8.1 ΨΥΞΗ

1. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
3. Υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων με τη μέθοδο της πλάκας Neubauer και του Trypan blue. Η βιωσιμότητα των κυττάρων που πρόκειται να παγωθούν θα πρέπει να ξεπερνά το 95%.
4. Ρυθμίζεται η συγκέντρωση των παραπάνω κυττάρων ώστε να περιέχονται σε διάλυμα RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA) +40% FCS σε $10-20 \times 10^6$ /ml και σε μισό όγκο ίδιου διαλύματος που εμπεριέχει 20% DMSO. Μετά από 5 λεπτά προστίθεται ίδιος όγκος από το διάλυμα που περιέχει το DMSO και η τελική συγκέντρωση του DMSO είναι 10%.
5. Τα κύτταρα κατανέμονται σε cryovials με τελική συγκέντρωση $10-20 \times 10^6$ κύτταρα/ cryovial και τοποθετούνται σε χάρτινο κουτί αποθήκευσης, που τους επιτρέπει την σταδιακή ψύξη, στους -80°C , όπου μπορούν να διατηρηθούν για μικρό χρονικό διάστημα, και τελικά μεταφέρονται στο υγρό άζωτο (-196°C) για παρατεταμένη κρυοσυντήρηση.

3.8.2 ΑΠΟΨΥΞΗ

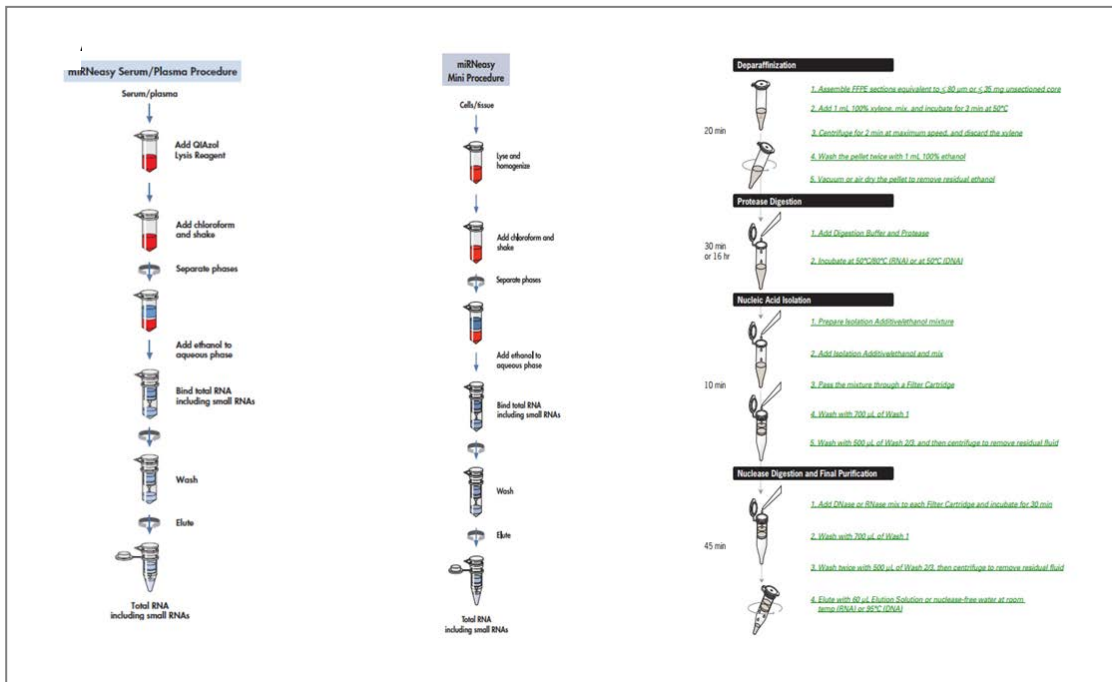
1. Τα δείγματα αποψύχονται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C .
2. Το θρεπτικό υλικό (προθερμασμένο στους 37°C) προστίθεται στάγδην στο cryovial, ώστε να μην υποστούν ωσμωτικό σοκ τα κύτταρα.
3. Στην συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα falcon που περιέχει θρεπτικό υλικό.
4. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 300xg σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
6. Προσδιορίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων με τη μέθοδο του Trypan blue.

3.9 ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΗΛΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Το DNA από απομονωμένα PBMCs απομονώθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο (kit) Maxwell_16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η γονοτύπωση του HLA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit rSSO-Luminex (LIFECODES_ HLA SSO Typing— RAPID, Immucor Transplant Diagnostics, INC, Stamford, CT, USA) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MATCH IT! DNA software (Immucor Transplant Diagnostics, INC, Stamford CT).

3.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ miRNAS ΑΠΟ ΟΡΟ, PBMCs ΚΑΙ FFPE ΑΣΘΕΝΩΝ

miRNAs απομονώθηκαν από τον ορό χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα (kit) Qiagen miRNeasy Serum / Plasma (Qiagen, Hilden, Germany), από PBMCs χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμο σύστημα (kit) Qiagen miRNeasy Mini και από FFPEs με το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα (kit) RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Thermo Fisher Scientific, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.



Εικόνα 3-9: Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης των miRNAs από Α) ορό, Β) PBMCs και Γ) FFPE με τα αντίστοιχα kits.

3.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώνεται γίνεται φωτομετρικά. Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (optical density, OD) του δείγματος στα 260nm και 280nm. Η πρώτη τιμή δίνει την απόλυτη ποσότητα (για το DNA: 1 OD = 50μg/mL, ενώ για το RNA: 1 OD = 40μg/mL), ενώ το πηλίκο των δύο αυτών τιμών χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμείξεις, τότε ο λόγος $OD_{260}/OD_{280} = 2$. Αν υπάρχουν, όμως, προσμείξεις, ο λόγος αυτός μειώνεται.

3.12 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ cDNA (COMPLEMENTARY -ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA)

Ποσότητα ολικού RNA ίση με 1 μg χρησιμοποιείται σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου συστήματος miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Πίνακας 3-1: Αντιδραστήρια για τη κατασκευή cDNA.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
5x miScript HiSpec Buffer	4 μl
miScript Nucleics Mix	2 μl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μl
Template RNA	100ng
dH ₂ O ελεύθερο από RNase	Τελικός όγκος 20μl

Ακολουθούν οι εξής συνθήκες (Πίνακας 3-2), για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης σε μηχανήμα iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, California, U.S.A.)

Πίνακας 3-2: Θερμικό πρωτόκολλο για τη κατασκευή cDNA.

Θερμοκρασία	Λεπτά
37°C	60'
95°C	5'

Το cDNA που προκύπτει από τα παραπάνω στάδια αραιώνεται 1:10 και αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την ανάλυσή του.

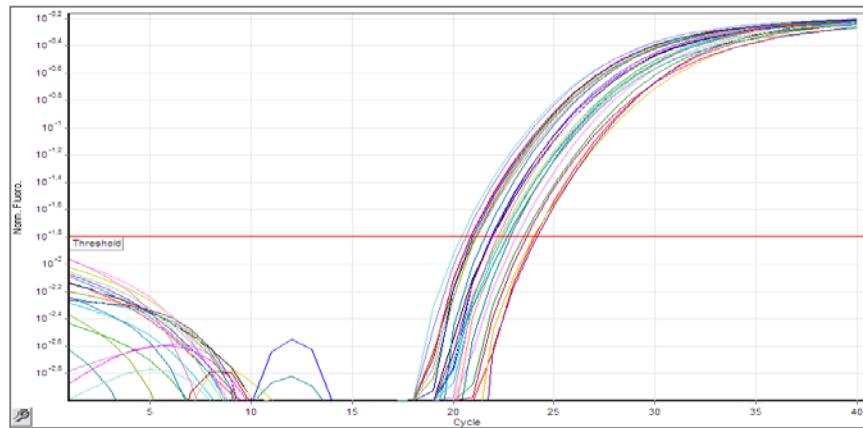
Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – polymerase chain reaction) είναι μία βασική τεχνική της μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και την ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα. Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή θραύσματος DNA) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (primers), καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικά με τα άκρα της επιθυμητής περιοχής. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στη DNA μήτρα (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, που γίνεται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα, τους θερμικούς κυκλοποιητές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια οι εκκινητές σε περίσσεια υβριδίζονται στο DNA σε θερμοκρασία που ποικίλλει, συνήθως, από 50 – 60°C και η οποία είναι ειδική για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μία DNA πολυμεράση. Στην πράξη, 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA στόχου. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η Real Time PCR δηλαδή η PCR πραγματικού χρόνου (qPCR, ποσοτική PCR). Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η τεχνολογία αυτή εμπεριέχει την αρχή λειτουργίας του απλού PCR με κύρια διαφορά την ποσοτικοποίηση

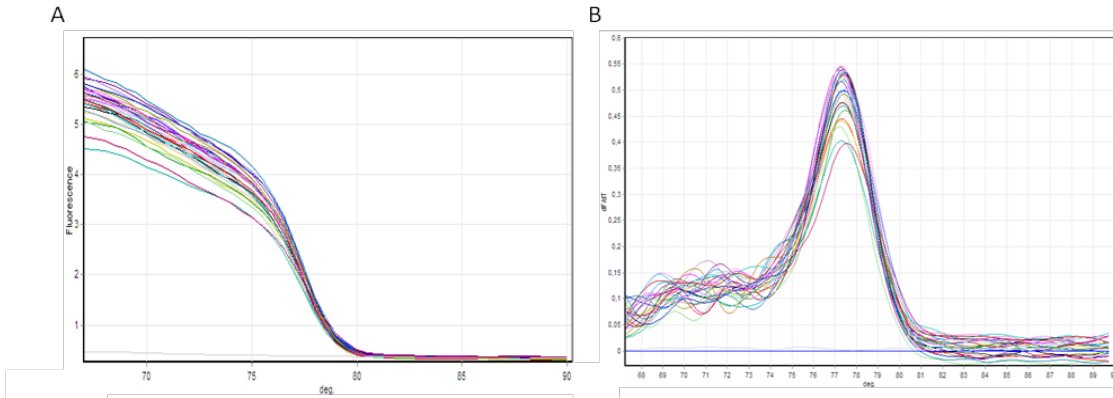
του προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, ανιχνεύοντας ειδικό φθορισμό που εκλύεται από το συντιθέμενο προϊόν. Ο φθορισμός αυτός έχει ένταση ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος που έχει συντεθεί. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η ποσότητα του προϊόντος είναι ανάλογη του ποσού της μήτρας που αρχικά υπήρχε στο κάθε δείγμα, προσδιορίζεται το επίπεδο της συγκεκριμένης μήτρας μέσα στο δείγμα. Έτσι, υπολογίζεται το ποσό του συντιθέμενου προϊόντος στο τέλος του κάθε κύκλου.



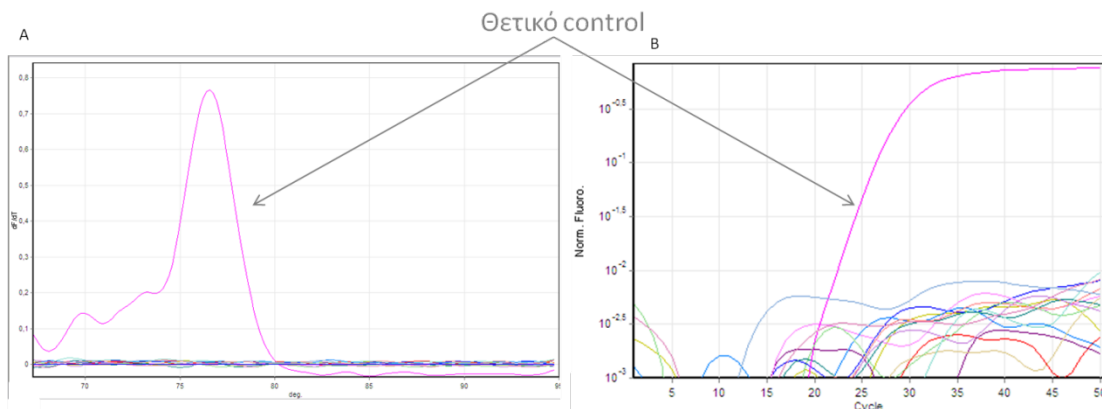
Εικόνα 3-10: Γραφική παράσταση καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή Ct, που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης. Η τιμή Ct είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο Ct από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Ένα από τα πιο διαδεδομένα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται είναι το SYBR Green, μια χρωστική που διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και να εκλύει φθορισμό. Το μειονέκτημα του φθοριοχρώματος αυτού είναι ότι δεσμεύεται μη ειδικά, με συνέπεια να εκλύεται φθορισμός όχι μόνο από το ειδικό προϊόν αλλά και από οποιαδήποτε δίκλωνη δομή νουκλεϊνικού οξέος, όπως από τα διμερή εκκινητών που συχνά σχηματίζονται. Η μη ειδική του σύνδεση απαιτεί επιπρόσθετα στάδια ανάλυσης για τον προσδιορισμό του ειδικού σήματος. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται στο τέλος κάθε πειράματος η ανάλυση της καμπύλης των σημείων τήξης (melting curve analysis). Αυτή δημιουργείται όταν με τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται. Ο εκλυόμενος φθορισμός σχηματίζει μια καμπύλη που παρουσιάζεται ως γράφημα του αρνητικού λογαρίθμου του

φθορισμού προς τη θερμοκρασία ($-dF/dT$) και είναι ειδική και αντιπροσωπευτική για κάθε μόριο DNA.



Εικόνα 3-11: Αντιπροσωπευτικές Καμπύλες αποδιάταξης (A) και κορυφές αποδιάταξης (B) των προϊόντων ενίσχυσης με Real-Time. Η ύπαρξη μοναδικής κορυφής υποδηλώνει την ενίσχυση μοναδικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, η qPCR πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) χρησιμοποιώντας το miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Για την ανίχνευση ώριμων miRNAs χρησιμοποιήσαμε εκκινητές (Hs_miR-21_2; Hs_miR-181a_2; Hs_miR-146a_1; Hs_miR-23a_2; Hs_miR-16_2; Hs_miR-155_2) (Qiagen, Hilden, Germany) και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Ως spike in control χρησιμοποιήθηκε το miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control C-39 (Qiagen, Hilden, Germany). Ενώ η μέθοδος $\Delta\Delta Ct$ χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων και η καμπύλη τήξης για την ειδικότητα των επιπέδων έκφρασης των miRNAs.



Εικόνα 3-12: Στην εικόνα φαίνονται A) Κορυφή αποδιάταξης και B) καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR από τα πρώτα δοκιμαστικά πειράματα. Με ροζ φαίνεται το θετικό control, ενώ το προς μελέτη miRNA στα προς εξέταση δείγματα φαίνεται να είναι μη ανιχνεύσιμο. Έπειτα από δοκιμαστικά πειράματα στη συγκέντρωση του cDNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση του RT-PCR καταλήξαμε στις συνθήκες που αναφέρονται εκτενώς στην συνέχεια και στην αραιώση 1:10 που πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα μας

Πίνακας 3-3: Στοιχειομετρία αντίδρασης.

Δείγμα cDNA.....	1μl
miScript SYBR Green PCR.....	10μl
Εκκινητής	2μl
Universal εκκινητής.....	2μl
ddH ₂ O.....	< 20 μL

Πίνακας 3-4: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR.

Κύκλος	Βήμα	T °C	t (min:s)
Αποδιάταξη (Hold)	1 ^ο	95	15:00
Πολυμερισμός (Cycling) x40	1 ^ο	94	00:15
	2 ^ο	55	00:30
	3 ^ο	70	00:30
Τήξη (Melt)	Αύξηση από 67°C έως 90°C (0.5°C / κύκλο)		

Πίνακας 3-5: Εκκινητές για την ανίχνευση των miRNAs

miRNA	miScript Primer Assays Αλληλουχία (5'-3')
Hs_miR-21_2	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
Hs_miR-181a_2	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
Hs_miR-146a_1	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
Hs_miR-23a_2	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
Hs_miR-16_2	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
Hs_miR-155_2	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGU

3.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το GraphPad Prism έκδοση 7 (GraphPad Software, Inc) και το IBM SPSS 24 χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Το Mann-Whitney t τεστ με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval) και οι συσχετίσεις Spearman χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική εκτίμηση. Για την αξιολόγηση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης (DFS) και συνολικής επιβίωσης (OS) χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες Kaplan-Meier και log-rank και Gehan-Breslow-Wilcoxon τεστ, και οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

3.14.1 ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Η πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis) επιβίωσης Cox Regression, πραγματοποιήθηκε τόσο για την ελεύθερη νόσου όσο και την συνολική επιβίωση, με τη βοήθεια του προγράμματος IBM SPSS 24. Όλες οι ονομαστικές μας μεταβλητές μετατράπηκαν σε αριθμητικές με σκοπό την ευκολότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τη δημιουργία των τελικών μοντέλων, μετά από την αρχική αξιολόγηση των μεταβλητών μας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος forward likelihood ratio, με όριο για την εισαγωγή των σημαντικών μεταβλητών το 0.05. Οι πίνακες παρουσιάζουν τη σημαντικότητα κάθε μεταβλητής και hazard ratio μαζί με το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

3.14.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ

Η ομαδοποίηση των ασθενών σε ομάδες-συστάδες (clusters) πραγματοποιήθηκε με hierarchical clustering, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Ward's Method του λογισμικού IBM SPSS 24, δίνοντάς μας 3 διακριτά clusters με τους λόγους χι/δι. Η δυνατότητα χαρακτηρισμού των clusters με βάση τα miRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση QUEST classification trees, με τους λόγους χι/δι στο πρόγραμμα IBM SPSS Modeler 18. Με βάση αυτά τα QUEST classification trees υπολογίστηκε το σφάλμα πρόβλεψης για κάθε μεταβλητή. Ένα επιπλέον QUEST classification tree χρησιμοποιήθηκε με όλες τις μεταβλητές για τον υπολογισμό της σημαντικότητας κάθε μεταβλητής (predictor

importance p_i), οι οποίες χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του τελικού αλγορίθμου miRNASCORE που κατηγοριοποιεί τελικά τους ασθενείς μας.

3.14.3 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ROC (ROC CURVES)

Τα διαγράμματα ROC δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος IBM SPSS 24 και παρουσιάστηκαν μαζί με το εμβαδό της περιοχής κάτω από το διάγραμμα (Area Under Curve, AUC), χαρακτηριστικό μέγεθος έκφρασης της δυνατότητας πρόβλεψης της μεταβλητής μας. Το στατιστικό μέγεθος Jouden (J), εκφράζοντας τη μέγιστη απόσταση της διαγωνίου από το γραφική μας παράσταση υπολογίστηκαν από εμάς, μέσω του τύπου $J=(\text{sensitivity}+\text{specificity}-1)$. Επιπροσθέτως, τα διαγράμματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των ορίων μεταξύ των ομάδων/συστάδων μας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στην μελέτη αυτή συμμετείχαν ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο πορογενή, διηθητικό μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Στο πλαίσιο ανάλυσης των αποτελεσμάτων και σε μια προσπάθεια να δημιουργήσουμε ομάδες ασθενών, κατηγοριοποιήσαμε τις ασθενείς με βάση τα εγκαθιδρυμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους. Επειδή η μελέτη μας περιέχει στο σύνολο της 162 ασθενείς και με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που θέσαμε αρχικά ως βασικό παράγοντα κατηγοριοποίησης η κάθε ομάδα ασθενών κατακερματίζεται και οι ασθενείς σε κάθε υπο-ομάδα είναι πολύ λίγοι, αποφασίσαμε να ομαδοποιήσουμε τους ασθενείς Grade 1 και Grade 2 και τους ασθενείς που χαρακτηρίζονται από Grade 3. Όσον αφορά στην σταδιοποίηση κατά TNM, ομαδοποιήθηκαν οι ασθενείς ως εξής: πρώιμου σταδίου- early stage που περιλαμβάνουν I & IIA και προχωρημένου σταδίου- advanced stage IIB, IIIA & IIIC, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως ασθενείς IIIB δεν συμπεριελήφθησαν στην μελέτη καθώς στο στάδιο αυτό ο καρκίνος μπορεί να έχει επεκταθεί και στο θωρακικό τοίχωμα ή/και στο δέρμα.

4.2 ΔΙΗΘΗΣΗ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΣΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

Σε ένα σύνολο 162 ασθενών με διηθητικό μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού που δεν είχαν λάβει νέο-επικουρική θεραπεία, διερευνήθηκε η διήθηση από ανοσοκύτταρα (CD8, CD163), τόσο στο διηθητικό μέτωπο (Invasive Margin) του όγκου όσο και στο κέντρο του όγκου (Tumor Center). Κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών ήταν η μεταστατική ή αμφίπλευρη νόσος τη στιγμή της διάγνωσης, ιστορικό οποιουδήποτε άλλου τύπου καρκίνου, η τοπική υποτροπή κατά τη διάρκεια της κλινικής παρακολούθησης (follow-up), καθώς και η ανάπτυξη δεύτερου πρωτοπαθούς όγκου. Στον Πίνακα 4-1 παρατίθενται τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

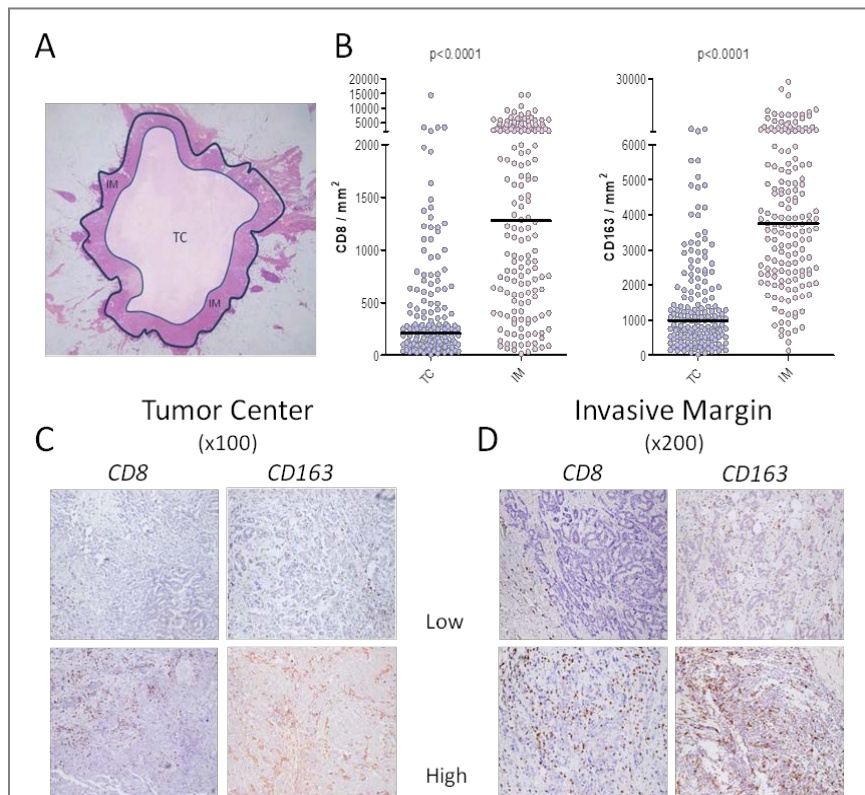
Σύνολο ασθενών n=162	
Μέση ηλικία (χρόνια)	Εύρος
54	27-78
Tumor size	n
Tx	1
T1	70
T2	81
T3	10
LN status	n
N0	64
N1	56
N2	32
N3	10
AJCC stage (TNM)	n
I	45
IIA	38
IIB	34
IIIA	34
IIIB	X*
IIIC	11
Grade	n
1	4
2	86
3	72
Hormone receptors	n
θετικοί	127
αρνητικοί	35
HER-2/neu	n
θετικό	41
αρνητικό	121

Αρχικά μελετήθηκε η διαφορική χωροταξική κατανομή των CD8 και CD163 στο κέντρο του όγκου (TC) και στο διηθητικό μέτωπο (IM) στο σύνολο των ασθενών. Φαίνεται πως η διήθηση από τους δύο αυτούς ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς είναι μεγαλύτερη στο διηθητικό μέτωπο απ' ό,τι στο κέντρο του όγκου (Εικόνα 4-1).

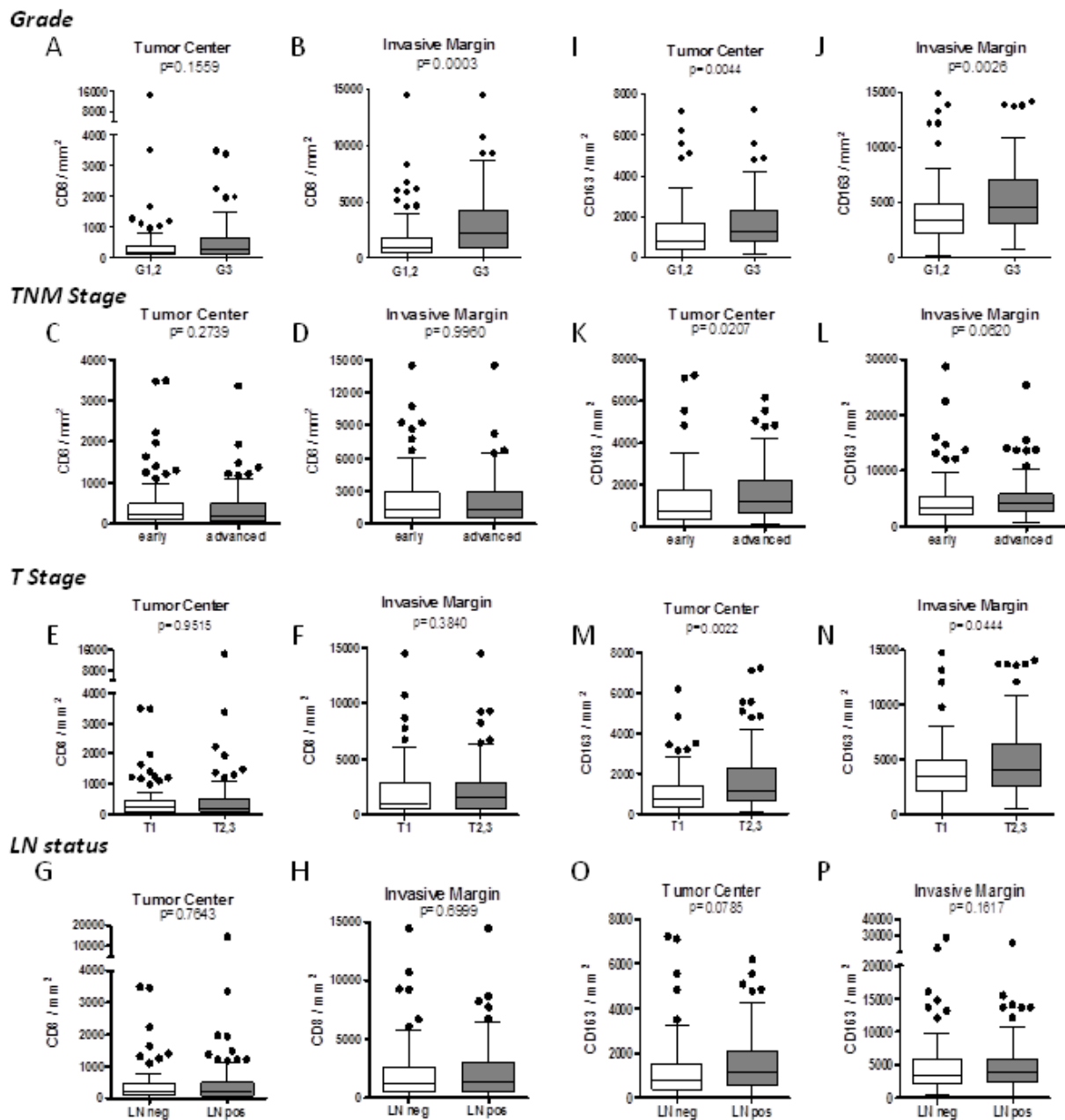
* Ασθενείς σταδίου IIIB δεν εισήχθησαν στην μελέτη

Πίνακας 4-1: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η διήθηση από αυτούς τους υποπληθυσμούς τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό μέτωπο σε σχέση με εγκαθιδρυμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, όπως ο βαθμός διαφοροποίησης (Grade), η σταδιοποίηση κατά TNM, το μέγεθος του όγκου (T) και τη διήθηση λεμφαδένων (LN status) (Εικόνα 4-2). Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά CD8+ κυττάρων στο διηθητικό μέτωπο του όγκου (Εικόνα 4-2B) και CD163+ τόσο στο κέντρο (Εικόνα 4-2I) όσο και στο διηθητικό μέτωπο (Εικόνα 4-2J) σε ασθενείς με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης (Grade 3). Όσον αφορά την σταδιοποίηση κατά TNM, υψηλότερη διήθηση παρατηρήθηκε για τα CD163+ κύτταρα τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου (IIB, IIIA, IIIC) (Εικόνα 4-2K-L). Παρόμοια κατανομή παρατηρήθηκε και με την κατηγοριοποίηση σύμφωνα με το μέγεθος του όγκου. Υψηλότερη διήθηση παρατηρήθηκε για τα CD163+ κύτταρα τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου σε ασθενείς T2, T3 σε σχέση με τους ασθενείς T1 (Εικόνα 4-2M-N).



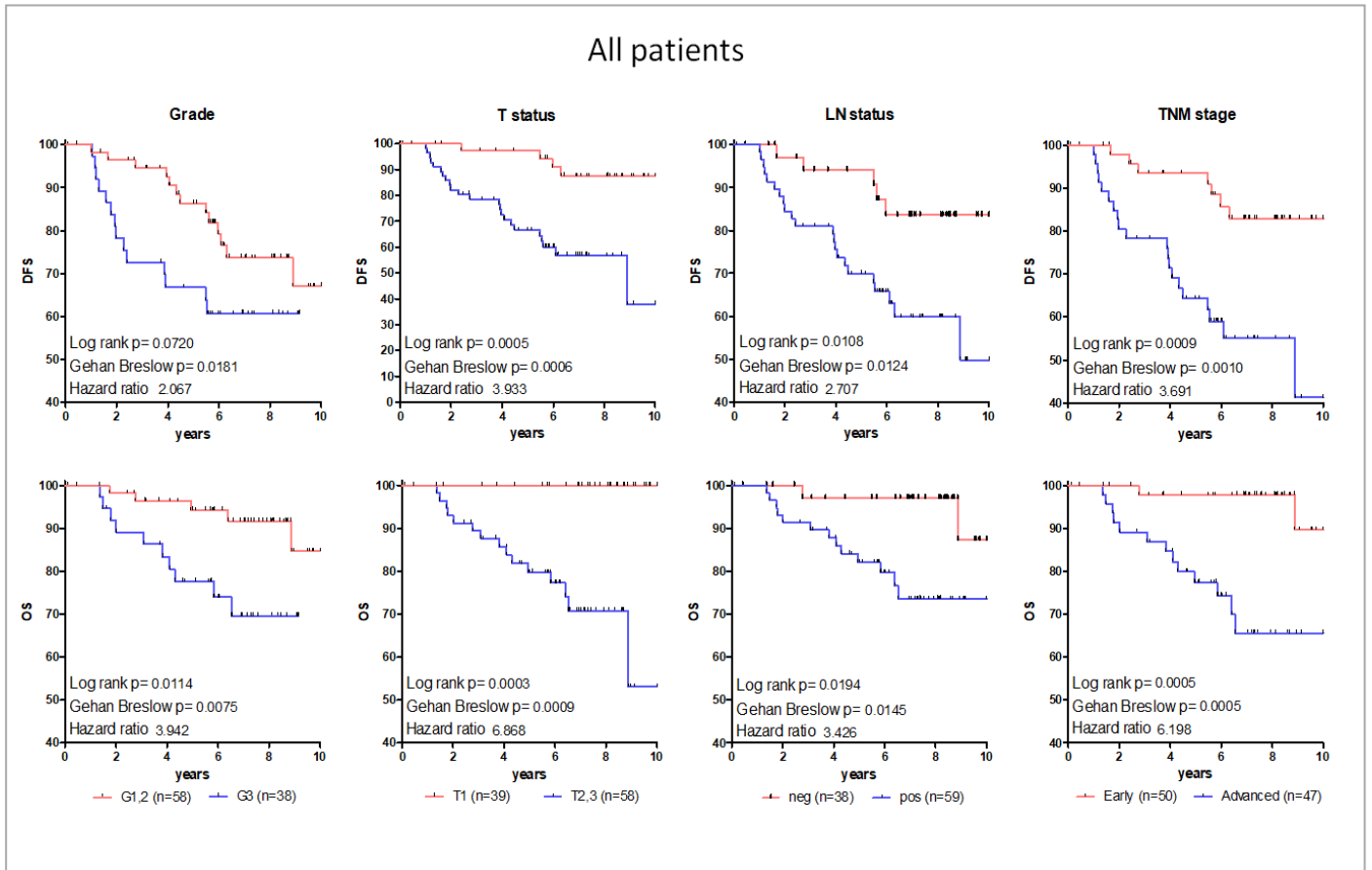
Εικόνα 4-1: Κατανομή των CD8+ & CD163+ κυττάρων στο κέντρο του όγκου και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου.



Εικόνα 4-2: Κατανομή των CD8+ & CD163+ κυττάρων στο κέντρο του όγκου και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου ανάλογα με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

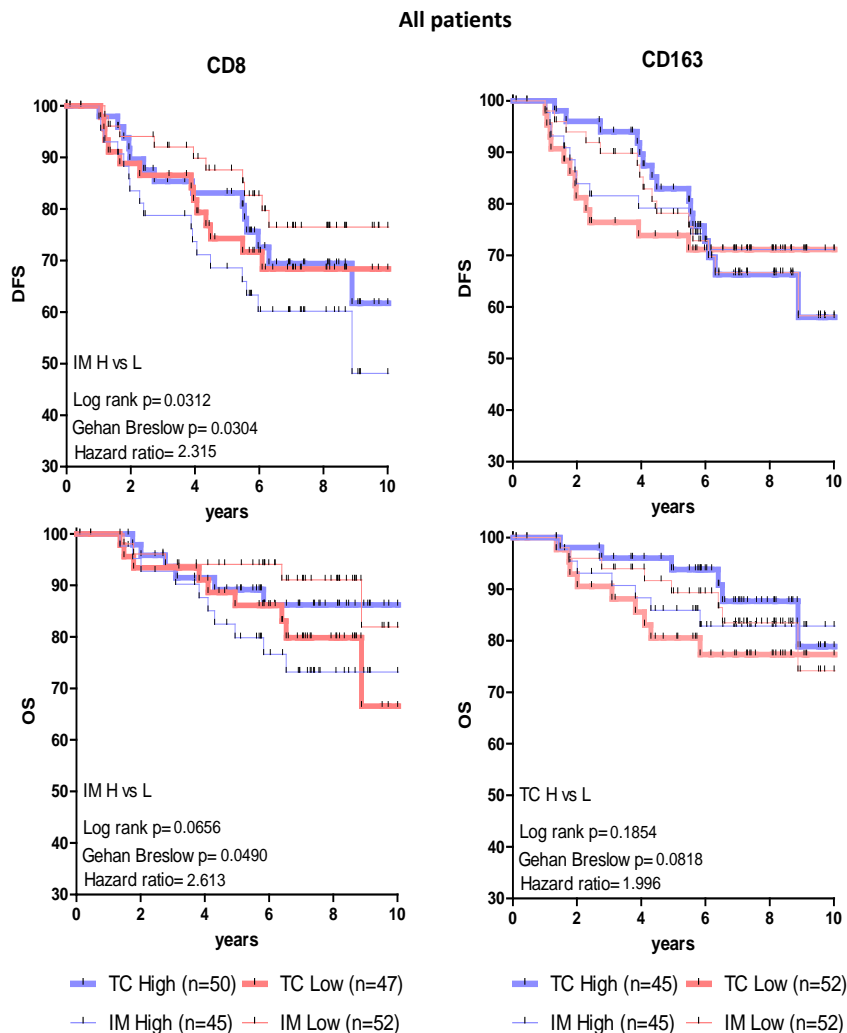
4.3 ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Για 97 από τις ασθενείς στις οποίες μελετήθηκε η διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, ήταν διαθέσιμη η κλινική παρακολούθησή τους (διάμεσος 6.9 χρόνια (0.11-10χρόνια). Στην Εικόνα 4-3 παρατίθενται οι καμπύλες επιβίωσης (DFS & OS) των ασθενών σύμφωνα με τα εγκαθιδρυμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (Βαθμός διαφοροποίησης-Grade, στάδιο T, διήθηση λεμφαδένων-LN, και στάδιο κατά TNM).



Εικόνα 4-3: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier των ασθενών σύμφωνα με εγκαθιδρυμένους κλινικοπαθολογικούς δείκτες.

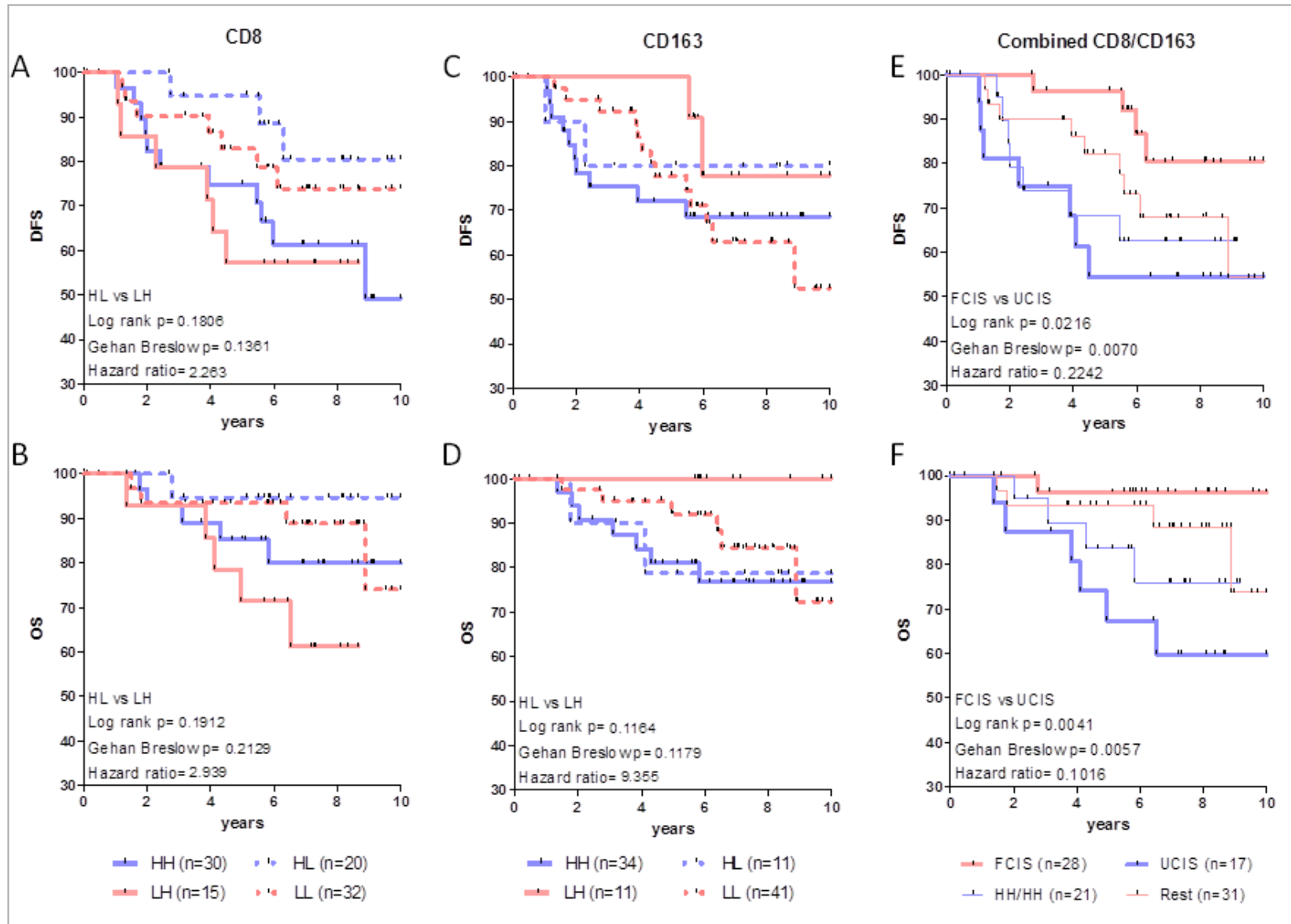
Στο γράφημα που ακολουθεί (Εικόνα 4-4) παρατίθενται οι καμπύλες για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (A & C) και συνολική επιβίωση (B & D). Μελετήθηκε η επιβίωση των ασθενών ανάλογα με το βαθμό διήθησης στο TC ή IM, όπου η διήθηση ορίστηκε ως υψηλή (H) ή χαμηλή (L) εάν η τιμή ήταν πάνω ή κάτω από τον διάμεσο (median), αντίστοιχα. Ασθενείς με χαμηλή διήθηση από CD8+ κύτταρα στο διηθητικό μέτωπο είχαν σημαντικά καλύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση συγκριτικά με εκείνες που είχαν υψηλή (A). Αντίστοιχη εικόνα παρατηρήθηκε και για την συνολική επιβίωση (B). Όσον αφορά τη διήθηση των CD163+ κυττάρων, παρατηρήθηκε μία τάση στην συνολική επιβίωση όσον αφορά την διήθηση στο TC. Καλύτερη συνολική επιβίωση παρατηρήθηκε σε ασθενείς με υψηλή διήθηση από CD163+ κύτταρα στο κέντρο του όγκου, σε αντίθεση με εκείνες με χαμηλή διήθηση.



Εικόνα 4-4: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τα CD8+ & CD163+ κύτταρα, ανάλογα με την πυκνότητα των υποπληθυσμών στο κέντρο TC και στο διηθητικό μέτωπο IM.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε να συσχετιστεί, ταυτόχρονα, η διήθηση στο κέντρο του όγκου και στο διηθητικό μέτωπο τόσο από CD8+ όσο και των CD163+ κύτταρα, με σκοπό την ανεύρεση ενός μοτίβου που πιθανόν να σχετίζεται με την κλινική ανταπόκριση των ασθενών. Στα διαγράμματα A & B (Εικόνα 4-5) απεικονίζονται οι καμπύλες επιβίωσης όπως προέκυψαν από συνδυασμούς διήθησης από CD8+ κύτταρα και στα C & D από CD163+ κύτταρα. Το HL αναφέρεται σε υψηλή διήθηση τόσο στο κέντρο όσο και στο διηθητικό μέτωπο, το HL αναφέρεται σε υψηλή διήθηση στο κέντρο και χαμηλή στο διηθητικό μέτωπο, το LH χαρακτηρίζει χαμηλή διήθηση στο κέντρο και υψηλή στο διηθητικό μέτωπο και τέλος το LL αφορά σε χαμηλή διήθηση τόσο στο κέντρο του όγκου όσο και στο διηθητικό μέτωπο. Οι καμπύλες επιβίωσης για τη διήθηση από CD8+ κύτταρα αναδεικνύουν πως το πρότυπο HL έχει καλύτερη κλινική έκβαση από το LH. Ενώ για τα CD163+ κύτταρα το ευνοϊκότερο προφίλ όσον αφορά την κλινική ανταπόκριση είναι το LH έναντι του HL.

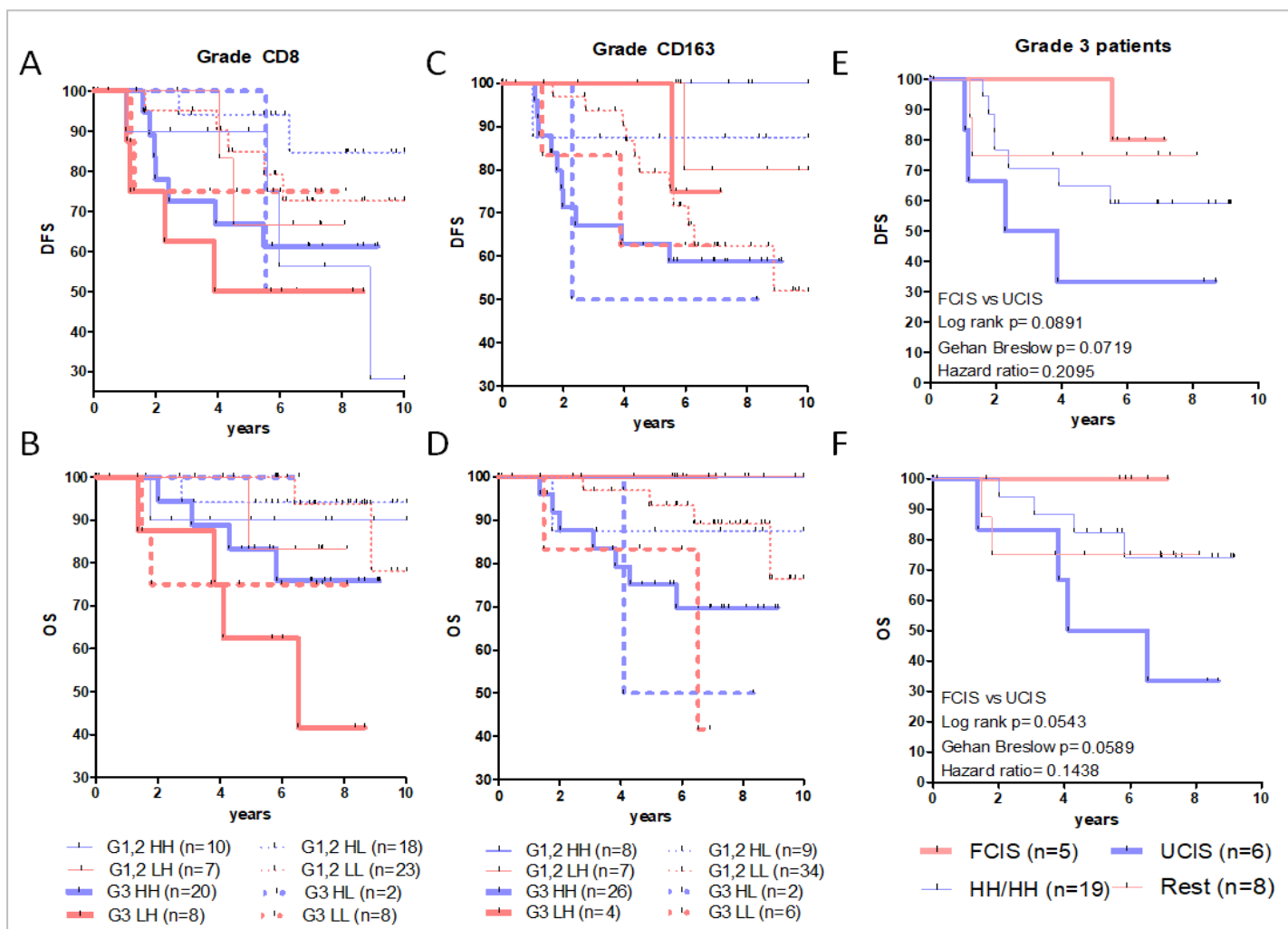
Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων αποδεικνύουν τον προγνωστικό ρόλο της χωροταξικής κατανομής των CD8+ και CD163+ κυττάρων στον καρκίνο του μαστού. Στη συνέχεια, συνδυάσαμε τα προφίλ που βρήκαμε για τα CD8+ και CD163+ κύτταρα και δημιουργήσαμε κάποιες υπογραφές που εμπεριέχουν τόσο τα CD8+ & CD163+ κύτταρα και την χωροταξική τους κατανομή στο κέντρο και στο διηθητικό μέτωπο. Έτσι, προέκυψε η FCIS (favorable cell immune signature) υπογραφή που χαρακτηρίζεται από CD8+ HL ή CD163+ LH ή και τα δύο ταυτόχρονα και συσχετίζεται με ευνοϊκή κλινική ανταπόκριση. Η άλλη υπογραφή χαρακτηρίζεται από CD8+ LH ή CD163+ HL ή και τα δύο ταυτόχρονα (και όχι CD8+ HL ή CD163+ LH) και ονομάστηκε UCIS (unfavorable cell immune signature), με χειρότερη κλινική έκβαση. Στα διαγράμματα E & F (Εικόνα 4-5) παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης για τις ασθενείς που η διήθηση τους χαρακτηρίζεται από τις υπογραφές UCIS & FCIS. Οι ασθενείς με FCIS παρουσιάζουν σημαντικά καλύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και συνολική επιβίωση (OS) σε σχέση με τις ασθενείς με UCIS.



Εικόνα 4-5: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τον συνδυασμό CD8+ & CD163+ κυττάρων ανάλογα με την πυκνότητα των υποπληθυσμών (το πρώτο γράμμα αναφέρεται στο κέντρο του όγκου TC και το δεύτερο στο διηθητικό μέτωπο IM).

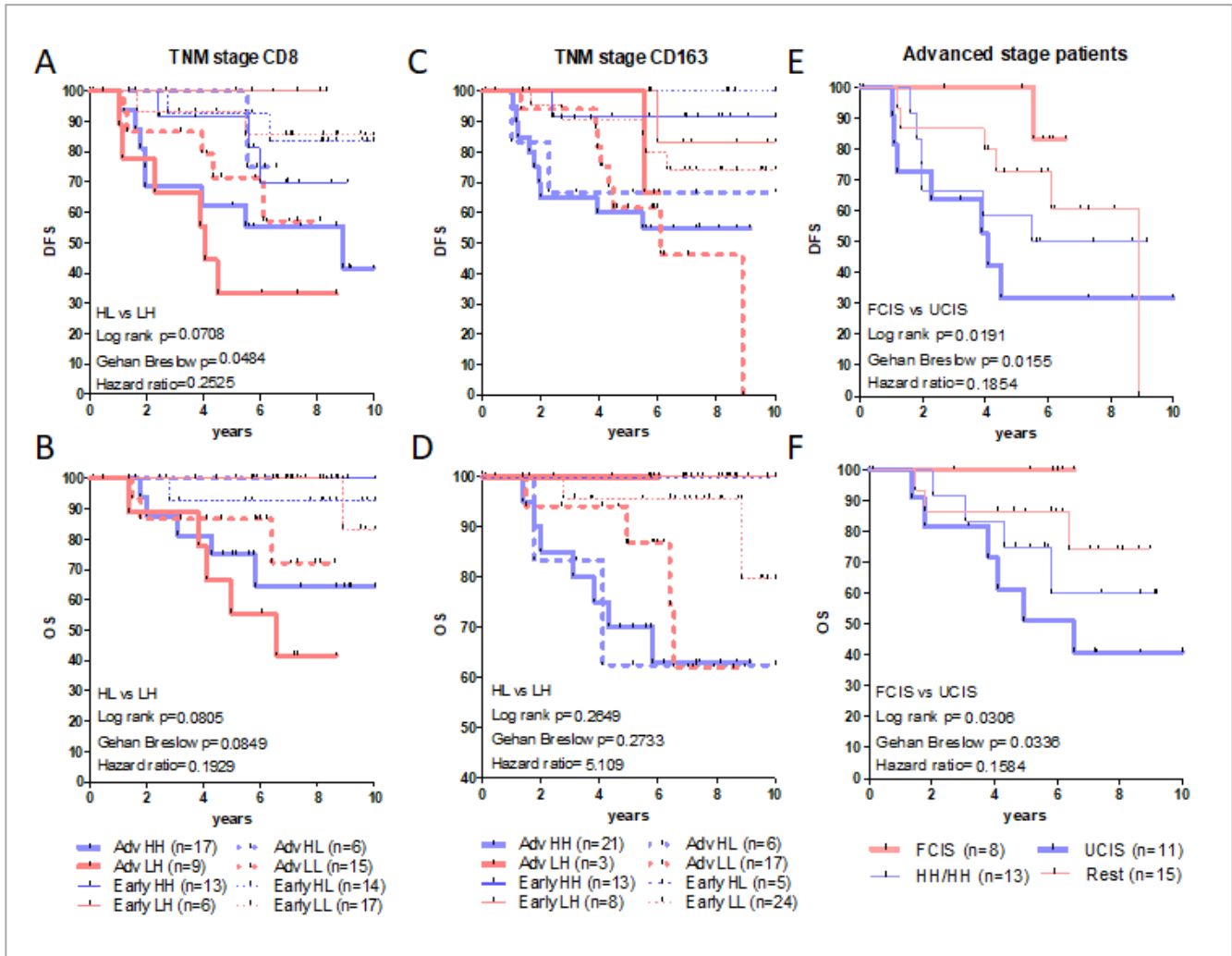
4.3.2 ΕΥΝΟΙΚΕΣ ΚΑΙ ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ «ΥΠΟΓΡΑΦΕΣ» ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στη συνέχεια, θελήσαμε να δούμε κατά πόσο οι υπογραφές που δημιουργήσαμε σχετίζονται ή όχι με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Έτσι λοιπόν κατηγοριοποιήσαμε τους ασθενείς με βάση το βαθμό διαφοροποίησης (Grade) λαμβάνοντας υπόψη πάντα τις υπογραφές. Ασθενείς με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης (Grade 3) που φέρουν τις FCIS υπογραφές εμφανίζονται να πλησιάζουν πολύ τη στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με ασθενείς που έχουν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης (Grade 1,2) (Εικόνα 4-6).



Εικόνα 4-6: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης.

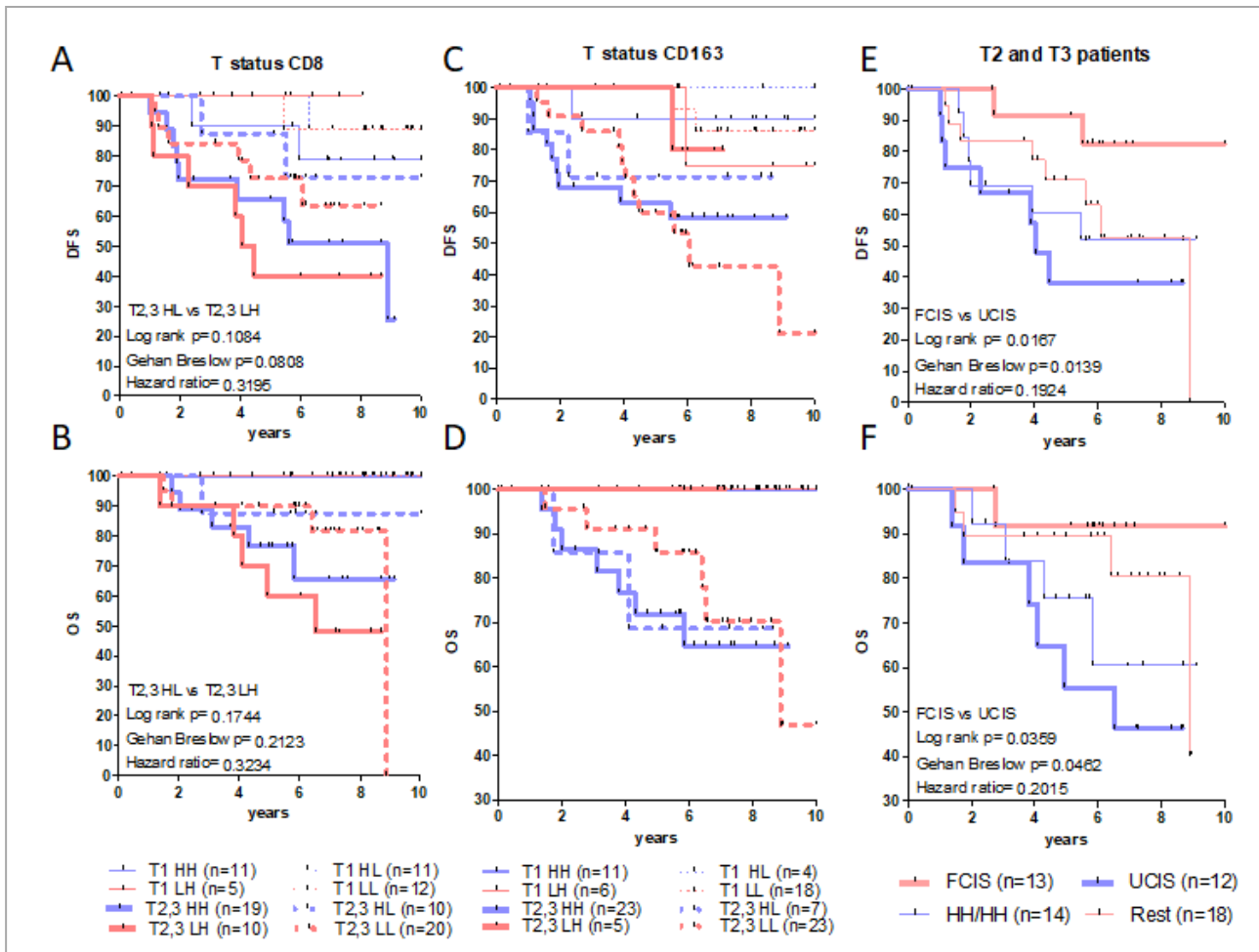
Παρόμοια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τις υπογραφές και το στάδιο (πρώιμο ή προχωρημένο) (Εικόνα 4-7). Ασθενείς προχωρημένου σταδίου που φέρουν τις FCIS υπογραφές έχουν στατιστικά σημαντικότερη ελεύθερη νόσου (C) και συνολική επιβίωση συγκριτικά με ασθενείς που φέρουν τις UCIS υπογραφές (D).



Εικόνα 4-7: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το στάδιο της νόσου.

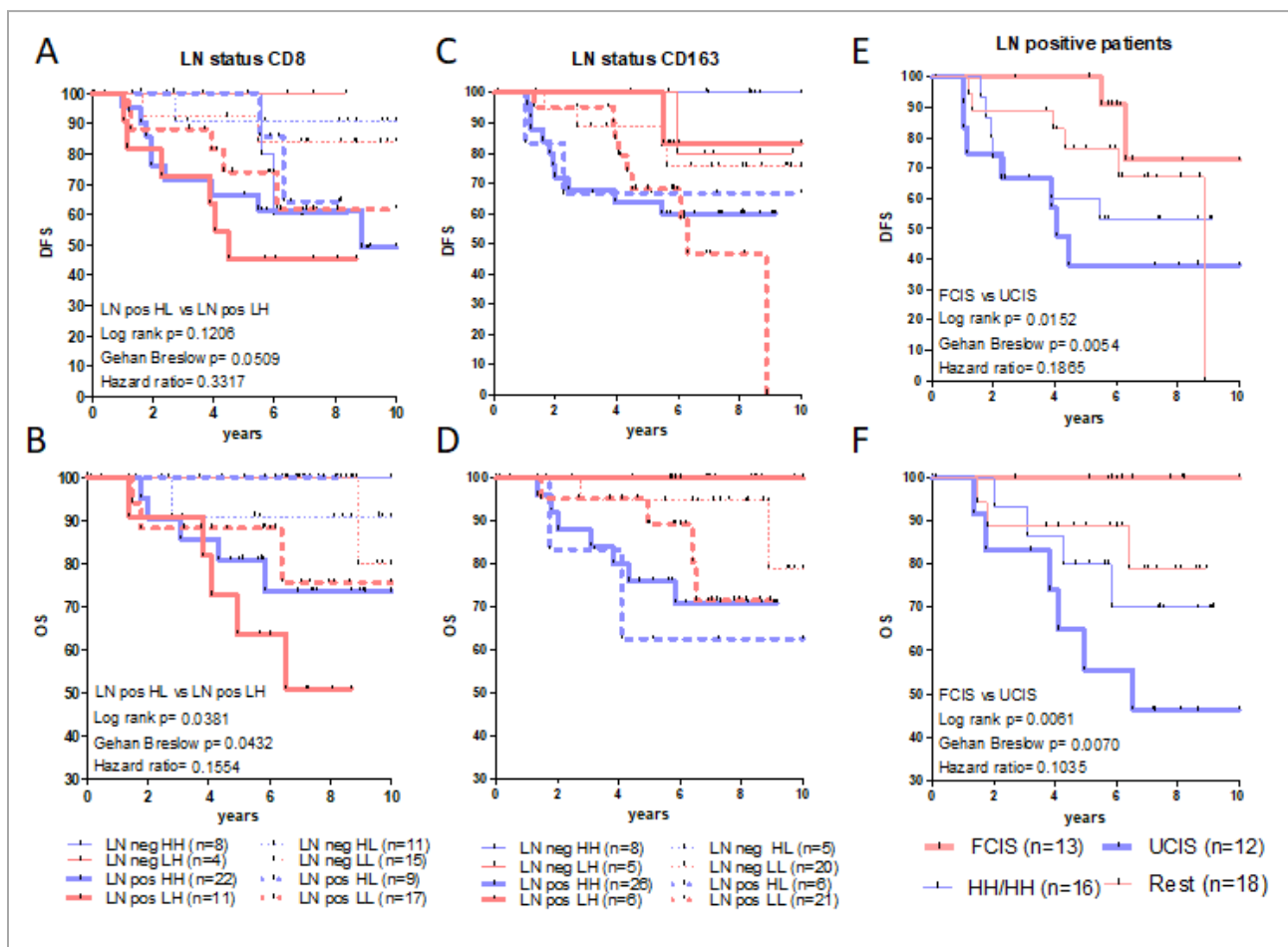
Ακολούθησε ανάλυση για το μέγεθος του όγκου (Εικόνα 4-8). Ασθενείς με T2, T3 μέγεθος όγκου και FCIS υπογραφές έχουν ευνοϊκότερη κλινική έκβαση από αυτούς που φέρουν τις UCIS υπογραφές. Συγκεκριμένα, σημαντικά καλύτερη ελεύθερη νόσου

επιβίωση (C) και συνολική επιβίωση (D) παρατηρείται στις ασθενείς με T2, T3 που χαρακτηρίζονται από FCIS σε σχέση με εκείνους που χαρακτηρίζονται από UCIS.



Εικόνα 4-8: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το μέγεθος του όγκου.

Τέλος, ακολούθησε μια κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τη διήθηση των λεμφαδένων (LN status) (Εικόνα 4-9). Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες που φέρουν τις FCIS υπογραφές έχουν στατιστικά σημαντικότερη ελεύθερη νόσου (C) και συνολική επιβίωση (D) συγκριτικά με ασθενείς που φέρουν τις UCIS υπογραφές.



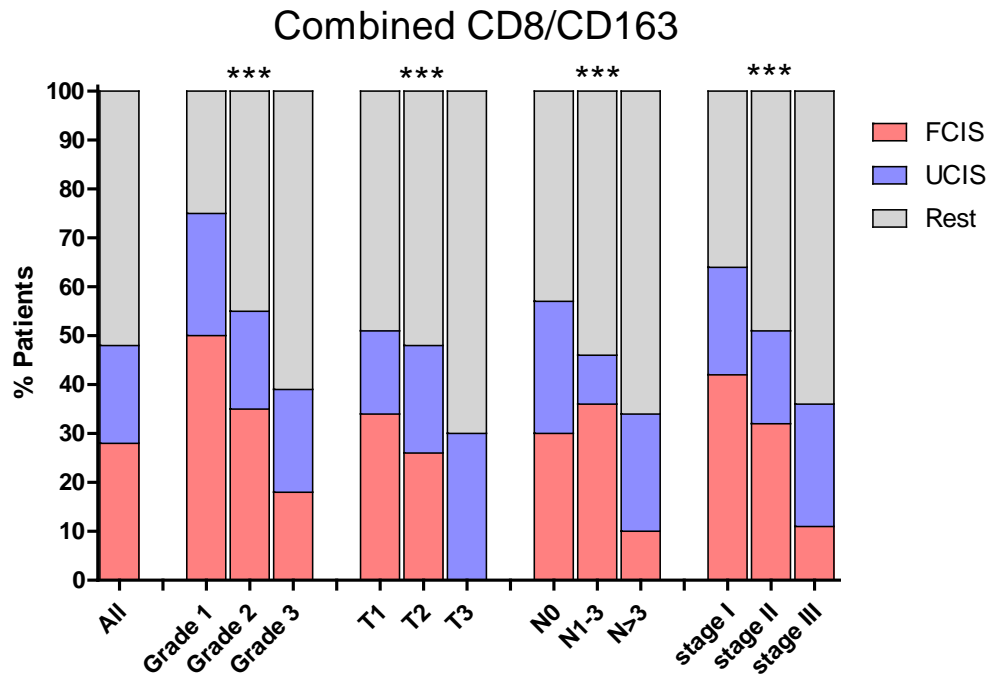
Εικόνα 4-9: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με τη διήθηση των λεμφαδένων

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν αναλυτικά παραπάνω, όσον αφορά το βαθμό διαφοροποίησης (Grade), το μέγεθος του όγκου (T stage), τη διήθηση των λεμφαδένων (LN status) και το στάδιο κατά TNM συνοψίζονται στην Εικόνα 4-10. Διαπιστώνουμε ότι η FCIS υπογραφή συσχετίζεται έντονα με μια ευνοϊκή πρόγνωση ανεξάρτητα από τα εγκαθιδρυμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Αντιστρόφως, η UCIS υπογραφή συσχετίζεται πάντοτε με μια κακή πρόγνωση στις ομάδες ασθενών με τα χειρότερα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (Grade 3, T2,3, LNpos & Advanced Stage). Τα στατιστικά των συγκρίσεων τόσο για το DFS όσο και για το OS με ευνοϊκές και δυσμενείς υπογραφές στις ομάδες ασθενών ανάλογα με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά παρατίθενται στον Πίνακα 4-2.

Πίνακας 4-2: Συγκρίσεις DFS και OS βάσει ευνοϊκών και δυσμενών υπογραφών σε ομάδες ασθενών ανάλογα με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους.

DFS and OS comparisons in stratified groups of patients with favorable and unfavorable signatures									
Groups compared	DFS				OS				
	Hazard Ratio	95% CI of ratio	Log rank p	Gehan Breslow p	Hazard Ratio	95% CI of ratio	Log rank p	Gehan Breslow p	
Grade 3 FCIS vs UCIS	0.2095	0.03457 to 1.270	0.0891	0.0719	0.1438	0.01995 to 1.036	0.0543	0.0589	
FCIS Grade 3 vs Grade 1,2	1.604	0.1247 to 20.63	0.717	0.6238	0.2931	0.001887 to 45.53	0.6336	0.6336	
T2,3 status FCIS vs UCIS	0.1924	0.04993 to 0.7417	0.0167	0.0139	0.2015	0.04510 to 0.9000	0.0359	0.0462	
FCIS T2,3 vs T1	1.684	0.2194 to 12.92	0.6162	0.3775	9.488	0.1837 to 490.0	0.2636	0.2636	
LN _{pos} FCIS vs UCIS	0.1865	0.04807 to 0.7233	0.0152	0.0054	0.1035	0.02048 to 0.5231	0.0061	0.0070	
FCIS LN _{pos} vs LN _{neg}	1.375	0.1876 to 10.08	0.754	0.9229	0.1653	0.003201 to 8.537	0.3711	0.3711	
Advanced stage FCIS vs UCIS	0.1854	0.04531 to 0.7587	0.0191	0.0155	0.1584	0.02981 to 0.8417	0.0306	0.0336	
FCIS Adv. stage vs Early stage	3.369	0.1545 to 73.43	0.4399	0.2995	0	0 to 0	1	1	

Στο διάγραμμα που παρατίθεται (Εικόνα 4-11) απεικονίζονται τα ποσοστά στο σύνολο των ασθενών ανάλογα με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που φέρουν FCIS και UCIS υπογραφές. Αξίζει να σημειώσουμε πως υπάρχει αντίστροφη σχέση των ποσοστών των ασθενών που φέρουν τις FCIS υπογραφές και δυσμενών κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών.



Εικόνα 4-11: Ποσοστά ασθενών που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

4.3.3 ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ «ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ»

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυπαραμετρική ανάλυση για τον έλεγχο των υπογραφών ως ανεξάρτητων προγνωστικών δεικτών στον BCa σε σύγκριση με κλασικές παραμέτρους, όπως η ηλικία, ο βαθμός διαφοροποίησης, το T & N στάδιο, οι ορμονικοί υποδοχείς και το HER2/neu. Δείξαμε ότι οι υπογραφές παίζουν σημαντικό ρόλο για την ελεύθερη νόσου επιβίωση ($p=0.041$, $HR=2.063$) και συνολική επιβίωση ($p=0.014$, $HR=4.850$). Αφαιρώντας σταδιακά παράγοντες που υπολογίστηκαν στο αρχικό μοντέλο, δημιουργήσαμε ένα μοντέλο που περιλαμβάνει τις υπογραφές, το T στάδιο και τους ορμονικούς υποδοχείς. Αυτή τη φορά, παρατηρείται καλύτερη στατιστική συσχέτιση (DFS: $p=0.027$, $HR=2.146$; OS: $p=0.006$, $HR=4.273$) και επιβεβαιώνεται η χρήση των υπογραφών ως πιθανών προγνωστικών δεικτών. Στο τελευταίο μοντέλο υπάρχει μόνο το εγκαθιδρυμένο TNM stage και οι υπογραφές (DFS: $p=0.138$, $HR=1.560$; OS: $p=0.091$, $HR=2.085$), όπου φαίνεται ότι σε αυτό τον σχετικά μικρό αριθμό ασθενών που εξετάστηκαν, το TNM από μόνο του εξακολουθεί να έχει καλύτερη προγνωστική δυνατότητα από τις μεμονωμένες συγκεκριμένες υπογραφές. Συνοπτικά, υψηλά CD8+ κύτταρα στο TC και χαμηλά στο IM και το αντίστροφο προφίλ (χαμηλά CD163+ κύτταρα στο TC και υψηλά στο IM) βρέθηκαν να συνδέονται με καλύτερη κλινική έκβαση και επέτρεψαν καλύτερη κατηγοριοποίηση των ασθενών από τα εγκαθιδρυμένα μεμονωμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Η συνδυαστική αξιολόγηση της πυκνότητας των CD8+ και CD163+ κυττάρων στο TC και στο IM επέτρεψε την δημιουργία «υπογραφών» που μπορούν να αποτελούν, υπό προϋποθέσεις, ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη στον BCa.

Πίνακας 4-3: Αναλογική παλινδρόμηση κινδύνου Cox (Multivariate Cox proportional hazard analysis) για DFS και OS σε ασθενείς με διηθητικό, μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού

	DFS			OS		
	Hazard Ratio	P	95.0% CI for HR (range)	Hazard Ratio	P	95.0% CI for HR (range)
TNM stage ^b	2.180	0.009	1.219–3.898	3.937	0.006	1.494–10.371
Signatures ^b	1.560	0.138	0.866–2.810	2.085	0.091	0.889–4.890
Model before stepwise selection						
Age ^a	1.031	0.948	0.411–2.589	4.391	0.188	0.486–39.703
T status ^b	2.613	0.010	1.255–5.439	3.679	0.028	1.148–11.793
N stage ^b	1.222	0.512	0.671–2.225	1.125	0.815	0.420–3.010
Grade ^b	1.142	0.750	0.504–2.585	4.189	0.027	1.180–14.867
HER-2/neu	0.928	0.884	0.342–2.520	0.066	0.016	0.007–0.606
Hormone Receptors	0.277	0.004	0.277–0.669	0.168	0.007	0.046–0.621
Signatures ^b	2.063	0.041	1.031–4.126	4.850	0.014	1.374–17.122
Model after stepwise selection						
T status ^b	2.999	0.001	1.602–5.615	3.522	0.005	1.477–8.398
Hormone Receptors	0.269	0.002	0.116–0.621	0.231	0.014	0.072–0.742
Signatures ^b	2.146	0.027	1.091–4.219	4.273	0.006	1.521–11.999

^aAge under 50 and over 50 years old
^bAll categorical covariates were transformed into numeric codes as follows : T status (T1: 1, T2: 2, T3: 3), N stage (N0: 0, N1: 1, N2: 2, N3: 3), Grade (G1: 1, G2: 2, G3: 3), Signatures (FOIS: 1, Rest: 2, UCIS: 3) TNM stage (I: 1, II: 2, III: 3)

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΟΠΤΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

4.4.1 ΔΙΗΘΗΣΗ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

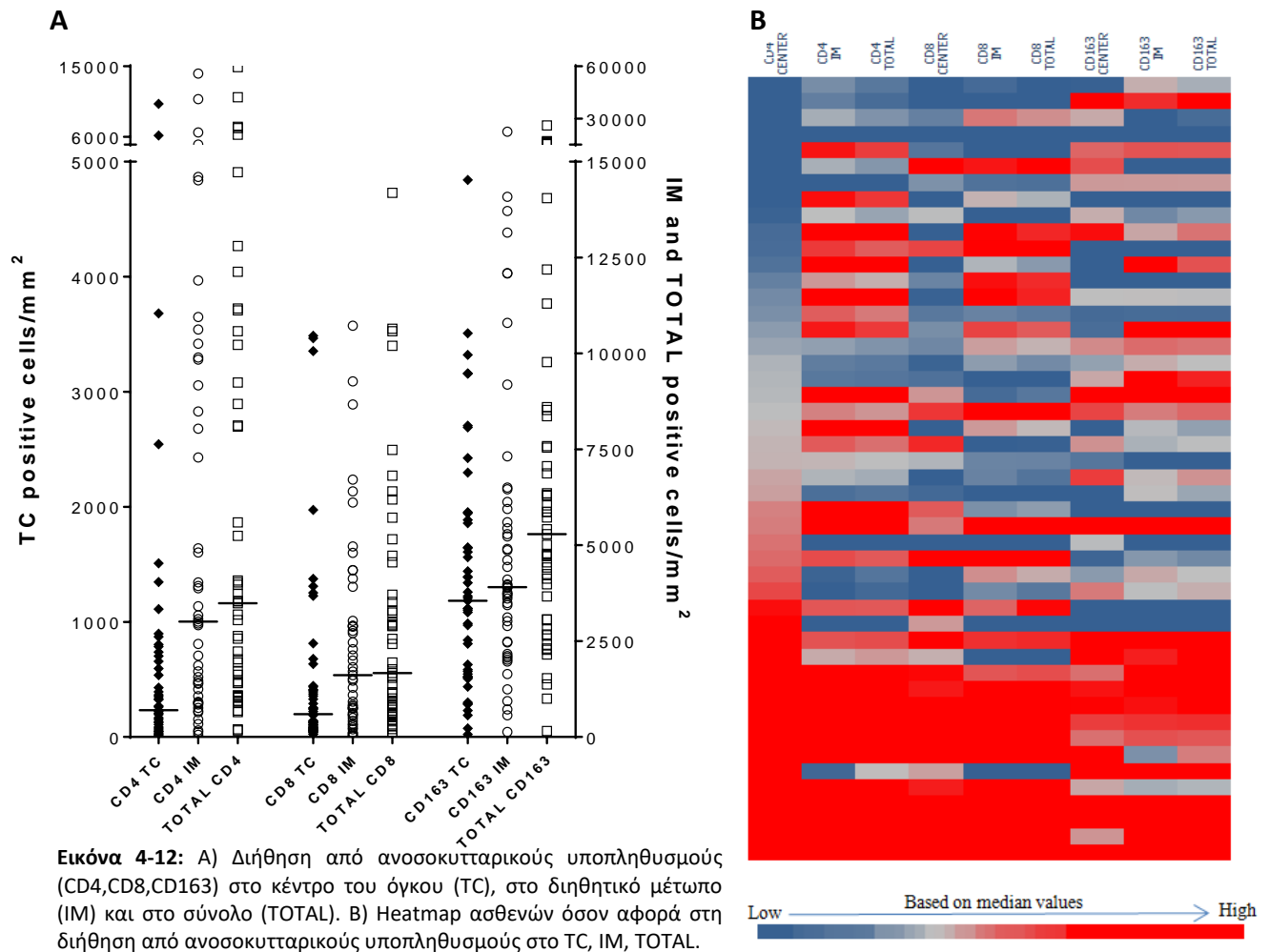
Στην συνολική μελέτη, όπως προαναφέραμε, διερευνήσαμε εκτενώς την πυκνότητα και τη χωροταξική κατανομή των ανοσοκυττάρων που διηθούν τον όγκο, συγκεκριμένα των CD8+ και CD163+ κυττάρων, σε 162 ασθενείς με μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού, τα οποία έχουμε ήδη δημοσιεύσει [397] [397]. Για 97 από αυτές, ήταν διαθέσιμα στοιχεία από την κλινική παρακολούθηση, καθιστώντας δυνατή την καθιέρωση υπογραφών που δημιουργήθηκαν συνδυάζοντας τον τύπο, την χωροταξική κατανομή και τον βαθμό διήθησης των κυττάρων αυτών στον όγκο σε συνάρτηση με το κλινικό αποτέλεσμα, εισάγοντας έτσι μια νέα προγνωστική ανοσολογική υπογραφή (κεφ. 4.3.2). Για 48 από τις 162 ασθενείς που ανήκουν στο προοπτικό τμήμα της μελέτης, ήταν διαθέσιμος ορός και PBMCs, που συλλέχθηκαν μια ημέρα πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4-4.

* Ασθενείς σταδίου IIIB ασθενείς δεν εισήχθησαν στην μελέτη

Total Number of Patients	
n=48	
Median age (years)	Range
56	27-78
Tumor size	n
T1	20
T2	25
T3	3
LN status	n
N0	19
N1	16
N2	11
N3	2
AJCC stage (TNM)	n
I	14
IIA	10
IIB	11
IIIA	12
IIIB*	0
IIIC	1
Grade	n
1	0
2	25
3	23
Hormone receptor	n
positive	40
negative	8
HER-2/neu	n
positive	15
negative	33
Ki67	n
<20%	24
≥20%	24
Immune Signature	n
FCIS	13
UCIS	11
Rest	24

Πίνακας 4-4: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Σε αυτές τις ασθενείς, πέραν της διήθησης από CD8+ και CD163+ ανοσοκύτταρα, αξιολογήθηκαν επίσης τα CD4+ T κύτταρα (Εικόνα 4-12).

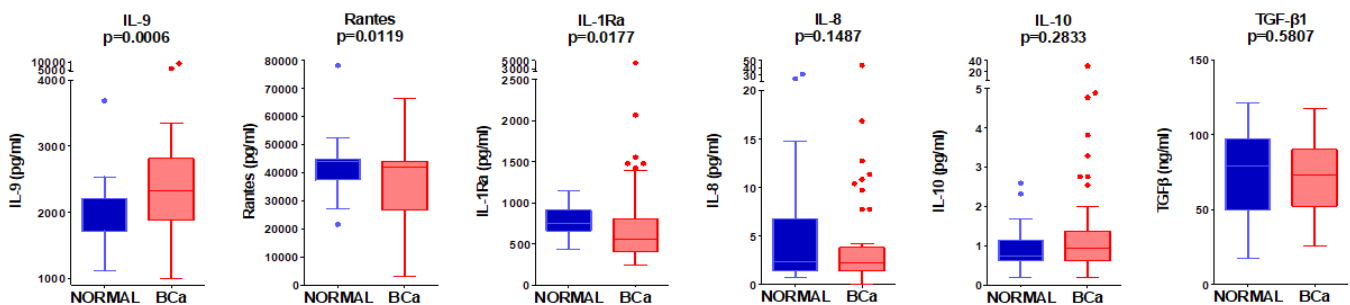


Εικόνα 4-12: Α) Διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (CD4,CD8,CD163) στο κέντρο του όγκου (TC), στο διηθητικό μέτωπο (IM) και στο σύνολο (TOTAL). Β) Heatmap ασθενών όσον αφορά στη διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς στο TC, IM, TOTAL.

Δεδομένου ότι ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης είναι να διαπιστωθεί εάν το μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως αντιπροσωπεύεται από τη διήθηση των ανοσοκυττάρων, θα μπορούσε να αντικατοπτρίζεται στη συστηματική κυκλοφορία, επιχειρήσαμε να βρούμε πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των κυκλοφορούντων παραγόντων που εξετάστηκαν (κυτταροκίνες/χημειοκίνες, miRNAs ορού και PBMCs). τόσο από τον ορό όσο και σε απομονωμένα PBMCs. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν στην κυκλοφορία, αξιολογήθηκαν και σε μια ομάδα υγιών δοτών.

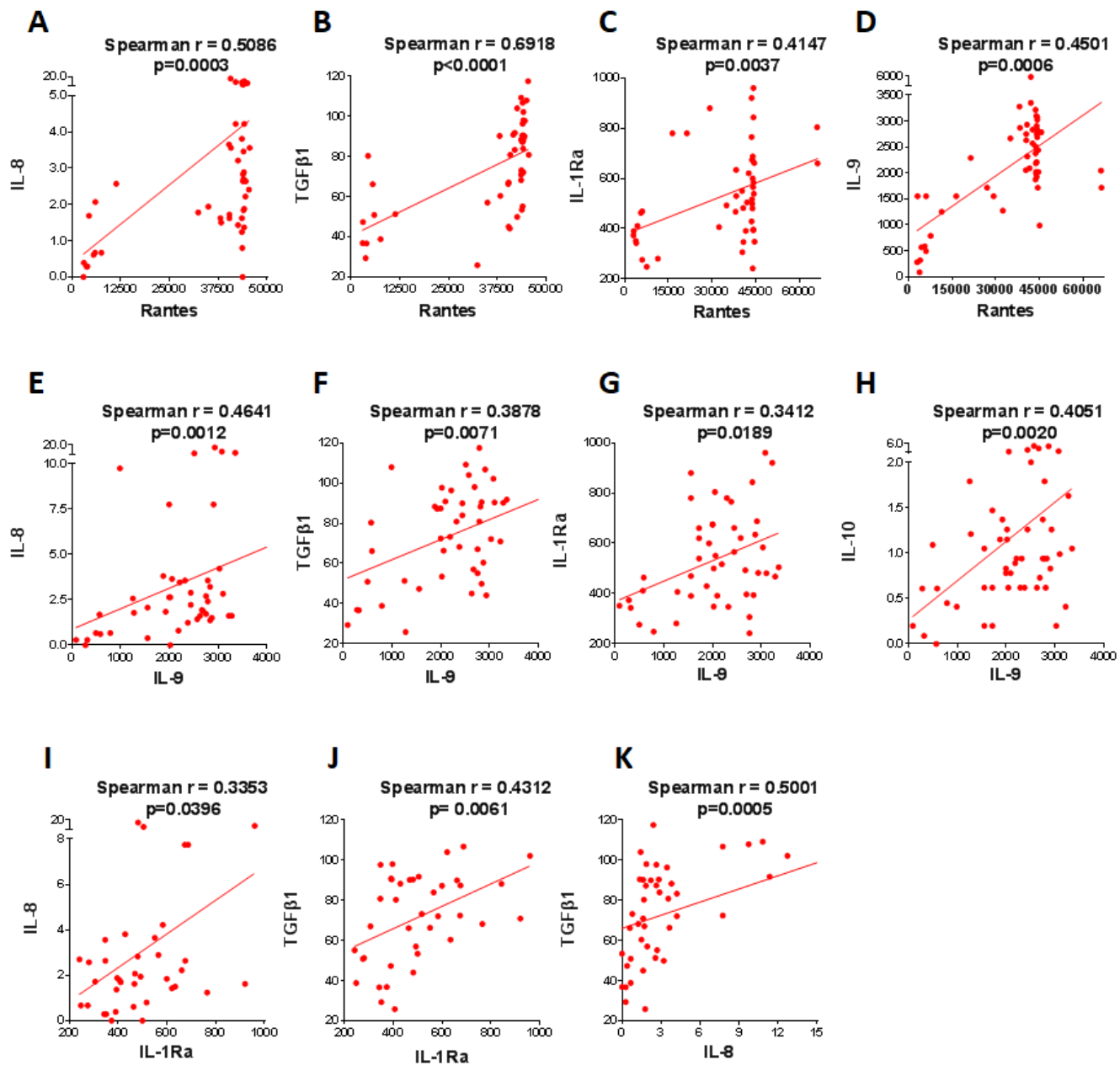
4.4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ/ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Όπως αναφέρθηκε, μετρήθηκαν διάφορες κυτταροκίνες/ χημειοκίνες στον ορό (Rantes, IL-8, IL-9, IL-10, IL-1Ra, TGF-β1) στον ορό ασθενών και υγιών δοτών. Οι IL-8, IL-10 και TGF-β1 δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών BCa και των υγιών δοτών. Οι Rantes και IL-1Ra ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με BCa. Αντίθετα, οι ασθενείς BCa είχαν υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούσας IL-9 (Εικόνα 4-13).

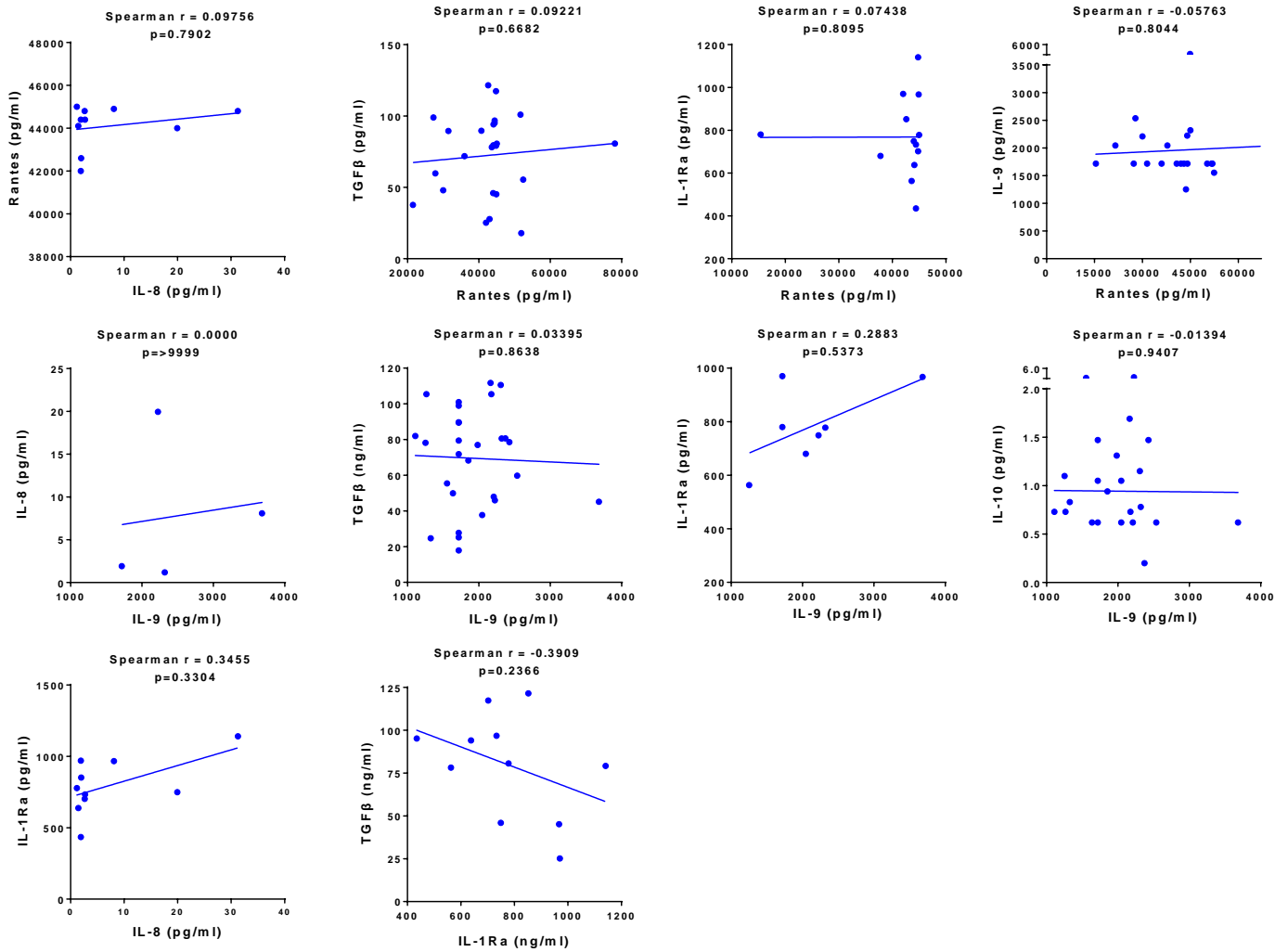


Εικόνα 4-13: Επίπεδα έκφρασης κυτταροκινών/ χημειοκινών σε ασθενείς BCa και υγιείς δότες.

Είναι ενδιαφέρον ότι υπήρχαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των κυτταροκινών/ χημειοκινών στους ασθενείς με BCa (Εικόνα 4-14), οι οποίες δεν παρατηρούνται σε υγιείς δότες (Εικόνα 4-15). Μια ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ Rantes και IL-9 (Εικόνα 4-14D), η οποία αντανακλάται επίσης στην αμοιβαία συσχέτιση κάθε παράγοντα με IL-8 (Σχήματα 4-14A και E), TGF-β1 (Εικόνα 4-14B και F) και IL -1Ra (Σχήματα 4-14C και G), αντίστοιχα. Για τις IL-10 και Rantes υπήρξε επίσης μια τάση ($p=0.0786$, δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η IL-8, πέραν των Rantes και IL-9, επίσης συσχετίζεται έντονα με τον TGF-β1 (Σχήμα 4-14K) και λιγότερο έντονα (αν και στατιστικά σημαντικά) με IL-1Ra (Εικόνα 4-14I).



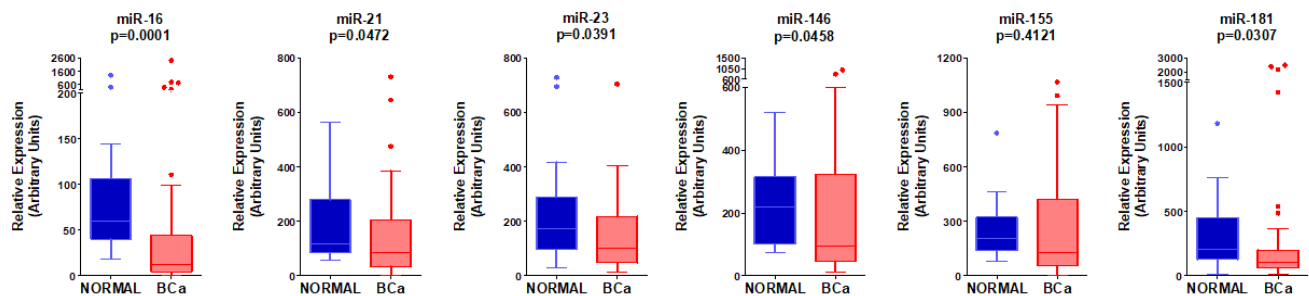
Εικόνα 4-14: Συσχετίσεις κυτταροκινών/ χημειοκινών σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.



Εικόνα 4-15: Συσχετίσεις κυτταροκινών/ χημειοκινών σε υγιείς δότες.

4.4.3 miRNAs ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΩΝ

Όσον αφορά στα miRNAs του ορού, με εξαίρεση το miR-155, δείξαμε στατιστικά σημαντική χαμηλότερη σχετική έκφραση στο σύνολο των ασθενών BCa συγκριτικά με την ομάδα των υγιών δοτών (Εικόνα 4-16). Συγκεκριμένα, το miR-16 εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα των υγιών δοτών σε σχέση με τις ασθενείς ($p=0.0001$), όπως και το miR-21 ($p=0.0472$), το miR-23 ($p=0.0391$), το miR-146 ($p=0.0458$) και miR-181 ($p=0.0307$). Ωστόσο, παρατηρήθηκαν μερικές ασθενείς που έχουν σαφώς υψηλά επίπεδα έκφρασης των miRNAs.



Εικόνα 4-16: Σχετικά επίπεδα έκφρασης miRNAs απο ορό ασθενών αλλά και υγιών δοτών.

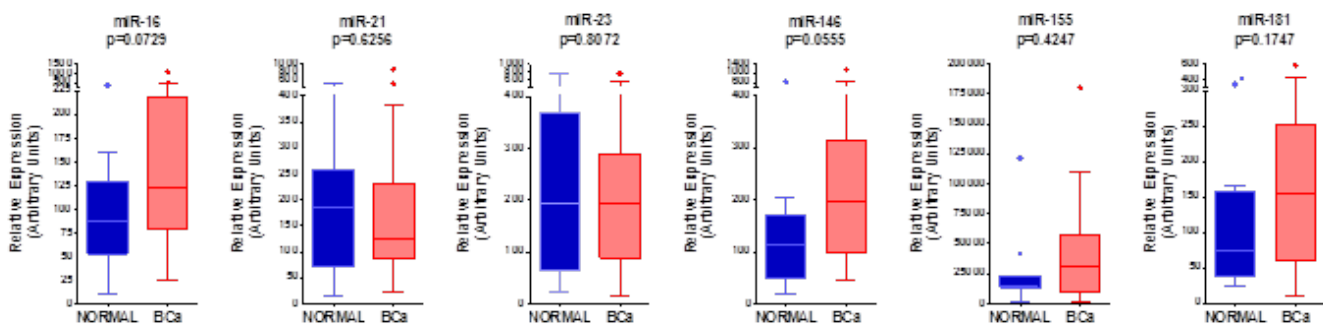
Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε αν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των miRNAs που ανιχνεύθηκαν στον ορό. Παρατηρήθηκαν ισχυρές συσχετίσεις για τα περισσότερα miRNAs, με εξαίρεση το miR-155 που δεν συσχετίζεται με το miR-181 (Πίνακας 4-5).

Πίνακας 4-5: Συσχετίσεις των miRNAs από τον ορό ασθνών με καρκίνο του μαστού.

Serum	miR-16	miR-21	miR-23	miR-146	miR-155	miR-181
miR-16	-	Spearman $r=0.4462$ $P=0.0027$ **	Spearman $r=0.6663$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.7012$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.4444$ $P=0.0032$ **	Spearman $r=0.3726$ $P=0.0195$ *
miR-21	Spearman $r=0.4462$ $P=0.0027$ **	-	Spearman $r=0.7826$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.7793$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.4894$ $P=0.0010$ **	Spearman $r=0.3841$ $P=0.0144$ *
miR-23	Spearman $r=0.6663$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.7826$ $P<0.0001$ ***	-	Spearman $r=0.8570$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.6420$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.3835$ $P=0.0160$ *
miR-146	Spearman $r=0.7012$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.7793$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8570$ $P<0.0001$ ***	-	Spearman $r=0.4383$ $P=0.0029$ **	Spearman $r=0.4102$ $P=0.0086$ **
miR-155	Spearman $r=0.4444$ $P=0.0032$ **	Spearman $r=0.4894$ $P=0.0010$ **	Spearman $r=0.6420$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.4383$ $P=0.0029$ **	-	Spearman $r=0.1659$ $P=0.3129$ ns
miR-181	Spearman $r=0.3726$ $P=0.0195$ *	Spearman $r=0.3841$ $P=0.0144$ *	Spearman $r=0.3835$ $P=0.0160$ *	Spearman $r=0.4102$ $P=0.0086$ **	Spearman $r=0.1659$ $P=0.3129$ ns	-

4.4.4 miRNAs ΑΠΟ PBMCS ΑΣΘΕΝΩΝ

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων miRNAs, αυτή την φορά όμως απομονώθηκαν από τα PBMCS των ασθενών. Στην Εικόνα 4-17 φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs που μελετώνται, συγκριτικά με την ομάδα των υγιών δοτών. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των miR-21, miR-23 και miR-155 μεταξύ ασθενών BCa και υγιών δοτών, σε αντίθεση με μια ισχυρή τάση για αυξημένα επίπεδα miR-16 και miR-146 και μία τάση για το miR181.



Εικόνα 4-17: Σχετικά επίπεδα έκφρασης miRNAs από PBMCS ασθενών αλλά και υγιών δοτών.

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε αν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των miRNAs που ανιχνεύθηκαν από τα PBMCS των ασθενών. Στον Πίνακα 4-6 που παρατίθεται, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των miRNAs. Παρατηρούνται ισχυρές συσχετίσεις για το σύνολο των miRNAs μεταξύ τους. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των miRNAs από τον ορό και από τα PBMCS.

Πίνακας 4-6: Συσχετίσεις των miRNAs από PBMCS ασθενών με καρκίνο του μαστού.

PBMCS	miR-16	miR-21	miR-23	miR-146	miR-155	miR-181
miR-16	-	Spearman $r=0.7219$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.7112$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8087$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.5824$ $P=0.0002$ ***	Spearman $r=0.7639$ $P<0.0001$ ***
miR-21	Spearman $r=0.7219$ $P<0.0001$ ***	-	Spearman $r=0.8615$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8451$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.6655$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.6088$ $P=0.0001$ ***
miR-23	Spearman $r=0.7112$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8615$ $P<0.0001$ ***	-	Spearman $r=0.8603$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8212$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.3835$ $P=0.6101$ ***
miR-146	Spearman $r=0.8087$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8451$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8603$ $P<0.0001$ ***	-	Spearman $r=0.8599$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.7692$ $P<0.0001$ ***
miR-155	Spearman $r=0.5824$ $P=0.0002$ ***	Spearman $r=0.6655$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8212$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.8599$ $P<0.0001$ ***	-	Spearman $r=0.6339$ $P<0.0001$ ***
miR-181	Spearman $r=0.7639$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.6088$ $P=0.0001$ ***	Spearman $r=0.6101$ $P=0.0160$ ***	Spearman $r=0.7692$ $P<0.0001$ ***	Spearman $r=0.6339$ $P<0.0001$ ***	-

Στόχος της μελέτης αυτής είναι να διερευνηθεί κατά πόσο τα miRNAs τόσο του ορού όσο και από τα PBMCs, καθώς και οι κυτταροκίνες/χημειοκίνες της συστηματικής κυκλοφορίας μπορούν, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, σε κάποιον βαθμό να αντικατοπτρίζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως αυτό έχει «χαρακτηριστεί» από τη διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Έτσι λοιπόν, ελέγχθηκαν τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των παραγόντων της κυκλοφορίας μεταξύ τους, αλλά και με τη διήθηση ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών στο κέντρο του όγκου αλλά και στο διηθητικό μέτωπο (Πίνακας 4-7).

A) miRNAs ορού και κυτταροκίνες/χημειοκίνες

miR-16	Rantes	p=0.0247	r=-0.3345
	IL-9	p=0.0126	r=-0.3691
	IL-1Ra	p=0.0254	r=-0.3330
	IL-8	p=0.0009	r=-0.4941
miR-23	IL-8	p=0.0124	r=-0.4019
miR-146	Rantes	p=0.0079	r=-0.4091
	IL-9	p<0.0001	r=-0.5456
	IL-1Ra	p=0.0004	r=-0.4880
	IL-8	p<0.0001	r=-0.5929

B) miRNAs από PBMCs και κυτταροκίνες/χημειοκίνες

IL-9	miR-21	p=0.0030	r=-0.4398
	miR-23	p=0.0240	r=-0.5029
	miR-146	p=0.0012	r=-0.5305
	miR-155	p=0.0102	r=-0.4348
	miR-181	p=0.0276	r=-0.3778

Γ) miRNAs ορού και διηθούμενες ανοσοκυτταρικοί υποπληθυσμοί

miR-16	CD8 IM	p=0.0116	r=0.3729
	CD8 total	p=0.0125	r=0.3694
miR-21	CD4 TC	p=0.0281	r=0.3351
	CD8 total	p=0.0401	r=0.3143
miR-23	CD4 TC	p=0.0161	r=0.3737
	CD8 IM	p=0.0041	r=0.4384
	CD8 total	p=0.0038	r=0.4420
miR-146	CD4 IM	p=0.0190	r=0.3376
	CD4 total	p=0.0242	r=0.3249
	CD8 IM	p=0.0092	r=0.3723
	CD8 total	p=0.0060	r=0.3909
miR-181	CD4 TC	p=0.0057	r=0.4344
	CD8 TC	p=0.0005	r=0.5333
	CD8 IM	p=0.0002	r=0.5575
	CD8 total	p=0.0002	r=0.5657

Πίνακας 4-7: Συσχετίσεις παραγόντων της κυκλοφορίας μεταξύ τους αλλά και με την διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. A) miRNAs ορού και συσχετίσεις με κυτταροκίνες/χημειοκίνες, B) miRNAs από PBMCs και συσχετίσεις με κυτταροκίνες/χημειοκίνες, Γ) miRNAs ορού και συσχετίσεις με διηθούμενες ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.

4.4.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΟΜΑΔΩΝ-CLUSTERS

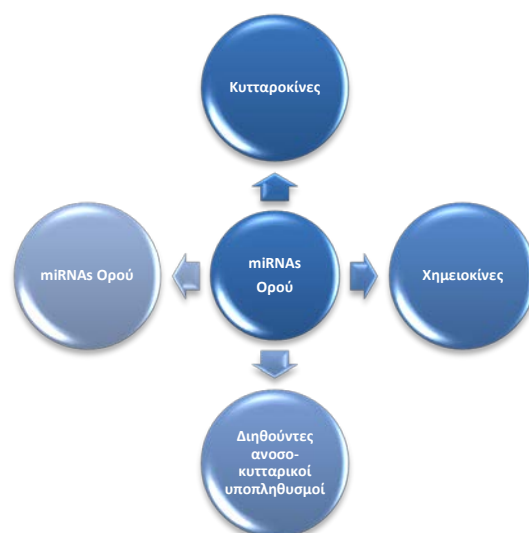
Από τις συσχετίσεις που ελέγχθηκαν από τους παράγοντες της συστηματικής κυκλοφορίας, τα miRNAs του ορού ήταν αυτά που παρουσίασαν τις περισσότερες συσχετίσεις με τους άλλους παράγοντες της κυκλοφορίας (κυτταροκίνες/χημειοκίνες και τα υπόλοιπα miRNAs από ορό) αλλά και με διηθούντες ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (Εικόνα 4-18).

Έτσι λοιπόν, εστίασαμε την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας στα miRNAs του ορού.

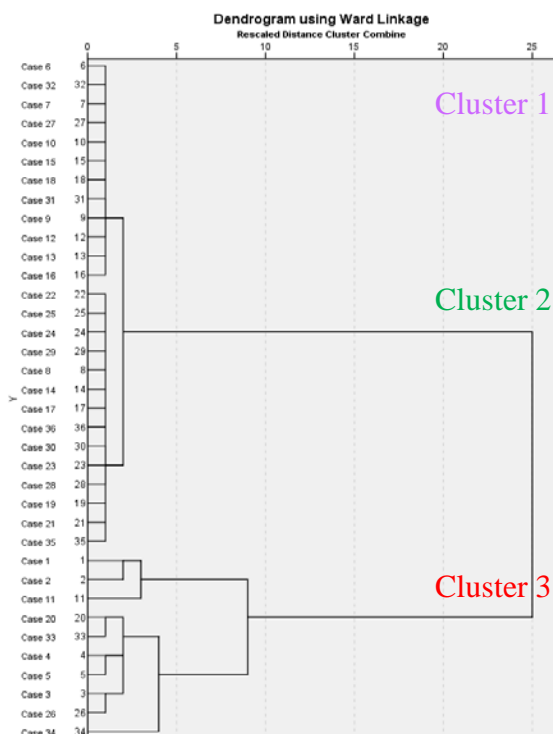
Αρχικά, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις

ξεχωριστές ομάδες- συστάδες (clusters) μέσω ιεραρχικής συσταδοποίησης (hierarchical clustering) στο πρόγραμμα SPSS (Nearest neighbor και Ward's method), ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης και των 6 miRNAs του ορού (κανονικοποιημένες τιμές (τιμή (xi) /

διάμεσος (di)), για κάθε miRNA από 36 ασθενείς που είχαμε τιμές και για τα 6 miRNAs που μελετώνται (Εικόνα 4-19). Στις τρεις αυτές ομάδες παρατηρούνται διακριτές διαφορές συγκριτικά με τους υγιείς δότες (Εικόνα 4-20), καθώς και διαφορετικές συσχετίσεις με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν στην συνέχεια.

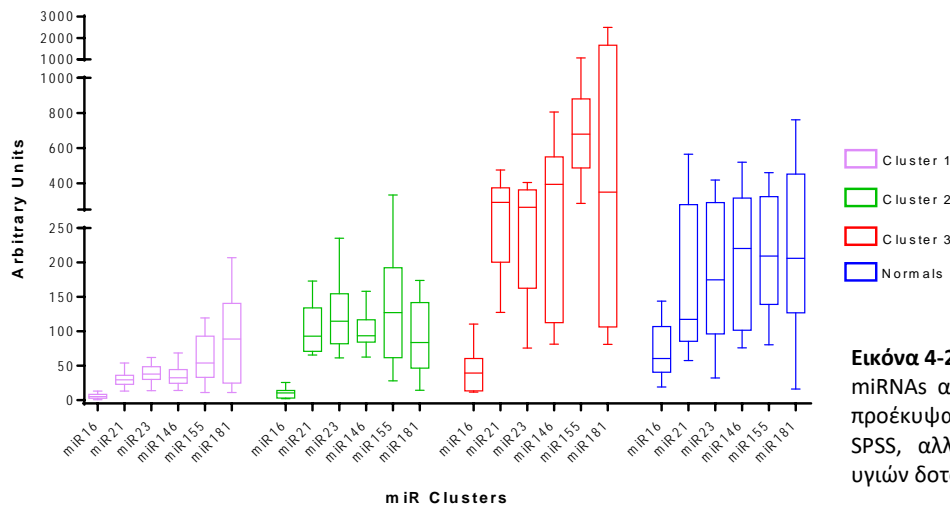


Εικόνα 4-18: Σχηματική παρουσίαση των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των miRNAs από τον ορό και παραγόντων της κυκλοφορίας και του όγκου.



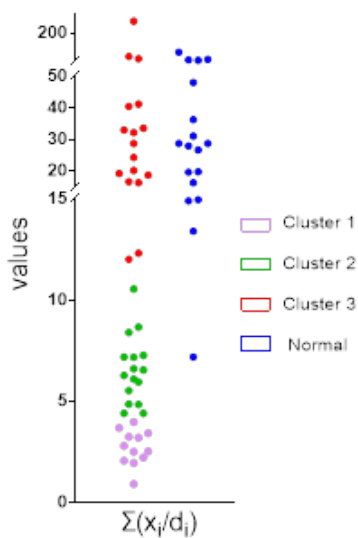
Εικόνα 4-19: Δενδρόγραμμα δημιουργίας ομάδων βάσει επιπέδων έκφρασης miRNAs από τον ορό ασθενών.

Η συστάδα 1 (Cluster 1) αποτελείται από ασθενείς με ομοιόμορφα χαμηλά επίπεδα έκφρασης miRNA, ενώ στη συστάδα δύο (Cluster 2), αν και η ομοιομορφία σχεδόν διατηρείται, τα miRNAs των ασθενών παρουσιάζουν μέτρια επίπεδα έκφρασης. Τέλος, η τρίτη συστάδα (Cluster 3) περιλαμβάνει τις ασθενείς με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης miRNA, αλλά όχι με ένα ομοιόμορφο πρότυπο (Εικόνα 4-20).



Εικόνα 4-20: Επίπεδα έκφρασης των miRNAs ανά συστάδα, όπως αυτές προέκυψαν από το πρόγραμμα SPSS, αλλά και στην ομάδα των υγιών dotών.

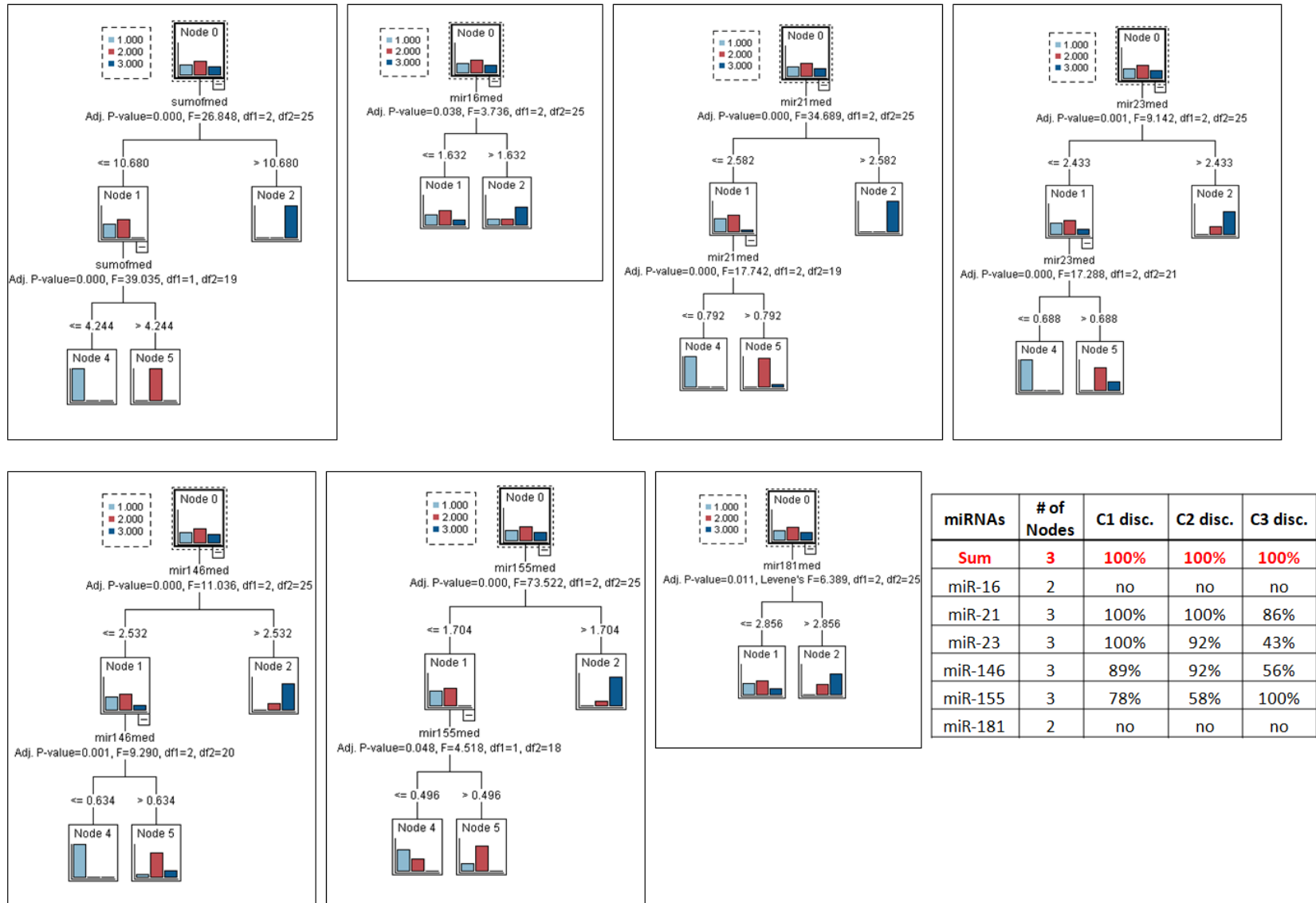
Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις προφανείς διαφορές μεταξύ των ομάδων που δημιουργήθηκαν, εξετάστηκε αν το άθροισμα των μεμονωμένων τιμών του κάθε miRNA (τιμές x_i / d_i , του κάθε ασθενή), θα μπορούσε να διακρίνει τις ασθενείς μεταξύ των ομάδων.



Εικόνα 4-21: Άθροισμα λόγων miRNAs και όρια κάθε μιας από τις ομάδες που δημιουργήθηκαν.

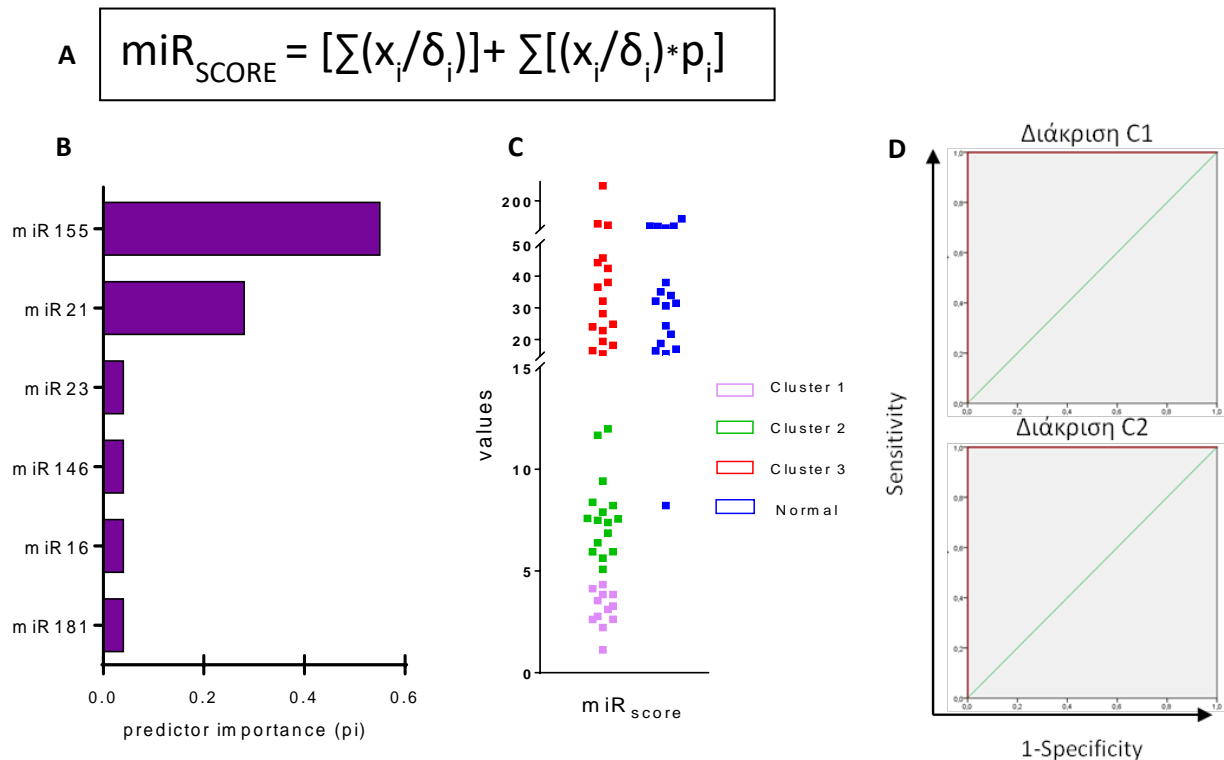
Χρησιμοποιώντας την ταξινόμηση QUEST στο πρόγραμμα IBM SPSS Modeler 18.1 για τον υπολογισμό του δυναμικού πρόβλεψης του αθροίσματος, καθώς και των μεμονωμένων αναλογιών x_i/d_i για κάθε ένα από τα 6 miRNA διαπιστώσαμε ότι μόνο το άθροισμα των λόγων $\Sigma(x_i/d_i)$ (Εικόνα 4-21), θα μπορούσε να προβλέψει την ταξινόμηση κάθε ασθενούς στη σωστή συστάδα, αν και τα ανώτερα και κατώτερα όρια μεταξύ των ομάδων δεν ήταν σαφώς διακριτά (Εικόνα 4-22).

Individual distinctive capability of each parameter by QUEST classification



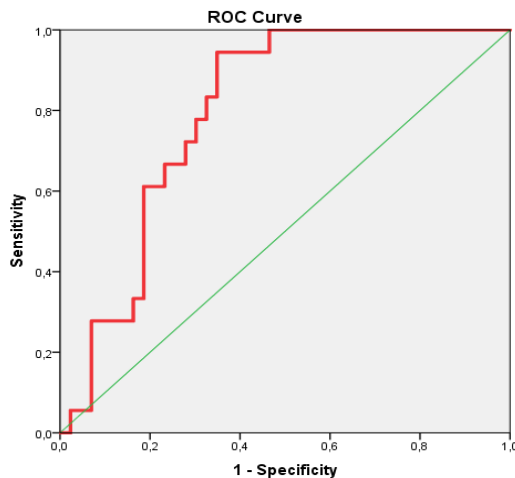
Εικόνα 4-22: Υπολογισμός του δυναμικού πρόβλεψης του αθροίσματος, καθώς και των μεμονωμένων αναλογιών χ^2 / δ_i για κάθε ένα από τα 6 miRNAs.

Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε με τη δημιουργία ενός αλγορίθμου, που ονομάστηκε miRSCORE (Εικόνα 4-23A), ενσωματώνοντας το δυναμικό πρόβλεψης των 6 miRNAs ξεχωριστά. Αυτό επιτεύχθηκε μετά από μια δεύτερη ταξινόμηση QUEST που περιλάμβανε και τους 6 προγνωστικούς παράγοντες, αποδίδοντας σε κάθε miRNA βαθμό σημαντικότητας στην πρόβλεψη. Κάθε παράγοντας σπουδαιότητας (Εικόνα 4-23B) πολλαπλασιάστηκε με τις αντίστοιχες τιμές miRNA x_i / δ_i και προστέθηκε στο άθροισμα των αναλογιών για κάθε ασθενή, με αποτέλεσμα την τελική διαμόρφωση του αλγορίθμου miRSCORE, με σαφώς βελτιωμένο διακριτικό δυναμικό μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 4-23C). Αυτό είναι ορατό μετά την πραγματοποίηση καμπυλών ROC. Αυτές μας δείχνουν πλήρη διάκριση του Cluster 1 από τα άλλα δύο (sensitivity=1, specificity=1) και μας δίνουν ένα όριο (threshold) για τη διάκριση C1 από το C2 (miRSCORE threshold^{C1C2}=4,71). Παρομοίως, το Cluster 2 διακρίνεται από το C3 (sensitivity=1, specificity=1) με miRSCORE threshold^{C2C3}=13,75 (Εικόνα 4-23D).



Εικόνα 4-23: (A) miRSCORE αλγόριθμος όπως προκύπτει από το άθροισμα των λόγων του εκάστοτε miRNA και λαμβάνοντας υπόψη τον παράγοντα σπουδαιότητας (B). ROC καμπύλες για την διάκριση των Cluster 1 και 2 (D).

Ένα ακόμα πλεονέκτημα του miRSCORE είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς με ελλείπουσες τιμές μπορούν να ταξινομηθούν με ασφάλεια ως ασθενείς C3 εάν το miRSCORE τους είναι υψηλότερο από το κατώτερο όριο του cluster 3. Οι υγιείς δότες, εκτός από έναν, βρίσκονται στην συστάδα 3, τόσο από την αρχική ιεράρχηση όσο και από τη βαθμολόγηση με το miRSCORE. Χρησιμοποιήσαμε ROC καμπύλη για να διερευνήσουμε

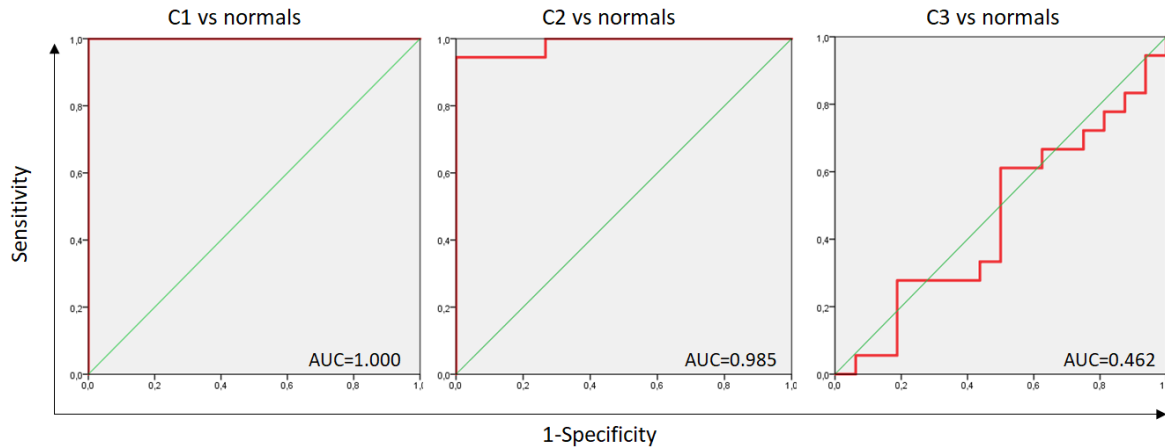


τον πιθανό διαγνωστικό ρόλο του αλγορίθμου μας. Στην Εικόνα 4-24 παρατίθεται η καμπύλη ROC για το σύνολο του δείγματος βασισμένο στις τιμές του αλγορίθμου για ασθενείς και υγιείς δότες. Με μία πρώτη ματιά φαίνεται να υπάρχει διαγνωστική αξία (AUC=0.795, 95% CI: 0.704-0.916) στο σύνολο των ασθενών.

Εικόνα 4-24: Καμπύλη ROC για το σύνολο των δειγμάτων.

Αν εξετάσουμε ξεχωριστά την διαγνωστική αξία της κάθε συστάδας όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο μας παρατηρούμε ότι υπάρχει απόλυτος διαχωρισμός των ασθενών του C1 και των υγιών δοτών (AUC= 1.000, sensitivity=1, specificity=1) και πάρα πολύ καλός διαχωρισμός των ασθενών του C2 και των υγιών δοτών (AUC=0.985, sensitivity=0.944, specificity=1). Αντιθέτως, δεν υπάρχει καμία διάκριση μεταξύ C3 και υγιών δοτών (AUC=0.462). Για πιθανή χρήση του αλγορίθμου στη διάγνωση, είναι απαραίτητος ο σαφής διαχωρισμός του cluster 3 από τα υπόλοιπα. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως όριο η τιμή που διαχωρίζει cluster 2 από cluster 3 (miRSCORE threshold^{C2C3}=13.75) και όχι το όριο που προκύπτει από το σημείο της καμπύλης με την βέλτιστη ευαισθησία και ειδικότητα κατά την συνολική ανάλυση του προς εξέταση δείγματος (threshold=15.53). Η επιλογή αυτής της τιμής ως όριο είναι λόγω της καλύτερης διάκρισης των δειγμάτων μεταξύ των cluster. Συγκεκριμένα, αν θέταμε το όριο στο 15.53 και όχι στο 13.75 που έχει τεθεί, συμπεριλαμβάνεται ένας επιπλέον ασθενής του cluster 3 με τιμή 15.51, στην ομάδα σωστής διάγνωσης. Μπορεί να χάνουμε σε ειδικότητα χρησιμοποιώντας το όριο 13.75

αλλά αποτελεί ένα πιο ασφαλές όριο δεδομένου του μικρού αριθμού δείγματος που έχουμε στη διάθεση μας.

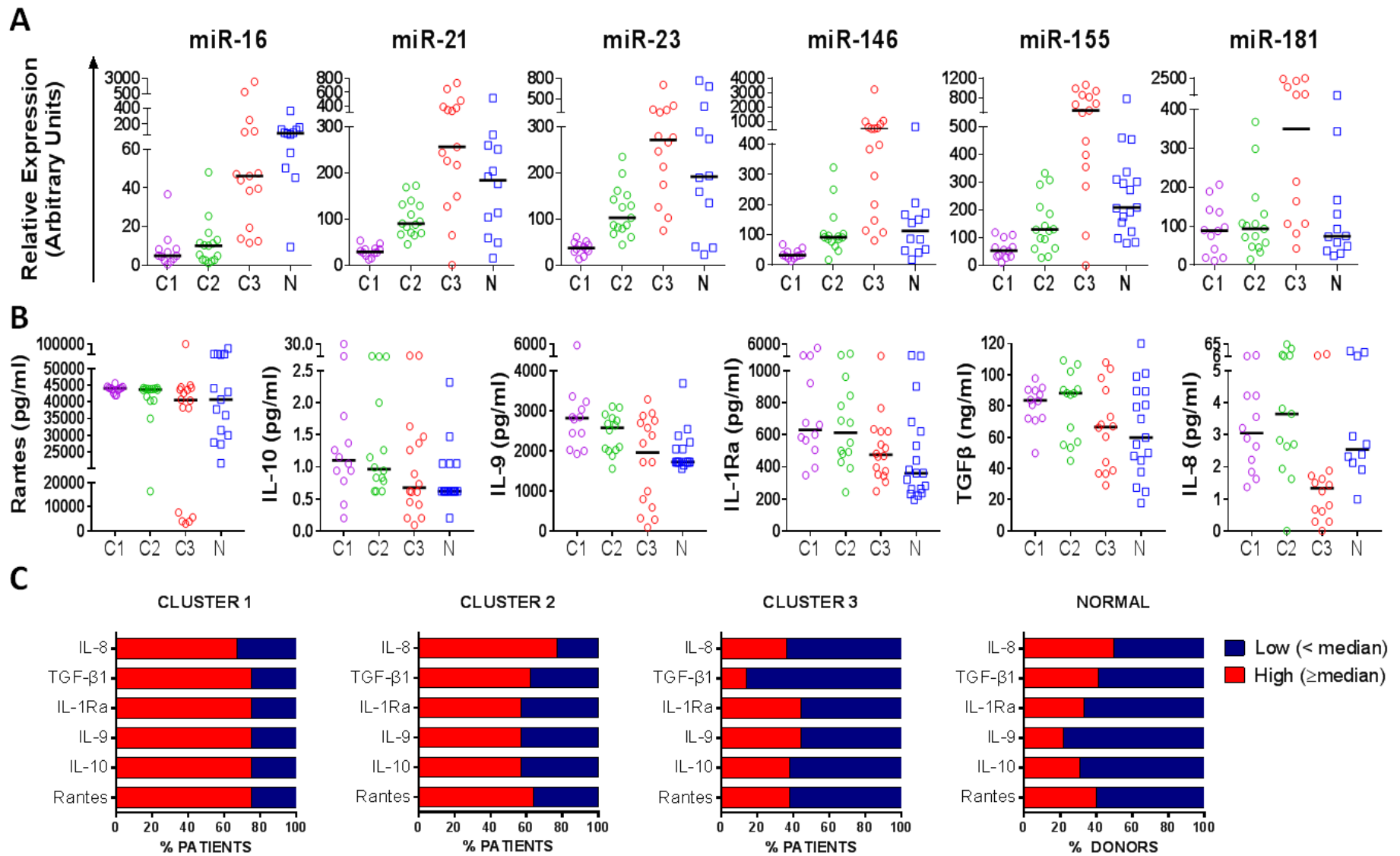


	AUC	AUC 95%CI	miRSCORE value for max sensitivity - min 1-specificity	Max sensitivity	Min 1-specificity	Youden Statistic (J)
C1	1.000	1.000-1.000	9.94	1.000	0.000	1.000
C2	0.985	0.952-1.000	13.77	0.944	0.000	0.944
C3	0.462	0.263-0.660	29.41	0.611	0.500	0.111

Εικόνα 4-25: Καμπύλες ROC για κάθε συστάδα/ cluster. Στον πίνακα παρατίθενται οι τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας και AUC.

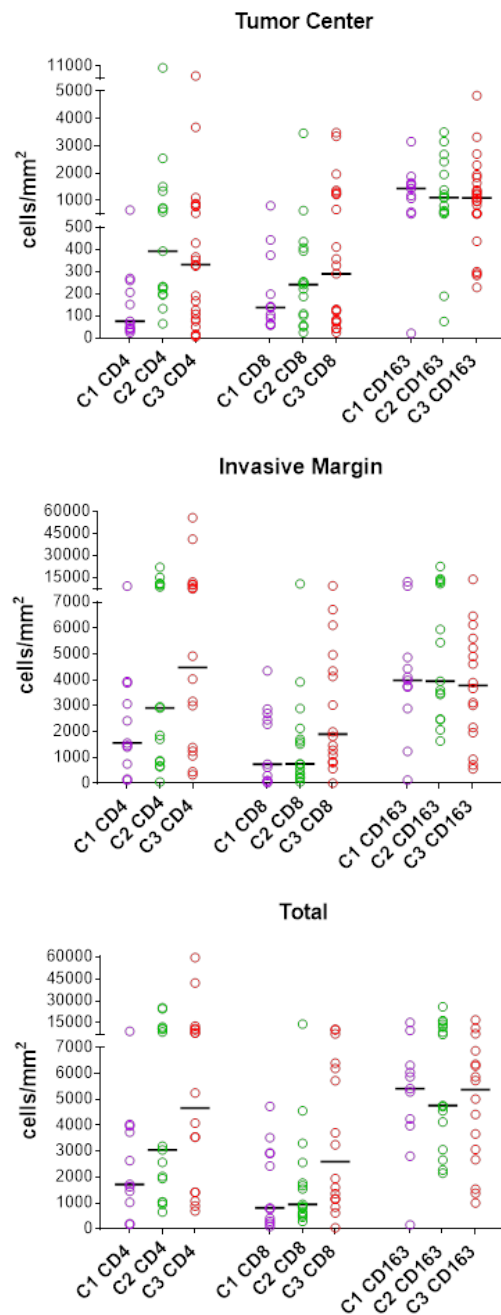
4.4.6 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ-CLUSTERS

Παρότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των miR146 ($p=0.0031$), miR155 ($p=0.0031$) και miR181 ($p=0.0083$) μεταξύ των υγιών δοτών και των ασθενών στο C3 (Εικόνα 4-26A), τα miR αυτά δεν μπορούν να διαχωρίσουν αυτές τις δύο ομάδες. Επιπλέον, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των συστάδων και των φυσιολογικών δοτών ως προς τα επίπεδα των κυτταροκινών στον ορό (Εικόνα 4-26B και 4-26C), με πιο εμφανή για την IL-9 ($p=0.0030$), IL-1Ra ($p=0.0153$) και IL-8 ($p=0.0058$). Ωστόσο, δεν ήταν δυνατό να δημιουργήσουμε κάποιο χαρακτηριστικό προφίλ που θα μπορούσε να βελτιώσει την υπάρχουσα ταξινόμηση όπως προκύπτει από το miRSCORE.



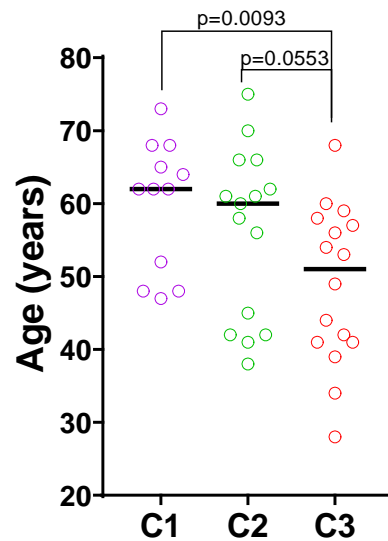
Εικόνα 4-26: Α) Επίπεδα έκφρασης miRNAs από ορό, Β) Επίπεδα έκφρασης κυτταροκινών/χημειοκινών ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού. Γ) Ποσοστά ασθενών με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα έκφρασης κυτταροκινών/χημειοκινών ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.

Δεδομένου ότι τα miRNAs και το ανοσοποιητικό σύστημα είναι στενά συνδεδεμένα, τα διακριτά προφίλ miRNA που ορίζουν τις τρεις ομάδες που δημιουργήθηκαν, μπορούν επίσης να συσχετιστούν με την ανοσολογική διήθηση του όγκου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-27, υπάρχουν μερικές διαφορές στη διήθηση από CD4+ και CD8+ T κύτταρα μεταξύ των ομάδων, με στατιστικά σημαντική διαφορά στο TC στην διήθηση από CD4+ κύτταρα μεταξύ C1 και C2 ($p=0.0054$), και με μία πολύ ισχυρή στατιστική τάση μεταξύ C1 και C3 ($p=0.0547$). Η διήθηση του όγκου από CD163+ κύτταρα δεν διαφέρει μεταξύ των ομάδων.



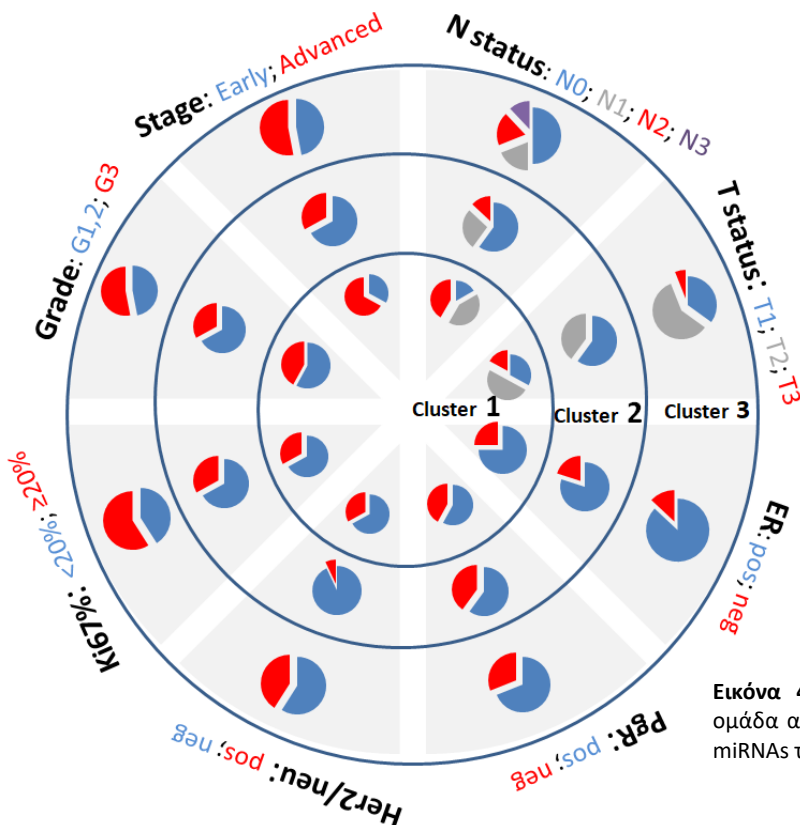
Εικόνα 4-27: Διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς κυττάρων ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.

Στην συνέχεια, στις ομάδες που προέκυψαν ύστερα από την ομαδοποίηση των miRNAs του ορού, τα οποία είτε σχετίζονται με τον ανοσοποιητικό σύστημα, με τον καρκίνο ή και με τα δύο, αναλύθηκαν οι ασθενείς ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 4-29). Με μια πρώτη ματιά οι ομάδες φαίνεται να διαφέρουν όσον αφορά την ηλικία (Εικόνα 4-28), με την συστάδα C3 να περιλαμβάνει κυρίως ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού σε μικρότερη ηλικία από τα C1 και C2 (Εικόνα 4-28). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πλειοψηφία (>60%) των ασθενών με υπογραφή miRNA C2 παρουσιάζουν ευνοϊκότερο προγνωστικό προφίλ σύμφωνα με τη σταδιοποίηση TNM, τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και το Ki67% (Εικόνα 4-27). Επιπλέον, η πλειοψηφία (93%) ασθενών της συστάδας C2 φαίνεται να είναι HER2/neu αρνητική. Δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές και στις 3 ομάδες σχετικά με τους υποδοχείς ορμονών ER ή/και PgR, που εκφράζουν οι όγκοι των ασθενών. Μεταξύ των ομάδων C1 και C3, υπάρχουν



Εικόνα 4-28: Ηλικίες ασθενών ανά ομάδα ασθενών.

περισσότεροι ασθενείς με επιθετική νόσο στην συστάδα C3, όπως αποδεικνύεται, εκτός από την νεότερη ηλικία, από τα αυξημένα ποσοστά ασθενών με λιγότερο διαφοροποιημένους (Grade 3) και με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (Ki67 > 20%) των καρκινικών κυττάρων (Πίνακας 4-8).

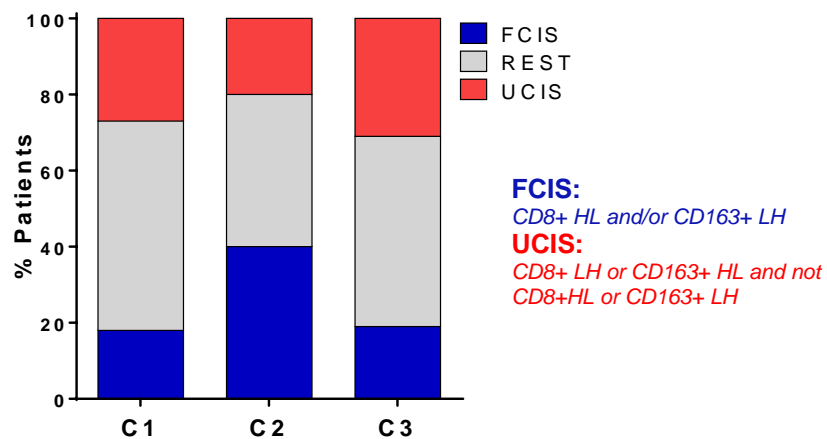


Εικόνα 4-29: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.

% patients	Tumor size			Nodal status				AJCC stage		Grade		HER2/neu		Estrogen Receptor		Progesterone Receptor		% Ki67	
	T1	T2	T3	N0	N1	N2	≥N3	Early (I,IIa)	Advanced (IIb,III)	G1,2	G3	negative	positive	positive	negative	positive	negative	≤20	>20
Cluster 1	33	50	17	17	42	43	0	33	67	58	42	67	33	75	25	58	42	67	33
Cluster 2	60	40	0	60	27	13	0	67	33	67	33	93	7	80	20	60	40	67	33
Cluster 3	35	59	6	50	19	19	12	47	53	47	53	59	41	87	13	69	31	41	59

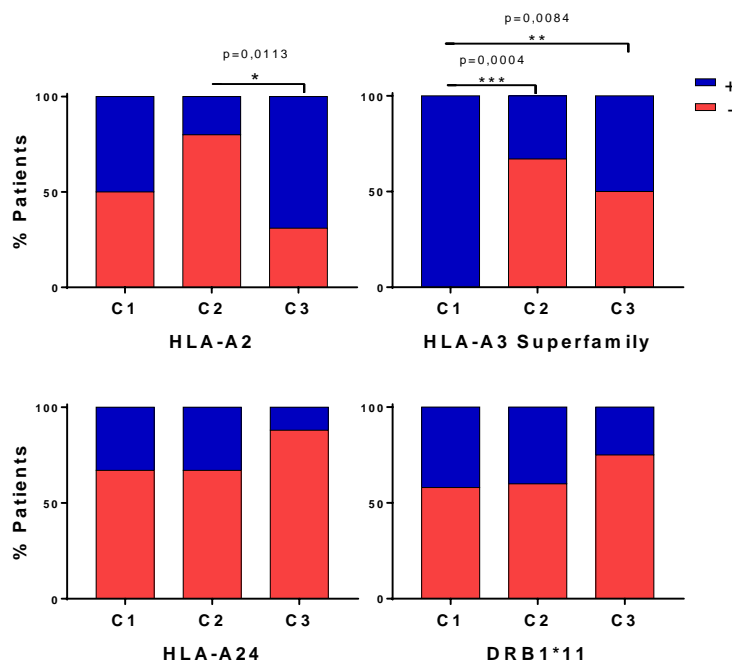
Πίνακας 4-8: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών ανά συστάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.

Βάσει του συνδυασμού της διήθησης CD8+ και CD163+ κυττάρων στο TC και στο IM, έχουμε προηγουμένως ορίσει μια ευνοϊκή υπογραφή (FCIS, με υψηλή (H) CD8+ κυτταρική διήθηση στο TC και χαμηλή (L) στο IM (δηλαδή CD8+ HL) ή / και CD163+ LH), μια δυσμενή (UCIS, CD8+ LH ή/και CD163+ HL και κανένα από τα καλά προφίλ, CD8+ HL ή CD163+ LH) και μια ομάδα όλων των άλλων συνδυασμών (REST). Αυτές οι συνδυασμένες υπογραφές σχετίζονταν με την κλινική έκβαση μιας αναδρομικά εκτιμημένης ομάδας 97 ασθενών (Εικόνες 4-7 έως 4-11). Όταν συγκρίναμε τις ποσοστιαίες κατανομές κάθε υπογραφής διήθησης μέσα σε κάθε συστάδα (Εικόνα 4-30), υπήρχαν διαφορές μεταξύ των συστάδων ($p=0.0021$). Οι ομάδες C1 και C3 ήταν παρόμοιες, ενώ στην C2 υπήρξε αυξημένη συχνότητα των ασθενών με υπογραφή FCIS και χαμηλότερο ποσοστό ασθενών με UCIS.



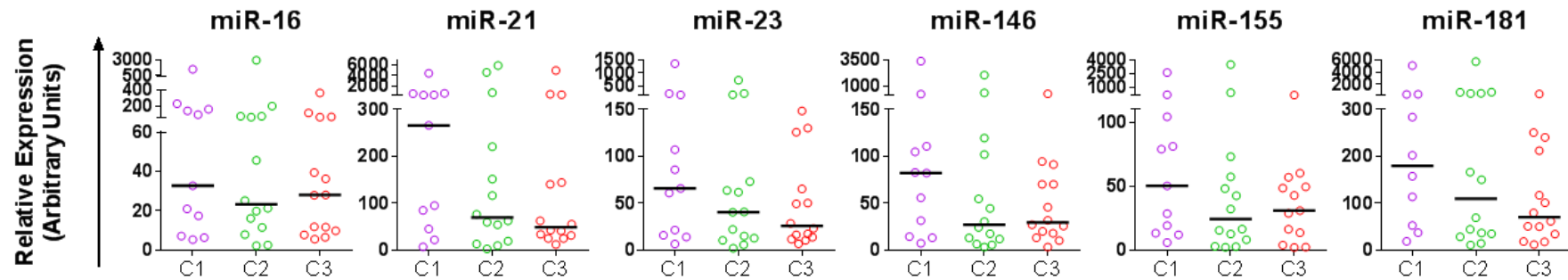
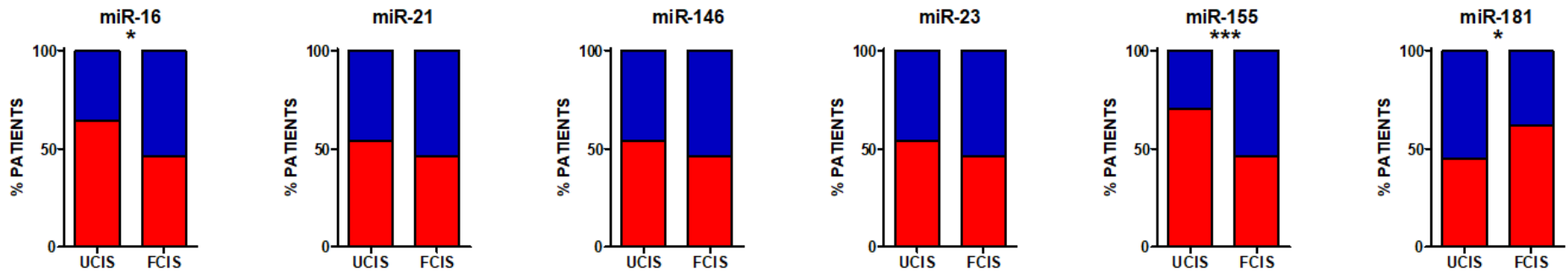
Εικόνα 4-30: Ποσοστά ασθενών που φέρουν ευνοϊκές ή δυσμενείς υπογραφές ανά ομάδες ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.

Η ομάδα μας έχει παρουσιάσει δεδομένα που υποδηλώνουν ότι ορισμένα αλληλόμορφα HLA σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση ή/και καλύτερη πρόβλεψη της κλινικής απόκρισης μετά από εμβολιασμό (immunization) [398-401]: Τα αλληλόμορφα HLA-A*24, αλληλόμορφα της υπερικογένειας HLA-A3 (A*03, A*11, A*31, A*33, A*68) και HLA-DRB1*11 έχουν προγνωστικό πλεονέκτημα σε σύγκριση με HLA-A*02+ αλληλόμορφα. Με βάση αυτές τις πρώτες παρατηρήσεις, συγκρίναμε την κατανομή των ασθενών που εκφράζουν κάθε αλληλόμορφο μεταξύ των διαφόρων ομάδων miRNAs που προέκυψαν. Η συστάδα C3 περιλαμβάνει σημαντικά αυξημένο αριθμό HLA-A*02+ και το χαμηλότερο αριθμό ασθενών με HLA-A*24+ και HLA-DRB1*11+, ενώ όλοι οι ασθενείς C1 εκφράζουν αλληλόμορφο της υπερικογένειας A3. Ο χαμηλότερος αριθμός ασθενών με HLA-A*02+ παρατηρήθηκε στο C2 (Εικόνα 4-31).



Εικόνα 4-31: Ποσοστά ασθενών που εκφράζουν συγκεκριμένα αλληλόμορφα όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.

Τα miRNAs έχουν μελετηθεί εκτενώς, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής της παρούσας διατριβής, τόσο στην κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο αλλά και στους καρκινικούς ιστούς. Έτσι λοιπόν, θέλοντας να έχουμε μια συνολική και ολοκληρωμένη εικόνα για τα miRNAs, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης τους στους όγκους των ασθενών, απομονώνοντάς τα από τομές παραφίνης που ήταν διαθέσιμες για τις ασθενείς μας. Στην Εικόνα 4-32A που παρατίθεται, παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs που μελετώνται στην παρούσα διατριβή και η κατανομή τους ανάλογα με τα clusters που έχουν δημιουργηθεί από τον αλγόριθμό μας. Όπως φαίνεται, οι ασθενείς που ανήκουν στη συστάδα C1 έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των miR-21, miR-23, miR-146, miR-155 & miR-181 συγκριτικά με τις ασθενείς που ανήκουν στις άλλες δύο ομάδες (C2 & C3). Το miR-16 φαίνεται να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα μεταξύ των ασθενών και των τριών clusters. Στην Εικόνα 4-32B παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες κατανομές των ασθενών που εκφράζουν υψηλά επίπεδα (\geq median) ή χαμηλά ($<$ median) για κάθε miRNA ανά cluster. Τέλος, επιχειρήθηκε κι εδώ, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4-32C, διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων με τις «υπογραφές» που βρέθηκαν από το αναδρομικό τμήμα της μελέτης μας. Γι' αυτό το λόγο στις ομάδες των ασθενών του προοπτικού τμήματος της μελέτης που φέρουν τις δυσμενείς «υπογραφές» (UCIS) και τις ευνοϊκές (FCIS) «υπογραφές» ελέγξαμε τις ποσοστιαίες κατανομές τους όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του όγκου. Τα ποσοστά των ασθενών δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των miR-21, miR-23 και miR-146 μεταξύ των ομάδων ασθενών που χαρακτηρίζονται τόσο από δυσμενείς όσο και από ευνοϊκές «υπογραφές». Το ποσοστό των ασθενών με δυσμενείς «υπογραφές» που εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα των miR-16 και miR-155 διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης τους στις ασθενείς με τις ευνοϊκές «υπογραφές» ($p=0.0155$ και $p=0.0009$ αντίστοιχα). Τα επίπεδα έκφρασης του miR-181 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα (\geq median) στο μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με ευνοϊκές «υπογραφές» σε σχέση με τις ασθενείς με τις δυσμενείς ($p=0.0231$).

A**B****C**

Εικόνα 4-32: Α) Επίπεδα έκφρασης miRNAs από τομές παραφίνης ανά συστάδα ασθενών όπως προέκυψε από την κατηγοριοποίησή τους με τον αλγόριθμο, Β) Ποσοστιαία κατανομή ασθενών ανά συστάδα για τα επίπεδα έκφρασης κάθε miRNA. Γ) Ποσοστιαία κατανομή ασθενών με υψηλά (κόκκινο) ή χαμηλά (μπλε) επίπεδα έκφρασης miRNAs στην ομάδα ασθενών που χαρακτηρίζονται από δυσμενείς (UCIS) ή ευνοϊκές (FCIS) υπογραφές.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε και προτείνουμε ανοσολογικές και μοριακές «υπογραφές» με δυνατότητα πρόγνωσης, τόσο εντός του όγκου όσο και στην κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο του μαστού (BCa).

Όσον αφορά στη διήθηση του όγκου προτείνεται για πρώτη φορά, ότι η συνδυαστική αξιολόγηση των πυκνοτήτων των CD8+ ή CD163+ ανοσοκυττάρων στο κέντρο του όγκου (TC) και το διηθητικό μέτωπο (IM) επιτρέπει καλύτερη κατηγοριοποίηση ασθενών και βελτιώνει την προγνωστική αξία της εγκαθιδρυμένης σταδιοποίησης κατά TNM στον BCa. Τα δεδομένα μας επίσης υποδεικνύουν ότι η συνδυαστική αξιολόγηση των πυκνοτήτων των CD8+ και CD163+ κυττάρων από κοινού στο TC και στο IM θα μπορούσε να βελτιώσει την ακρίβεια της πρόβλεψης για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και την συνολική επιβίωση (OS). Αρχικά, εστιάζοντας στον πιο συνηθισμένο πληθυσμό TILs, τα CD8+ κύτταρα, παρατηρήσαμε μεγαλύτερη DFS και OS όταν μεγάλες πυκνότητες CD8+ κυττάρων στο TC συνδυάστηκαν με χαμηλές πυκνότητες στο IM (δηλαδή HL, High στο κέντρο του όγκου, Low στο διηθητικό μέτωπο). Αντίθετα, ο αντίστροφος συνδυασμός (δηλαδή LH, Low στο κέντρο του όγκου, High στο διηθητικό μέτωπο) συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επανεμφάνισης της νόσου και μειωμένη συνολική επιβίωση. Αυτό το εύρημα αποτελεί πρόκληση, δεδομένου ότι η πιο ισχυρή ευνοϊκή ανοσολογική «υπογραφή» στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνδυάζει υψηλές πυκνότητες CD8+ κυττάρων τόσο σε TC όσο και σε IM [14, 122]. Στόχος μας ήταν επίσης να διερευνήσουμε εάν ο εντοπισμός των μακροφάγων στον πρωτογενή BCa θα μπορούσε να έχει κλινική σημασία. Το CD163 αντιπροσωπεύει έναν δείκτη που εκφράζεται κυρίως από τους αντιφλεγμονώδεις (M2) υποτύπους των μακροφάγων [402]. Ανιχνεύτηκαν υψηλότεροι απόλυτοι αριθμοί CD163+ κυττάρων από CD8+ κύτταρα και στις δύο περιοχές του όγκου, και αυτό είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία που αναφέρει αυξημένη διήθηση TAM σε όγκους του μαστού [402]. Τα αποτελέσματά μας, σε συμφωνία με μια πρόσφατη μελέτη [84], έδειξαν ότι τα κύτταρα CD163+ κύτταρα στο TC συσχετίζονται θετικά με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση,

υπογραμμίζοντας τη σημασία της ανάλυσης των πυκνοτήτων αυτών των κυττάρων τοπολογικά και τον εν δυνάμει προγνωστικό τους ρόλο. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε από την αξιολόγηση των πυκνοτήτων των CD8+ κυττάρων υπήρξε συσχέτιση με το DFS και OS, κάτι που δεν διαπιστώθηκε όταν αξιολογήθηκαν οι πυκνότητες των CD163+ κυττάρων σε μεμονωμένες περιοχές. Παρ' όλα αυτά, οι συνδυαστικές αναλύσεις έδειξαν ευνοϊκή κλινική έκβαση σε ασθενείς που έχουν χαμηλές πυκνότητες CD163+ κυττάρων στο TC συνδυασμένες με υψηλές πυκνότητες στο IM. Είναι ενδιαφέρον ότι η κακή πρόγνωση παρατηρήθηκε σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι εμφάνισαν αντίστροφο προφίλ διήθησης από CD163+ κύτταρα, δηλαδή υψηλής πυκνότητας διήθηση στο TC έναντι χαμηλής πυκνότητας στο IM. Επί του παρόντος δεν είναι σαφές τι μπορεί να προκαλέσει τέτοιες διαφορικές κατανομές μεταξύ των διαμερισμάτων του όγκου. Δεδομένης της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων που χαρακτηρίζουν τον όγκο και των ανοσολογικών αντιδράσεων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ανάλογα με τα φλεγμονώδη μόρια που εκκρίνονται τοπικά από τον όγκο, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να συσσωρεύονται σε διαφορετικές ανατομικές περιοχές του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Μια τέτοια διαμερισματοποίηση μπορεί στη συνέχεια να επηρεάσει τη λειτουργική κατάσταση αυτών των ανοσοκυττάρων, όπως αυτό έχει αποδειχθεί για τα DCs που βρίσκονται στον όγκο, που χαρακτηρίζονται από προ- και αντικαρκινικές ιδιότητες [58, 403, 404]. Με ανάλογο τρόπο, διάφορες χημειοκίνες έχει αποδειχθεί ότι προσελκύουν εκλεκτικά CD8+ κύτταρα σε διαφορετικά διαμερίσματα του όγκου [46, 230, 405-408], υποδηλώνοντας ότι η θέση των διαφόρων πληθυσμών TILs είναι μια δυναμική διαδικασία με προ- ή αντικαρκινικά αποτελέσματα. Η δυναμική αυτή διαδικασία εξαρτάται από τη βιολογία του όγκου, αντικατοπτρίζοντας το στάδιο της ασθένειας, το οποίο συσχετίζεται με την κλινική έκβαση σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του BCa [403, 409, 410]. Κύτταρα με αντίθετες λειτουργίες (δηλαδή CD8+ κύτταρα και CD163+ κύτταρα) σε διαφορετικές περιοχές του όγκου και σε διαφορετικές πυκνότητες μπορεί να έχουν σημαντικό προγνωστικό ρόλο αλλά, επί του παρόντος, δεν είναι γνωστό αν η χωροταξική τους κατανομή στα διαμερίσματα του όγκου οφείλεται σε μεταναστευτικές διεργασίες που προκαλούνται από τοπικά εκκρινόμενους παράγοντες ή «αρχιτεκτονικά» εμπόδια που «αιχμαλωτίζουν» αυτά τα κύτταρα στα διαφορετικά διαμερίσματα του όγκου

[396]. Επίσης, διαπιστώσαμε ότι αυτές οι ευνοϊκές διαφορικές πυκνότητες ανοσοκυττάρων συσχετίστηκαν με βελτιωμένη κλινική έκβαση σε ομάδες ασθενών με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά συνδεδεμένα με δυσμενή πρόγνωση (προχωρημένο στάδιο, μεγάλους όγκους, υψηλό Grade και θετικούς λεμφαδένες), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες με εκείνες ασθενών με καλή πρόγνωση σύμφωνα με τυπικά κλινικοπαθολογικά κριτήρια (πρώιμο στάδιο, μικρούς όγκους, χαμηλό Grade και αρνητικούς λεμφαδένες). Από θεωρητική άποψη, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι από τη στιγμή που ο BCa καθίσταται κλινικά ανιχνεύσιμος, δηλαδή βρίσκεται σε φάση διαφυγής της ανοσοεπιτήρησης, το προσαρμοστικό σκέλος του ανοσοποιητικού συστήματος εξακολουθεί να είναι ενεργό παίζοντας σημαντικό ρόλο στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου. Αυτό μπορεί να μην είναι συμβατό με τη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης [32], δεδομένου ότι η ευεργετική επίδραση του προσαρμοστικού σκέλους της ανοσίας μπορεί να υφίσταται καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης του όγκου, όπως δείχνουμε εδώ για τους ασθενείς με BCa με προχωρημένη νόσο που έχουν παρόμοια DFS και OS με ασθενείς πρώιμου σταδίου, και έχουν μια ευνοϊκή ανοσολογική υπογραφή. Μπορούμε να προτείνουμε ότι η ευνοϊκή ανοσολογική μας υπογραφή επιβραδύνει τους ρυθμούς ανάπτυξης του όγκου, αυξάνοντας έτσι το OS. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε ότι μια τέτοια προϋπάρχουσα ανοσία μπορεί, σε κάποιο βαθμό, να κατευθύνεται από τα νεοαντιγόνα που εκφράζονται από τον όγκο μέσω της εμφάνισης μη-συνώνυμων σωματικών μεταλλάξεων [411]. Εναλλακτικά, η FCIS υπογραφή μπορεί να συμβάλλει στην τροποποίηση του στρώματος του όγκου και των καρκινικών κυττάρων, επηρεάζοντας αρνητικά την αγγειογένεση και την εξαγγείωση, και με αυτόν τον τρόπο να επηρεάσει την εξέλιξη του όγκου. Οι μεταβολές στις πυκνότητες και στη λειτουργία των ανοσοκυττάρων που μπορεί να εμφανιστούν κατά την εξέλιξη της νόσου θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τη διαφυγή του όγκου από την ανοσοεπιτήρηση. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί για την αποκαλούμενη επίκτητη ανοσολογική απόκριση αποδίδονται κυρίως σε επιγενετικές αλλαγές [410, 412] και πιο πρόσφατα στην αναπροσαρμογή των εναλλακτικών σημείων ελέγχου ανοσίας [413] καθώς και στην απώλεια μη συνώνυμων σωματικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή/και σε εξάλειψη των νεοαντιγόνων [414]. Ωστόσο, και στην περίπτωση αυτή η ευεργετική επίδραση της ανοσολογικής

απόκρισης που μπορεί να υπάρχει κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου εντός του όγκου, εξασθενεί το μεταστατικό δυναμικό του και οδηγεί σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα. Έτσι, τα διηθούντα ανοσοκύτταρα μπορεί όχι μόνο να αντικατοπτρίζουν την προϋπάρχουσα ανοσία αλλά και την ανοσολογική απόκριση στη θεραπεία. Επομένως, θα είναι πολύ σημαντικό για τις αποφάσεις που λαμβάνονται κατά την κλινική παρακολούθηση των ασθενών να λαμβάνεται υπόψη εάν και σε ποιο επίπεδο η αρχική κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και η «δυναμική» του επηρεάζει την επιβίωση των ασθενών, ανεξάρτητα από τη θεραπεία. Επειδή ο πρωτοπαθής όγκος στην ομάδα των ασθενών μας αφαιρέθηκε με χειρουργική επέμβαση, η προγνωστική αξία της ανοσολογικής απόκρισης εντός του όγκου μπορεί να αντανακλά την ποσότητα και την ποιότητα κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που συμβάλλουν στη λύση των νεοπλασματικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, στους λεμφικούς ιστούς ή σε άλλες ανατομικές θέσεις. Είναι ωστόσο, προς το παρόν, άγνωστο εάν υπάρχει ένας συσχετισμός μεταξύ του ανοσοποιητικού φαινοτύπου των όγκων και της ανταπόκρισης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του περιφερικού αίματος. Σε μία μελέτη από την ομάδα του Mortarini [415] παρατηρήθηκε ότι η συχνότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων στον όγκο σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας του TGF-β και μειωμένη απόκριση των T-κυττάρων στο περιφερικό αίμα έπειτα από διέγερση με IL-2. Σε συνέχεια αυτών, η ομάδα μας έχει εντοπίσει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων TGF-β στον ορό ασθενών με καρκίνο προστάτη με ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις T-κυττάρων εναντίον ενός υβριδικού πεπτιδίου της HER-2/neu που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό τους [416]. Αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης ενεργοποίησης των όγκων και της «συμπεριφοράς» των κυκλοφορούντων κυττάρων και να εξετασθεί εάν αυτό οδηγεί σε συστημική αλλοίωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος που σχετίζεται με την κατάσταση του καρκινικού φορτίου. Ο εντοπισμός μιας συσχέτισης θα επέτρεπε τη λειτουργική εκτίμηση των όγκων και κατά συνέπεια θα προέβλεπε την πρόγνωση εξετάζοντας τα κυκλοφορούντα κύτταρα. Τέτοιες συνδυαστικές αναλύσεις μπορεί να είναι χρήσιμες για την εκτίμηση του ρόλου των προσαρμοστικών ανοσοαποκρίσεων στον όγκο και το περιφερικό αίμα, για την εξέλιξη της νόσου.

Παρουσιάζουμε επίσης εδώ, ότι η συχνότητα των ασθενών που χαρακτηρίζονται από την FCIS υπογραφή ήταν μειωμένη μεταξύ των ομάδων με δυσμενή κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ευνοϊκές πυκνότητες των CD8+ και CD163+ κυττάρων συσχετίζονται αρνητικά με το στάδιο TNM. Μπορούμε να προτείνουμε ότι η πρόοδος της νόσου συνδέεται με την επιδείνωση αυτής της ανοσοαπόκρισης κατά του όγκου, με αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση της ανοσολογικής διαφυγής. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, ακόμη και σε αυτό το στάδιο, η δύναμη της ανοσοαπόκρισης θα μπορούσε να είναι μια βασική παράμετρος για τον αποτελεσματικό έλεγχο της εξέλιξης του όγκου. Έχουμε δείξει ότι οι διαφορικές πυκνότητες και η χωροταξική κατανομή των CD8+ και CD163+ κυττάρων, όπως περιγράφεται από την FCIS «υπογραφή», θα μπορούσαν να εντοπίσουν ασθενείς με αυξημένο DFS ή ασθενείς που πιθανότατα θα έχουν καλύτερη επιβίωση, παρά το γεγονός ότι βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο νόσου σύμφωνα με την ταξινόμηση TNM. Αυτό υποδεικνύει ότι οι «υπογραφές» FCIS & UCIS, όπως, ορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, αποτελούν νέο υποψήφιο δείκτη πέραν του TNM που αναμένεται να βελτιώσουν την πρόγνωση κλινικών εκβάσεων σε ασθενείς με BCa.

Η μελέτη μας είναι η πρώτη που προτείνει ότι διαφορικές πυκνότητες του ίδιου υποπληθυσμού των ανοσοκυττάρων που διηθούν τον πρωτοπαθή όγκο στο TC και στο IM μπορεί να έχουν αντίθετες προγνωστικές επιπτώσεις στο BCa. Η ευνοϊκή ανοσολογική υπογραφή (FCIS) όπως ορίζεται εδώ, προβλέπει ευνοϊκές κλινικές εκβάσεις (τόσο DFS όσο και OS) σε ετερογενείς ομάδες ασθενών με προχωρημένο στάδιο ασθένειας, μεγάλους όγκους, διηθημένους λεμφαδένες και όγκους υψηλού Grade και συμπληρώνει τις καθιερωμένες και εγκαθιδρυμένες προγνωστικές παραμέτρους στο BCa. Έτσι, συνδυάζοντας τις κατηγοριοποιήσεις ασθενών με βάση τη σταδιοποίηση TNM και τις συνδυασμένες ανοσολογικές «υπογραφές», όπως προέκυψαν από τη διήθηση ανοσοκυττάρων στην παρούσα μελέτη, μπορούμε να έχουμε ισχυρές ενδείξεις για τον ορισμό νέων υποομάδων ασθενών με ξεχωριστή πρόγνωση.

Σε μια προσπάθεια να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις κυκλοφορούντων παραγόντων με το μικροπεριβάλλον του όγκου μελετήθηκαν τα επίπεδα των miRNAs, τόσο στον ορό, όσο και στα PBMCs ασθενών καθώς και τα επίπεδα κυτταροκινών/

χημειοκινών στον ορό. Έτσι, λοιπόν, θελήσαμε να ελέγξουμε αν υπάρχει μια «υπογραφή» στην κυκλοφορία που θα μπορούσε εν δυνάμει να αντανakλά το μικροπεριβάλλον του όγκου.

Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος διαδραματίζουν οι κυτταροκίνες/ χημειοκίνες. Πρόκειται για διαλυτές πρωτεΐνες, μικρής μοριακής μάζας, οι οποίες μπορεί να εκκρίνονται από πολλούς πληθυσμούς κυττάρων και έχουν τόσο παρακρινή όσο και ενδοκρινή δράση. Η διατήρηση της ομοιόστασης των κυτταροκινών παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού και η απορρύθμιση της συσχετίζεται με νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσων νοσημάτων [417] και νεοπλασιών [418]. Πλήθος ερευνών εστιάζει στην ανίχνευση κυτταροκινών στον ορό ασθενών με καρκίνο και την πιθανή συσχέτιση με την έκβαση της νόσου [419]. Πολλές μελέτες έχουν γίνει και σε ασθενείς με BCa [420]. Από τα δικά μας αποτελέσματα και την μέτρηση των επιπέδων των IL-8, IL-10 και TGF-β1 δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών. Αυξημένα ήταν τα επίπεδα της IL-9 στους ασθενείς, ενώ, μειωμένα τα επίπεδα των IL-1Ra και Rantes σε σχέση με τους υγιείς δότες. Τα ευρήματά μας, όσον αφορά στα αυξημένα επίπεδα της IL-9 σε ασθενείς με BCa σε σύγκριση με τα επίπεδα των υγιών δοτών είναι σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη των You et al. [421]. Αυξημένα επίπεδα έχουν συσχετιστεί με υποτροπή του όγκου, και είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων στον BCa [422]. Η διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του Rantes (CCL5) στον BCa δεν είναι σαφής ως προς τα συμπεράσματά της. Υψηλότερα επίπεδα Rantes στο πλάσμα ασθενών, αλλά και στον όγκο, έχουν συσχετιστεί στον BCa και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας με προχωρημένη νόσο [423, 424]. Οι ασθενείς της δικής μας μελέτης χαρακτηρίζονται ως ασθενείς πρώιμου σταδίου, οπότε πιθανότατα να μην βρίσκουμε αυξημένα επίπεδα λόγω της επιλογής της ομάδας των ασθενών. Όσον αφορά στην IL-1Ra, έχει μελετηθεί ο ρόλος της στο μελάνωμα και στον καρκίνο παχέος εντέρου [425]. Μελέτες σε προκλινικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η IL-1Ra συμμετέχει στην παρεμπόδιση της λειτουργίας του VEGF, αναστέλλοντας τη μετάσταση [426]. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν χαμηλότερα επίπεδα IL-1Ra στην ομάδα των ασθενών, σε σχέση με τους υγιείς δότες, εύρημα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν τα

επίπεδα κυτταροκινών/ χημειοκινών με την υποτροπή της νόσου [420]. Τόσο διαγνωστικά, όσο και προγνωστικά, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα τα επίπεδα κυτταροκινών/χημειοκινών, διότι η παρουσία των κυτταροκινών/χημειοκινών στο περιφερικό αίμα είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο και πιθανότατα η παρουσία της μιας κυτταροκίνης επηρεάζει άλλες, είτε άμεσα, είτε έμμεσα ασκώντας δράση σε κύτταρα της περιφέρειας που με την σειρά τους παράγουν άλλες κυτταροκίνες ή προσελκύουν άλλες χημειοκίνες. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός πως εμείς εξετάζουμε την παρουσία κυτταροκινών/χημειοκινών στο πλαίσιο του καρκίνου. Αν για κάποιο λόγο, συνυπάρχει κάποια λοίμωξη ή φλεγμονή στον ασθενή που επηρεάζει την ομοιόσταση του οργανισμού, μιας και οι ισορροπίες είναι ιδιαίτερα εύθραυστες, εύκολα μπορούμε να εξάγουμε λανθασμένα συμπεράσματα. Η τάση πλέον, στη διεθνή επιστημονική κοινότητα είναι η μελέτη συνδυασμού παραγόντων και η δημιουργία «υπογραφών» [427]. Αυτό που σίγουρα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μένει να αξιολογηθεί σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, είναι οι ισχυρές συσχετίσεις που παρατηρούνται μεταξύ των κυτταροκινών/ χημειοκινών του ορού ασθενών και τις οποίες δεν συναντάμε στους υγιείς δότες.

Ο ρόλος των miRNAs στην εξέλιξη του καρκίνου είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς μπορούν να δρουν ρυθμίζοντας τόσο τα καρκινικά κύτταρα, όσο και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [331]. Τα miRNAs που μελετήθηκαν είναι miRNAs με τεκμηριωμένο διττό ρόλο. Τα miRNAs βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά και η σταθερότητα τους τα καθιστά κατάλληλους υποψήφιους βιοδείκτες. Η ανίχνευση και τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs στην κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο έχει προταθεί ότι μπορεί να έχουν διαγνωστική, προγνωστική ή/και προβλεπτική αξία [428]. Τα miRNAs στην κυκλοφορία μπορεί να βρίσκονται ως ελεύθερα κυκλοφορούντα miRNAs, συνδεδεμένα με ριβονουκλεοτιδικά σύμπλοκα, όπως οι πρωτεΐνες Argonaute2, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL) ή nucleophosmin (NPM1)] ή σε εξωκυττάρια κυστίδια (εξωσώματα, μικροκυστίδια ή αποπτωτικά σωμάτια) [429]. Τα miRNAs που δεσμεύονται ή είναι σε σύμπλοκα ή περιέχονται σε εξωκυτταρικά κυστίδια, προστατεύονται από την αποικοδόμηση και, ως εκ τούτου, είναι σταθερά στα βιολογικά υγρά. Τα πιο εκτεταμένα μελετημένα κυστίδια που περιέχουν miRNA είναι τα εξωσώματα. Η παραγωγή κυστιδίων που περιέχουν

miRNAs φαίνεται να είναι εκλεκτική, καθώς η περιεκτικότητα σε miRNAs στα κύτταρα και στα κυστίδια που εκκρίνουν διαφέρει. Η έκκριση εξωσωμάτων με miRNAs αυξάνεται στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι έχουν ειδικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. Η ακριβής λειτουργία των εκκρινόμενων κυστιδίων είναι ακόμη υπό συζήτηση, αλλά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα miRNAs επιτρέπουν στα κύτταρα να επικοινωνούν με άλλα κύτταρα [430]. Την τελευταία δεκαετία, συσσωρεύτηκαν σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη συμμετοχή των miRNAs στην αγγειογένεση και τη μετάσταση στον καρκίνο [431]. Στη δική μας μελέτη, επιλέχθηκαν να μελετηθούν έξι miRNAs τόσο στον ορό, όσο και στα PBMCs ασθενών με BCa. Ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο στην μελέτη μας είναι η χρονική στιγμή συλλογής των δειγμάτων. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν μία μέρα πριν το χειρουργείο των ασθενών και χωρίς οι ασθενείς να έχουν λάβει κάποια θεραπεία. Πρόκειται για ένα ιδιαίτερα ομοιογενές δείγμα που μπορεί να αξιολογηθεί κατάλληλα. Είναι λίγες οι μελέτες στην βιβλιογραφία που έχουν την ομοιογένεια του δικού μας δείγματος. Συνήθως γίνεται συλλογή δειγμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της μελέτης, ή πριν και μετά την χορήγηση θεραπείας [432, 433]. Κατά την αρχική σύγκριση μεταξύ ασθενών και υγιών δοτών βρέθηκαν και τα έξι miRNAs να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα των υγιών δοτών, σε σχέση με τις ασθενείς. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν μερικές ασθενείς που είχαν πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης σε κάποια miRNAs, όχι απαραίτητα στα ίδια μεταξύ των ασθενών. Στη βιβλιογραφία οι περισσότερες μελέτες που αφορούν σε miRNAs αναφέρονται σε πολύ αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα τους [292, 434]. Τα υψηλά επίπεδα του miR-21 και miR-155 στον ορό έχουν βρεθεί να αξιολογούνται ως βιοδείκτες διάγνωσης στον BCa [435, 436], όμως υπάρχουν και μελέτες που τα επίπεδα τους είναι μειωμένα συγκριτικά με τα επίπεδα των υγιών δοτών [437], κάτι που είναι σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα. Αυξημένα επίπεδα των miR-146 και miR-16 σε ορό ασθενών με BCa έχουν συσχετιστεί με διήθηση λεμφαδένων και με το προφίλ ορμονικών υποδοχέων του όγκου [438]. Όσον αφορά στο miR-155, αυξημένα επίπεδά του στον ορό έχουν συσχετιστεί με υποτροπή της νόσου στον BCa [439], αντοχή στη χημειοθεραπεία [440, 441] και μετάσταση [442]. Ο ρόλος του miR-181 είναι αμφιλεγόμενος στον BCa [443] για την ογκογόνο ή μη δράση του. Ωστόσο, στον ορό ασθενών με BCa, τα επίπεδα του βρίσκονται μειωμένα [444],

όπως και στη δική μας μελέτη. Τέλος, το miR-23 στον ορό βρίσκεται κυρίως αυξημένο [445]. Επίσης, μελέτες όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στον όγκο, το συσχετίζουν με διήθηση λεμφαδένων, με προχωρημένο στάδιο [292], αλλά, και με υποτροπή της νόσου καθώς και με δυσμενή πρόγνωση [446]. Όμοια και για το miR-155 στον όγκο, μελέτες το συσχετίζουν με μικρή επιβίωση [442], όμως σε πρόσφατη μελέτη [447] τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε τριπλά αρνητικές ασθενείς με BCa φαίνεται να έχουν προστατευτικό ρόλο. Τα έξι miRNAs που μελετήθηκαν, είχαν ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ τους όταν προέρχονταν από τον ορό και από τα PBMCs, όμως δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των miRNAs από τον ορό και αντίστοιχων των PBMCs. Από τις συσχετίσεις που ελέγχθηκαν από τους παράγοντες της συστηματικής κυκλοφορίας, τα miRNAs του ορού ήταν αυτά που παρουσίασαν τις περισσότερες συσχετίσεις με άλλους παράγοντες της κυκλοφορίας, όπως τις κυτταροκίνες/ χημειοκίνες και τα υπόλοιπα miRNAs του ορού, αλλά και με διηθούμενους ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Έτσι λοιπόν, η ανάλυσή μας βασίστηκε στα miRNAs του ορού στην προσπάθειά μας να ελέγξουμε πιθανές συσχετίσεις των επιπέδων τους με το μικροπεριβάλλον του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, προχωρήσαμε στη δημιουργία ενός αλγορίθμου βάσει του οποίου δημιουργήθηκαν τρεις συστάδες/clusters στο σύνολο των ασθενών μας. Αξίζει να σημειώσουμε πως μεμονωμένα τα miRNAs που έχουν επιλεγεί για την παρούσα μελέτη είχαν μελετηθεί για τον ρόλο τους στον καρκίνο, αλλά όχι ο συγκεκριμένος συνδυασμός αυτών, για την δημιουργία μιας χαρακτηριστικής «υπογραφής». Από την ομαδοποίηση και τις συστάδες που προέκυψαν, από τα έξι miRNAs του ορού που μελετήσαμε, έχουμε τρεις σαφείς ομάδες ασθενών. Η συστάδα 1 (C1) είναι εκείνη με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των έξι miRNAs. Οι ασθενείς που απαρτίζουν αυτήν την ομάδα, έχουν την μεγαλύτερη ηλικία συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες ασθενών, ενώ χαρακτηρίζονται από χαμηλή διήθηση από CD4+ και CD8+ κύτταρα, τόσο στο κέντρο του όγκου, όσο και στο διηθητικό μέτωπο. Ταυτόχρονα, οι ασθενείς της συστάδας αυτής χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα κυτταροκινών/ χημειοκινών (IL-8, IL-9, IL-10, Rantes, TGF-β και IL-1Ra) στην κυκλοφορία σε σχέση με τις άλλες δύο συστάδες. Η χαμηλή διήθηση των όγκων των ασθενών της συγκεκριμένης ομάδας ίσως αντανακλά όγκο χαμηλής ανοσογονικότητας, που σε συνδυασμό με την αυξημένη ηλικία των

ασθενών πιθανόν να υποστηρίζει ένα όχι και τόσο ενεργό ανοσοποιητικό σύστημα, με περιορισμένο ρεπερτόριο T-κυττάρων μνήμης και έλλειψη ογκο-ειδικών κυττάρων. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε τον όγκο αυτό ανοσολογικά-φτωχό “poor”. Όμως η συστάδα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαγνωστικά καθώς όπως είδαμε, μπορεί με 100 % ευαισθησία και 100% ειδικότητα να διαχωρίσει τους υγιείς δότες από τους ασθενείς. Η συστάδα 2 (C2) χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης miRNAs, κυτταροκινών/χημειοκινών και ενδιάμεση διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Τέλος, όσον αφορά στα κλινικοπαθολογικά της χαρακτηριστικά, φαίνεται να περιλαμβάνει ασθενείς με το καλύτερο προφίλ πρόγνωσης συγκριτικά με τις άλλες δύο συστάδες, καθώς περισσότερο από τα δύο τρίτα των ασθενών είναι πρώιμου σταδίου (I ή IIa), χαμηλού Grade, χαρακτηρίζονται από χαμηλό Ki67%, εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, ενώ δεν υπερεκφράζουν την ογκοπρωτεΐνη HER2/neu σε ποσοστό πάνω από 90%. Στις μέρες μας, η έλλειψη της HER2/neu θεωρείται μειονέκτημα, καθώς οι ασθενείς δεν μπορούν να επωφεληθούν από την πολύ αποτελεσματική θεραπεία με Herceptin [448]. Η συστάδα 3 (C3) χαρακτηρίζεται από τα υψηλότερα επίπεδα miRNAs και τα χαμηλότερα επίπεδα κυτταροκινών/χημειοκινών στον ορό, σε σχέση με τις άλλες συστάδες. Ταυτόχρονα, οι ασθενείς της ομάδας αυτής είναι μικρότερης ηλικίας και χαρακτηρίζονται από υψηλή διήθηση από CD4+ και CD8+ T κύτταρα, ωστόσο οι όγκοι τους παρουσιάζουν δυσμενή κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (αυξημένο ποσοστό Ki67, περισσότερες ασθενείς με Grade 3 και αριθμό διηθημένων λεμφαδένων $N \geq 3$). Οι όγκοι αυτοί, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ανοσολογικά “ενεργοί” λόγω της παρουσίας των διηθώντων λεμφοκυττάρων, κάτι που θα μπορούσε να χαρακτηρίσει τους όγκους ανοσογονικούς. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία των κυττάρων δεν συνεπάγεται και τη λειτουργικότητά τους. Οι ασθενείς της συστάδας αυτής, περιλαμβάνουν περισσότερα άτομα με το δυσμενές ανοσολογικό προφίλ διήθησης (UCIS), όπως αυτό έχει προκύψει από το αναδρομικό τμήμα της μελέτης μας. Δεδομένου ότι τα επίπεδα miRNA του ορού συσχετίζονται θετικά με τη διήθηση των CD4 και CD8 T-κυττάρων και δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση με τα miRNAs των PBMCs, είναι εύλογο να υποτεθεί ότι τα κυκλοφορούντα miRNA αντανακλούν την ανοσολογική κατάσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Η

έκφραση των miR-16, miR-21 και miR-146 [449] έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται θετικά με T-κύτταρα μνήμης και αυξημένα επίπεδα miR-23 και miR-155 με την παρουσία CD8 T-κυττάρων σε όγκους [383, 450]. Συνεπώς, ο συνδυασμός τους στην κυκλοφορία υποστηρίζουν ότι ασθενείς με υπογραφή C3 miRNA έχουν περισσότερο ανοσογονικούς όγκους που αντιπροσωπεύονται από υψηλότερη διήθηση ανοσοκυττάρων από ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα C1. Εντούτοις, τα υψηλά επίπεδα miR-23 μπορεί να παρεμποδίσουν το λειτουργικό δυναμικό τους, καθώς η υψηλή έκφραση miR-23 σχετίζεται με την εξασθενημένη λειτουργία των CTL [383], ενώ τα miR-21, miR-146a και miR-155 ελέγχουν θετικά τη λειτουργική ικανότητα των Tregs [451-453], υποστηρίζοντας έναν υποκείμενο μηχανισμό διαφυγής όγκων (immunoediting) στους ασθενείς της συστάδας 3. Ασθενείς με το προφίλ των miRNA που χαρακτηρίζει την ομάδα C3, θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν καλούς υποψήφιους για ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν τις προϋπάρχουσες ενδογενείς ανοσοαποκρίσεις τους [454]. Από την άλλη πλευρά, η χαμηλή συνολική έκφραση των έξι miRNAs της υπογραφής C1, σε συνδυασμό με την χαμηλή διήθηση T-κυττάρων στους όγκους, υποδηλώνει ότι οι ασθενείς αυτής της ομάδας φέρουν «φτωχούς» ως προς την ανοσογονικότητα όγκους, όπως αναφέρθηκε. Έτσι, οι στρατηγικές που στοχεύουν στην αύξηση της αναγνώρισης του όγκου και της διήθησης από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, θα μπορούσαν να βελτιώσουν την κλινική έκβαση αυτών των ασθενών.

Αν και τα επίπεδα των miRNA από τα PBMCs δεν συσχετίζονται με τα miRNAs του ορού, ούτε με τα επίπεδα κυτταροκινών / χημειοκινών που κυκλοφορούν (εκτός από την IL-9), οι υπογραφές συστάδων ήταν σε συμφωνία με τα προφίλ κυτταροκινών/χημειοκινών κυκλοφορίας: υψηλά επίπεδα miR-16, miR -21, miR-146 και miR-155 έχουν αναφερθεί προηγουμένως να συσχετίζονται αρνητικά με την παραγωγή κυτταροκινών/χημειοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-8, IL-10, Rantes [455-457]. Το ενδεχόμενο τα κυκλοφορούντα miRNAs να εμπλέκονται στη λειτουργικότητα των PBMCs, ανεξάρτητα από τα ενδογενή επίπεδα miRNAs των υποπληθυσμών τους, δεν μπορεί να αποκλειστεί στο πλαίσιο της διακυτταρικής επικοινωνίας [458].

Τα HLA μόρια είναι κρίσιμα στην ανοσία των Τ κυττάρων και ορισμένα αλληλόμορφα σχετίζονται με ασθένειες. Στον καρκίνο, το αλληλόμορφο HLA-A2 συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση στον καρκίνο των ωθηκών, του προστάτη, του πνεύμονα και του μαστού, ενώ το HLA-A24 με καλύτερα κλινικά αποτελέσματα στον καρκίνο του προστάτη και του μαστού [398-400, 459, 460]. Επιπλέον, ορισμένα miRNAs έχει αναφερθεί ότι δρουν ως ρυθμιστές διαφορετικών γενετικών τόπων των HLA [331]. Η σημαντικά αυξημένη συχνότητα των αρνητικών HLA-A2 και η αυξημένη συχνότητα των ασθενών που εκφράζουν HLA-A24 στη συστάδα 2, σε σύγκριση με την ομάδα C3 που εμφανίζει τους αντίστροφους γονότυπους, είναι επίσης ενδεικτικές καλύτερου προγνωστικού προφίλ της συστάδας 2 σε σχέση με την συστάδα 3.

Απ' όσα συζητηθήκαν εκτενώς προηγουμένως, συμπεραίνουμε το πόσο πολυπαραγοντική είναι η σχέση μεταξύ ανοσοποιητικού συστήματος και καρκίνου και πόσα διαφορετικά μονοπάτια και τρόποι ρύθμισης εμπλέκονται. Στη δική μας μελέτη, αν και το δείγμα των ασθενών είναι μικρό, και οι κατηγοριοποιήσεις των ασθενών ανά συστάδα κάνουν τις υποομάδες αρκετά μικρότερες, παρόλα αυτά τα δεδομένα μας αποτελούν ισχυρή αρχική ένδειξη πως τόσο τα αυξημένα, όσο και τα μειωμένα επίπεδα των ίδιων κυκλοφορούντων miRNA μπορεί να συσχετίζονται με διαφορετικές προγνώσεις στον καρκίνο του μαστού. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με όσα έχουν μέχρι σήμερα προταθεί στη βιβλιογραφία. Όλες οι δημοσιευμένες αναφορές παραπέμπουν στο διαγνωστικό (και πολύ λιγότερο στον προγνωστικό/προβλεπτικό) ρόλο, είτε των αυξημένων, είτε των μειωμένων επιπέδων κάθε miRNA, ακόμη και αν αυτά συπεριλαμβάνονται σε «υπογραφές» με άλλα miRNAs [296, 428]. Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του miRNA που κυκλοφορούν μεταξύ των διαφόρων ερευνητικών ομάδων αποδίδονται κυρίως στις μεθοδολογικές διαφορές [461]. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, οι οροί συλλέχθηκαν, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν μοριακά υπό πανομοιότυπες συνθήκες, μη υποστηρίζοντας έτσι καμία μεθοδολογική παρέμβαση στα ληφθέντα δεδομένα.

Η αλματώδης πρόοδος στον τομέα του καρκίνου, καθώς και η εισαγωγή νέων φαρμάκων έχει αυξήσει πολύ την ελεύθερη νόσου και συνολική επιβίωση ασθενών. Από την εισαγωγή της τελευταίας ασθενούς στο προοπτικό τμήμα της μελέτης

έχουν περάσει μόνο 3,5 χρόνια, ένα διάστημα ιδιαίτερα σύντομο για να μπορέσει να αξιολογηθεί η κλινική έκβαση. Θέτοντας, λοιπόν, ως απώτερο στόχο την πιθανή προγνωστική αξία των miRNAs που ανιχνεύθηκαν στον ορό, χρησιμοποιώντας εύκολη, γρήγορη, μη επεμβατική πρόσβαση στο υλικό, μέσω μόνο μιας απλής αιμοληψίας, χρησιμοποιήσαμε έναν αλγόριθμο που κατηγοριοποιεί τις ασθενείς σε τρεις ομάδες, υψηλής, ενδιάμεσης και χαμηλής έκφρασης επιπέδων έξι miRNAs. Οι συστάδες περιγράφουν ασθενείς με διαφορετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, διαφορετικό HLA γονότυπο, και επίπεδα κυτταροκινών/χημειοκινών, αλλά και διαφορετική διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες συνδέονται με την πρόγνωση του μη μεταστατικού BCa. Εν κατακλείδι, παρουσιάζουμε ισχυρές ενδείξεις ότι οι τρεις διαφορετικές «υπογραφές» όπως προέκυψαν από τα επίπεδα των έξι κυκλοφορούντων miRNAs (miR-16, miR-21, miR-23, miR-146a, miR-155 και miR-181a), ορίζουν και τρεις διαφορετικές ομάδες/συστάδες ασθενών με διηθητικό πορογενή, μη μεταστατικό BCa, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά κλινικοπαθολογικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά, και πιθανώς διαφορετική κλινική έκβαση. Το προγνωστικό ή/και το προβλεπτικό δυναμικό αυτών των υπογραφών μένει να αξιολογηθεί σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών BCa και σε βάθος χρόνου. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τα επίπεδα έκφρασης των έξι αυτών miRNAs, είναι πιθανό να προσφέρει εύκολα και γρήγορα πληροφορίες που θα οδηγήσουν σε έγκαιρη διάγνωση, αλλά και συγκεκριμένη θεραπεία μετά την διάγνωση. Ο δε συνδυασμός τους, με τις ανοσολογικές «υπογραφές» των όγκων μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη προγνωστική αξιολόγηση των ασθενών με καρκίνο μαστού και στην αποφυγή του φαινομένου της υπερθεραπείας, καθώς ο πιο σαφής «χαρακτηρισμός» των ασθενών θα δίνει την δυνατότητα ορθότερης θεραπευτικής προσέγγισης για την κάθε ασθενή.

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τόσο από το αναδρομικό, όσο και από το προοπτικό τμήμα της μελέτης μας προέκυψαν ανοσολογικές και μοριακές «υπογραφές» που χαρακτηρίζουν ομάδες ασθενών με BCa. Από το αναδρομικό τμήμα της μελέτης μας, η πυκνότητα και χωροταξική κατανομή των CD8+ και CD163+ ανοσοκυττάρων στο κέντρο του όγκου και στο διηθητικό μέτωπο, όρισε υποομάδες ασθενών με διαφορετική πρόγνωση. Είναι η πρώτη φορά που μελετάται η συνδυαστική κατανομή των κυττάρων αυτών στα διαφορετικά διαμερίσματα του όγκου και παρουσιάζονται αποτελέσματα για την προγνωστική τους αξία. Επιπρόσθετα, στο σύνολο των ασθενών, τόσο του αναδρομικού, όσο και του προοπτικού τμήματος της μελέτης οι «υπογραφές» που προέκυψαν βάσει της διήθησης από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, περιέγραψαν και οριοθέτησαν ομάδες ασθενών με συγκεκριμένα προγνωστικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Στο προοπτικό τμήμα, οι ομαδοποιήσεις που προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των έξι miRNAs από τον ορό ασθενών που μελετήθηκαν, κατηγοριοποίησαν ασθενείς με διαφορετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και διαφορετικό ανοσολογικό υπόβαθρο. Λαμβάνοντας υπόψη πάντα τους περιορισμούς που τίθενται στη μελέτη μας, όσον αφορά στο μικρό μέγεθος δείγματος, μπορούμε να υποστηρίξουμε πως έχουμε μια «υπογραφή» που για πρώτη φορά, εύκολα και ελάχιστα παρεμβατικά διαχωρίζει τους ασθενείς με διηθητικό, πορογενή, μη μεταστατικό BCa σε τρεις διαφορετικές συστάδες με διακριτά χαρακτηριστικά. Οι «υπογραφές» αυτές μένει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και με την πάροδο του χρόνου, όταν θα έχουμε περισσότερα στοιχεία από την εκτενέστερη κλινική παρακολούθηση των ασθενών αυτών, θα μπορούμε να ελέγξουμε κατά πόσο η «εικόνα» που έχουμε από το περιφερικό αίμα, με τους παράγοντες που προτείνουμε στην παρούσα μελέτη αντικατοπτρίζει το μικροπεριβάλλον του όγκου και αν θα μπορούσε η «υπογραφή» του προοπτικού τμήματος να χρησιμεύσει ως «υγρή βιοψία» δίνοντας και προγνωστική αξία στην «υπογραφή» μας. Συνδυασμός των «υπογραφών» τόσο του αναδρομικού, όσο και του προοπτικού μέρους την μελέτης ελπίζουμε ότι θα αποτελέσουν νέα όπλα στη φαρέτρα μας για τη διάγνωση ή/και πρόγνωση ασθενών με BCa.

7 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

1. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, δημιουργήσαμε ευνοϊκές και δυσμενείς ανοσολογικές «υπογραφές» ως προς την πρόγνωση ασθενών με BCa, βάσει του αριθμού διήθησης και της χωροταξικής κατανομής των CD8+ και CD163+ κυττάρων από το αναδρομικό τμήμα της μελέτης μας. Αυτές οι υπογραφές μένει να αξιολογηθούν, σε συνδυασμό με τις μοριακές «υπογραφές» και τις κατηγοριοποιήσεις ασθενών όπως προέκυψαν από τα miRNAs του ορού που μελετήθηκαν στο προοπτικό τμήμα της μελέτης, σε ένα μεγαλύτερο δείγμα ασθενών αφού έχει περάσει επαρκές χρονικό διάστημα ώστε να έχουμε την κλινική παρακολούθηση και την έκβαση των ασθενών.
2. Πέραν των CD8+ και CD163+ κυττάρων που διηθούν τον όγκο, έχουμε ελέγξει και την παρουσία των CD4+ και FoxP3+ κυττάρων. Ήδη λοιπόν εξετάζουμε και άλλους κυτταρικούς υποπληθυσμούς που πιθανότατα θα βελτιώσουν τις «υπογραφές» που δημιουργήθηκαν. Επίσης στην διεθνή βιβλιογραφία γίνεται πλέον λόγος για την προγνωστική αξία και λόγων κυττάρων πχ CD4/CD8, CD8/CD163 και CD8/FoxP3. Όλοι αυτοί οι συνδυασμοί μπορούν να εξεταστούν και να αξιολογηθούν συνδυαστικά με τα δικά μας δεδομένα τόσο στο κέντρο του όγκου (TC) όσο και στο διηθητικό μέτωπο (IM).
3. Εκτός από το TC και το IM, υπάρχει ένα ακόμα ανατομικό χαρακτηριστικό που συμπληρώνει το μικροπεριβάλλον του όγκου, οι τριτοταγείς λεμφικές δομές- Tertiary Lymphoid Structures (TLS). Αυτές οι δομές είναι αρχιτεκτονικά και λειτουργικά όμοιες με τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Η παρουσία των TLS έχει παρατηρηθεί σε χρόνιες φλεγμονές, αυτοάνοσα νοσήματα και σε καρκίνους και συσχετίζεται με την κλινική έκβαση ασθενών με BCa αλλά και με διάφορες άλλες κακοήθειες. Προκαταρκτικά αποτελέσματα της ομάδας μας υποστηρίζουν πως η ύπαρξη αυτών των δομών παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για το μικροπεριβάλλον του όγκου και βελτιστοποιεί τις «υπογραφές» μας, κάνοντας τις πιο ακριβείς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ehrlich, P., *About the current state of carcinoma research*. Ned Tijdschr Geneesk, 1909. **5**: p. 273–290.
2. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
3. Thomas, L., *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*. Hoeber-Harper, New York, 1959: p. 529–532.
4. Prehn, R.T. and J.M. Main, *Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas*. J Natl Cancer Inst, 1957. **18**(6): p. 769-78.
5. Klein, G., et al., *Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host*. Cancer Res, 1960. **20**: p. 1561-72.
6. Hellstrom, I., et al., *Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms*. Nature, 1968. **220**(5174): p. 1352-4.
7. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
8. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system*. Nature, 1974. **248**(5450): p. 701-2.
9. Zinkernagel, R.M., *Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to Listeria monocytogenes*. Nature, 1974. **251**(5472): p. 230-3.
10. Birkeland, S.A., et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. Int J Cancer, 1995. **60**(2): p. 183-9.
11. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
12. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
13. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
14. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
15. Schatton, T., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis*. Methods Mol Biol, 2014. **1102**: p. 287-324.
16. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
17. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
18. Shankaran, V., et al., *IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
19. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
20. Sharma, P., et al., *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. Cell, 2017. **168**(4): p. 707-723.
21. Nishioka, Y., *Cancer immunotherapy as a promising fourth standard therapy for lung cancer: Beyond 20 years for the development of immunotherapy*. Respir Investig, 2016. **54**(5): p. 297.

22. Hoelder, S., P.A. Clarke, and P. Workman, *Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities*. Mol Oncol, 2012. **6**(2): p. 155-76.
23. Kreamer, K.M., *Immune Checkpoint Blockade: A New Paradigm in Treating Advanced Cancer*. J Adv Pract Oncol, 2014. **5**(6): p. 418-31.
24. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
25. Lesterhuis, W.J., J.B. Haanen, and C.J. Punt, *Cancer immunotherapy--revisited*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(8): p. 591-600.
26. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1432-3.
27. Galluzzi, L., et al., *Classification of current anticancer immunotherapies*. Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12472-508.
28. Traversari, C., et al., *A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1453-7.
29. Coulie, P.G., et al., *A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 35-42.
30. Moingeon, P., *Cancer vaccines*. Vaccine, 2001. **19**(11-12): p. 1305-26.
31. Tartaglia, J., et al., *Therapeutic vaccines against melanoma and colorectal cancer*. Vaccine, 2001. **19**(17-19): p. 2571-5.
32. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
33. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
34. Kansara, M., et al., *Translational biology of osteosarcoma*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 722-35.
35. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
36. Galon, J., et al., *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours*. J Pathol, 2014. **232**(2): p. 199-209.
37. Loi, S., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial*. Ann Oncol, 2014. **25**(8): p. 1544-50.
38. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages, *The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 1883-6.
39. Galon, J., et al., *The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 11-26.
40. Ascierto, P.A., et al., *The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 54.
41. Kerkar, S.P. and N.P. Restifo, *Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3125-30.
42. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers*. Immunol Rev, 2016. **271**(1): p. 260-75.
43. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
44. Fridman, W.H., et al., *Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5601-5.
45. Fridman, W.H., et al., *The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact*. Cancer Microenviron, 2013. **6**(2): p. 117-22.

46. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
47. Lanitis, E., et al., *Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors*. Ann Oncol, 2017. **28**(suppl_12): p. xii18-xii32.
48. Vonderheide, R.H., S.M. Domchek, and A.S. Clark, *Immunotherapy for Breast Cancer: What Are We Missing?* Clin Cancer Res, 2017. **23**(11): p. 2640-2646.
49. Mlecnik, B., et al., *Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 698-711.
50. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 203-13.
51. Bindea, G., et al., *The immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27456.
52. Kirilovsky, A., et al., *Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients*. Int Immunol, 2016. **28**(8): p. 373-82.
53. Giraldo, N.A., et al., *Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(15): p. 4416-4428.
54. Becht, E., et al., *Prognostic and therapeutic impact of molecular subtypes and immune classifications in renal cell cancer (RCC) and colorectal cancer (CRC)*. Oncoimmunology, 2015. **4**(12): p. e1049804.
55. Petitprez, F., et al., *PD-L1 Expression and CD8+ T-cell Infiltrate are Associated with Clinical Progression in Patients with Node-positive Prostate Cancer*. Eur Urol Focus, 2017.
56. Muris, J.J., et al., *Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas*. Leukemia, 2004. **18**(3): p. 589-96.
57. Scott, D.W., et al., *Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(6): p. 692-700.
58. Giraldo, N.A., et al., *Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(13): p. 3031-40.
59. Sautes-Fridman, C., et al., *Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 407.
60. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in cancer prognosis and treatment*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(12): p. 717-734.
61. Xu, B., et al., *Prognostic value of tumor infiltrating NK cells and macrophages in stage II+III esophageal cancer patients*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 74904-74916.
62. Park, M.H., J.S. Lee, and J.H. Yoon, *High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8+ T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma*. J Surg Oncol, 2012. **106**(4): p. 386-92.
63. Kim, S.T., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer*. Am J Clin Oncol, 2013. **36**(3): p. 224-31.
64. West, N.R., et al., *Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(1): p. 155-62.

65. Mohammed, Z.M., et al., *The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer*. Br J Cancer, 2013. **109**(6): p. 1676-84.
66. Seo, A.N., et al., *Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer*. Br J Cancer, 2013. **109**(10): p. 2705-13.
67. de Kruijf, E.M., et al., *Tumor immune subtypes distinguish tumor subclasses with clinical implications in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **142**(2): p. 355-64.
68. Garcia-Martinez, E., et al., *Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(6): p. 488.
69. Mao, Y., et al., *The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152500.
70. Mahmoud, S.M., et al., *Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(15): p. 1949-55.
71. Marrogi, A.J., et al., *Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma*. Int J Cancer, 1997. **74**(5): p. 492-501.
72. Martinet, L., I. Garrido, and J.P. Girard, *Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer*. Oncoimmunology, 2012. **1**(5): p. 789-790.
73. Martinet, L. and J.P. Girard, *Regulation of tumor-associated high-endothelial venules by dendritic cells: A new opportunity to promote lymphocyte infiltration into breast cancer?* Oncoimmunology, 2013. **2**(11): p. e26470.
74. Gu-Trantien, C., et al., *CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival*. J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2873-92.
75. Lee, H.J., et al., *Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Tertiary Lymphoid Structures in HER2-Positive Breast Cancer Treated With Adjuvant Trastuzumab*. Am J Clin Pathol, 2015. **144**(2): p. 278-88.
76. Mahmoud, S.M., et al., *An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **127**(1): p. 99-108.
77. Liu, F., et al., *CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **130**(2): p. 645-55.
78. Bates, G.J., et al., *Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse*. J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5373-80.
79. Gobert, M., et al., *Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 2000-9.
80. Mahmoud, S.M., et al., *Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer*. J Clin Pathol, 2012. **65**(2): p. 159-63.
81. Leek, R.D., et al., *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4625-9.
82. Zhang, Y., et al., *High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76147.

83. Campbell, M.J., et al., *Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **128**(3): p. 703-711.
84. Medrek, C., et al., *The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 306.
85. Diana, A., et al., *Prognostic value, localization and correlation of PD-1/PD-L1, CD8 and FOXP3 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(27): p. 40992-41004.
86. Fukunaga, A., et al., *CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas, 2004. **28**(1): p. e26-31.
87. Tewari, N., et al., *The presence of tumour-associated lymphocytes confers a good prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma: an immunohistochemical study of tissue microarrays*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 436.
88. Hiraoka, N., et al., *Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2015. **112**(11): p. 1782-90.
89. Hiraoka, N., et al., *Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5423-34.
90. Diana, A., et al., *Prognostic role and correlation of CA9, CD31, CD68 and CD20 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 72819-72832.
91. Hou, Y.C., et al., *Coexpression of CD44-positive/CD133-positive cancer stem cells and CD204-positive tumor-associated macrophages is a predictor of survival in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer, 2014. **120**(17): p. 2766-77.
92. Kurahara, H., et al., *Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer*. J Surg Res, 2011. **167**(2): p. e211-9.
93. Zeng, L., et al., *Perineural Invasion and TAMs in Pancreatic Ductal Adenocarcinomas: Review of the Original Pathology Reports Using Immunohistochemical Enhancement and Relationships with Clinicopathological Features*. J Cancer, 2014. **5**(9): p. 754-60.
94. Sugimoto, M., et al., *Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas*. Eur J Cancer, 2014. **50**(11): p. 1900-8.
95. Feichtenbeiner, A., et al., *Critical role of spatial interaction between CD8(+) and Foxp3(+) cells in human gastric cancer: the distance matters*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(2): p. 111-9.
96. Kim, K.J., et al., *Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells and CD8+ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers*. Hum Pathol, 2014. **45**(2): p. 285-93.
97. Hennequin, A., et al., *Tumor infiltration by Tbet+ effector T cells and CD20+ B cells is associated with survival in gastric cancer patients*. Oncoimmunology, 2016. **5**(2): p. e1054598.
98. Ohno, S., et al., *Role of tumor-associated macrophages (TAM) in advanced gastric carcinoma: the impact on FasL-mediated counterattack*. Anticancer Res, 2005. **25**(1B): p. 463-70.
99. Zhang, H., et al., *Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection*. Gastric Cancer, 2015. **18**(4): p. 740-50.

100. Osinsky, S., et al., *Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival*. Clin Transl Oncol, 2011. **13**(2): p. 133-8.
101. Kawahara, A., et al., *Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer*. Oncol Rep, 2010. **24**(2): p. 405-15.
102. Pantano, F., et al., *The role of macrophages polarization in predicting prognosis of radically resected gastric cancer patients*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(11): p. 1415-21.
103. Piras, F., et al., *The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase*. Cancer, 2005. **104**(6): p. 1246-54.
104. Ladanyi, A., et al., *Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(9): p. 1459-69.
105. Messina, J.L., et al., *12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy?* Sci Rep, 2012. **2**: p. 765.
106. Hillen, F., et al., *Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(1): p. 97-106.
107. Ladanyi, A., et al., *FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma*. Pathol Oncol Res, 2010. **16**(3): p. 303-9.
108. Miracco, C., et al., *Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma*. Oncol Rep, 2007. **18**(5): p. 1115-22.
109. Mougiakakos, D., et al., *Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma*. Cancer, 2010. **116**(9): p. 2224-33.
110. Jensen, T.O., et al., *Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(20): p. 3330-7.
111. Correale, P., et al., *Tumor infiltration by T lymphocytes expressing chemokine receptor 7 (CCR7) is predictive of favorable outcome in patients with advanced colorectal carcinoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(3): p. 850-7.
112. Ling, A., et al., *The intratumoural subsite and relation of CD8(+) and FOXP3(+) T lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues*. Br J Cancer, 2014. **110**(10): p. 2551-9.
113. Anitei, M.G., et al., *Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(7): p. 1891-9.
114. Sinicrope, F.A., et al., *Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1270-9.
115. Baker, K., et al., *Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway*. Eur J Cancer, 2007. **43**(3): p. 624-31.
116. Lugli, A., et al., *CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a 'pro-/anti-tumour' approach to tumour host interaction in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(8): p. 1382-92.

117. Menon, A.G., et al., *Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis*. Lab Invest, 2004. **84**(4): p. 493-501.
118. Naito, Y., et al., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3491-4.
119. Prall, F., et al., *Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability*. Hum Pathol, 2004. **35**(7): p. 808-16.
120. Dahlin, A.M., et al., *Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor*. Mod Pathol, 2011. **24**(5): p. 671-82.
121. Nagtegaal, I.D., et al., *Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study*. BMC Cancer, 2001. **1**: p. 7.
122. Pages, F., et al., *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5944-51.
123. Mlecnik, B., et al., *Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction*. J Clin Oncol, 2011. **29**(6): p. 610-8.
124. Remark, R., et al., *Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(15): p. 4079-91.
125. Bindea, G., et al., *Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 782-95.
126. McMullen, T.P., et al., *Survival in rectal cancer is predicted by T cell infiltration of tumour-associated lymphoid nodules*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(1): p. 81-8.
127. Di Caro, G., et al., *Immune-based therapies in pancreatic and colorectal cancers and biomarkers of responsiveness*. Expert Rev Anticancer Ther, 2014. **14**(10): p. 1219-28.
128. Coppola, D., et al., *Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling*. Am J Pathol, 2011. **179**(1): p. 37-45.
129. Frey, D.M., et al., *High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients*. Int J Cancer, 2010. **126**(11): p. 2635-43.
130. Michel, S., et al., *High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability*. Br J Cancer, 2008. **99**(11): p. 1867-73.
131. Salama, P., et al., *Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 186-92.
132. Algars, A., et al., *Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients*. Int J Cancer, 2012. **131**(4): p. 864-73.
133. Chaput, N., et al., *Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II-III colorectal cancer*. Br J Cancer, 2013. **109**(4): p. 1013-22.
134. Forssell, J., et al., *High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1472-9.
135. Khorana, A.A., et al., *Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis*. Cancer, 2003. **97**(4): p. 960-8.
136. Zhou, Q., et al., *The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 13.

137. Herrera, M., et al., *Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(4): p. 437-44.
138. Goc, J., et al., *Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells*. *Cancer Res*, 2014. **74**(3): p. 705-15.
139. Kawai, O., et al., *Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer*. *Cancer*, 2008. **113**(6): p. 1387-95.
140. Obeid, J.M., et al., *Heterogeneity of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in non-small-cell lung cancer: impact on patient prognostic assessments and comparison of quantification by different sampling strategies*. *Cancer Immunol Immunother*, 2017. **66**(1): p. 33-43.
141. Wakabayashi, O., et al., *CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers*. *Cancer Sci*, 2003. **94**(11): p. 1003-9.
142. Hald, S.M., et al., *CD4/CD8 co-expression shows independent prognostic impact in resected non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant radiotherapy*. *Lung Cancer*, 2013. **80**(2): p. 209-15.
143. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(27): p. 4410-7.
144. Germain, C., et al., *Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **189**(7): p. 832-44.
145. Uso, M., et al., *Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers*. *Oncotarget*, 2016. **7**(33): p. 52849-52861.
146. Tao, H., et al., *Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells*. *Lung Cancer*, 2012. **75**(1): p. 95-101.
147. O'Callaghan, D.S., et al., *Tumour islet Foxp3+ T-cell infiltration predicts poor outcome in nonsmall cell lung cancer*. *Eur Respir J*, 2015. **46**(6): p. 1762-72.
148. Shimizu, K., et al., *Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2010. **5**(5): p. 585-90.
149. Petersen, R.P., et al., *Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients*. *Cancer*, 2006. **107**(12): p. 2866-72.
150. Wu, P., et al., *Inverse role of distinct subsets and distribution of macrophage in lung cancer prognosis: a meta-analysis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(26): p. 40451-40460.
151. Welsh, T.J., et al., *Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(35): p. 8959-67.
152. Ohtaki, Y., et al., *Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma*. *J Thorac Oncol*, 2010. **5**(10): p. 1507-15.
153. Ma, J., et al., *The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 112.
154. Ohri, C.M., et al., *Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival*. *Eur Respir J*, 2009. **33**(1): p. 118-26.

155. Ohri, C.M., et al., *The tissue microlocalisation and cellular expression of CD163, VEGF, HLA-DR, iNOS, and MRP 8/14 is correlated to clinical outcome in NSCLC*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21874.
156. Carus, A., et al., *Tumor-associated neutrophils and macrophages in non-small cell lung cancer: no immediate impact on patient outcome*. Lung Cancer, 2013. **81**(1): p. 130-7.
157. Hirayama, S., et al., *Prognostic impact of CD204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma: possible contribution of Cd204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(12): p. 1790-7.
158. Balermipas, P., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer*. Br J Cancer, 2014. **110**(2): p. 501-9.
159. Zancope, E., et al., *Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2010. **39**(2): p. 162-7.
160. Distel, L.V., et al., *Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease*. Oral Oncol, 2009. **45**(10): p. e167-74.
161. Nasman, A., et al., *Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38711.
162. Nguyen, N., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2016. **38**(7): p. 1074-84.
163. Rajjoub, S., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in oropharyngeal cancer*. Ear Nose Throat J, 2007. **86**(8): p. 506-11.
164. Wansom, D., et al., *Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16--associated oropharyngeal cancer*. Laryngoscope, 2012. **122**(1): p. 121-7.
165. Jung, A.C., et al., *CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis*. Int J Cancer, 2013. **132**(2): p. E26-36.
166. Watanabe, Y., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010. **109**(5): p. 744-52.
167. Oudejans, J.J., et al., *High numbers of granzyme B/CD8-positive tumour-infiltrating lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma biopsies predict rapid fatal outcome in patients treated with curative intent*. J Pathol, 2002. **198**(4): p. 468-75.
168. Wirsing, A.M., et al., *Characterisation and prognostic value of tertiary lymphoid structures in oral squamous cell carcinoma*. BMC Clin Pathol, 2014. **14**: p. 38.
169. Badoual, C., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 465-72.
170. Zhang, Y.L., et al., *Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 4.
171. Harasymczuk, M., et al., *Head and neck squamous carcinomas with exophytic and endophytic type of growth have the same prognosis after surgery and adjuvant radiotherapy*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013. **270**(3): p. 1105-14.
172. Sun, D.S., et al., *The correlation between tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells and cyclooxygenase-2 expression and their association with recurrence in resected head and neck cancers*. Med Oncol, 2012. **29**(2): p. 707-13.
173. Liu, S.Y., et al., *Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2008. **44**(3): p. 277-85.

174. Wolf, G.T., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study*. Oral Oncol, 2015. **51**(1): p. 90-5.
175. Lin, J.Y., et al., *Clinical significance of tumor-associated macrophage infiltration in supraglottic laryngeal carcinoma*. Chin J Cancer, 2011. **30**(4): p. 280-6.
176. Gabrielson, A., et al., *Intratumoral CD3 and CD8 T-cell Densities Associated with Relapse-Free Survival in HCC*. Cancer Immunol Res, 2016. **4**(5): p. 419-30.
177. Sun, C., et al., *The predictive value of centre tumour CD8(+) T cells in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with Immunoscore*. Oncotarget, 2015. **6**(34): p. 35602-15.
178. Cai, X.Y., et al., *Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2006. **132**(5): p. 293-301.
179. Gao, Q., et al., *Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection*. J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2586-93.
180. Finkin, S., et al., *Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma*. Nat Immunol, 2015. **16**(12): p. 1235-44.
181. Chen, K.J., et al., *Intratumoral regulatory T cells alone or in combination with cytotoxic T cells predict prognosis of hepatocellular carcinoma after resection*. Med Oncol, 2012. **29**(3): p. 1817-26.
182. Huang, Y., et al., *Tumor-infiltrating FoxP3+ Tregs and CD8+ T cells affect the prognosis of hepatocellular carcinoma patients*. Digestion, 2012. **86**(4): p. 329-37.
183. Tu, J.F., et al., *Regulatory T cells, especially ICOS(+) FOXP3(+) regulatory T cells, are increased in the hepatocellular carcinoma microenvironment and predict reduced survival*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35056.
184. Sasaki, A., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(2): p. 173-9.
185. Mathai, A.M., et al., *Role of Foxp3-positive tumor-infiltrating lymphocytes in the histologic features and clinical outcomes of hepatocellular carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2012. **36**(7): p. 980-6.
186. Li, Y.W., et al., *Tumor-infiltrating macrophages can predict favorable prognosis in hepatocellular carcinoma after resection*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(3): p. 439-49.
187. Kong, L.Q., et al., *The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59771.
188. Dong, P., et al., *CD86(+)/CD206(+), Diametrically Polarized Tumor-Associated Macrophages, Predict Hepatocellular Carcinoma Patient Prognosis*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(3): p. 320.
189. Ding, T., et al., *High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection*. Hum Pathol, 2009. **40**(3): p. 381-9.
190. Jia, J.B., et al., *High expression of macrophage colony-stimulating factor-1 receptor in peritumoral liver tissue is associated with poor outcome in hepatocellular carcinoma after curative resection*. Oncologist, 2010. **15**(7): p. 732-43.
191. Fan, Q.M., et al., *Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2014. **352**(2): p. 160-8.
192. Bachmayr-Heyda, A., et al., *Prognostic impact of tumor infiltrating CD8+ T cells in association with cell proliferation in ovarian cancer patients--a study of the OVCAD consortium*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 422.

193. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
194. Nielsen, J.S. and B.H. Nelson, *Tumor-infiltrating B cells and T cells: Working together to promote patient survival*. Oncoimmunology, 2012. **1**(9): p. 1623-1625.
195. Preston, C.C., et al., *The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80063.
196. Milne, K., et al., *Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6412.
197. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
198. Lan, C., et al., *Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer*. Technol Cancer Res Treat, 2013. **12**(3): p. 259-67.
199. Salvesen, H.B. and L.A. Akslen, *Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas*. Int J Cancer, 1999. **84**(5): p. 538-43.
200. Zhang, M., et al., *A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients*. J Ovarian Res, 2014. **7**: p. 19.
201. Vesalainen, S., et al., *Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(12): p. 1797-803.
202. Ness, N., et al., *Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer*. Prostate, 2014. **74**(14): p. 1452-61.
203. Shimura, S., et al., *Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5857-61.
204. Comito, G., et al., *Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression*. Oncogene, 2014. **33**(19): p. 2423-31.
205. Faraj, S.F., et al., *Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8+ T cells in urothelial carcinoma*. Urology, 2015. **85**(3): p. 703 e1-6.
206. Sharma, P., et al., *CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 3967-72.
207. Otto, W., et al., *First analysis of immune cell infiltration in stage pT1 urothelial bladder carcinoma: CD3 positivity as a prognostic marker for cancer-specific survival*. World J Urol, 2012. **30**(6): p. 875-7.
208. Winerdal, M.E., et al., *FOXP3 and survival in urinary bladder cancer*. BJU Int, 2011. **108**(10): p. 1672-8.
209. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
210. Chai, C.Y., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with focal macrophage infiltration, angiogenesis and unfavourable prognosis in urothelial carcinoma*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 658-64.

211. Sjodahl, G., et al., *Infiltration of CD3(+) and CD68(+) cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors*. *Urol Oncol*, 2014. **32**(6): p. 791-7.
212. Ichimura, T., et al., *Prognostic significance of CD204-positive macrophages in upper urinary tract cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(6): p. 2105-12.
213. Schumacher, K., et al., *Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas*. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 3932-6.
214. Cho, Y., et al., *CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1555-9.
215. Tsutsui, S., et al., *Prognostic significance of immunological parameters in patients with esophageal cancer*. *Hepatogastroenterology*, 1996. **43**(9): p. 501-9.
216. Sugimura, K., et al., *High infiltration of tumor-associated macrophages is associated with a poor response to chemotherapy and poor prognosis of patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer*. *J Surg Oncol*, 2015. **111**(6): p. 752-9.
217. Dutta, S., et al., *The relationship between tumour necrosis, tumour proliferation, local and systemic inflammation, microvessel density and survival in patients undergoing potentially curative resection of oesophageal adenocarcinoma*. *Br J Cancer*, 2012. **106**(4): p. 702-10.
218. Guo, S.J., et al., *Tumor-associated macrophages and CD3-zeta expression of tumor-infiltrating lymphocytes in human esophageal squamous-cell carcinoma*. *Dis Esophagus*, 2007. **20**(2): p. 107-16.
219. Shigeoka, M., et al., *Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(8): p. 1112-9.
220. Yue, Q., et al., *The prognostic value of Foxp3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with glioblastoma*. *J Neurooncol*, 2014. **116**(2): p. 251-9.
221. Han, S., et al., *Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(10): p. 2560-8.
222. Thomas, A.A., et al., *Regulatory T cells are not a strong predictor of survival for patients with glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2015. **17**(6): p. 801-9.
223. Sayour, E.J., et al., *Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2015. **64**(4): p. 419-27.
224. Heimberger, A.B., et al., *Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(16): p. 5166-72.
225. Jacobs, J.F., et al., *Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors*. *J Neuroimmunol*, 2010. **225**(1-2): p. 195-9.
226. Ding, P., et al., *Expression of tumor-associated macrophage in progression of human glioma*. *Cell Biochem Biophys*, 2014. **70**(3): p. 1625-31.
227. Nakano, O., et al., *Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity*. *Cancer Res*, 2001. **61**(13): p. 5132-6.
228. Jensen, H.K., et al., *Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(3): p. 1052-8.
229. Xu, L., et al., *Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(9): p. 3142-50.
230. Dannenmann, S.R., et al., *Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(3): p. e23562.

231. Goeppert, B., et al., *Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer*. Br J Cancer, 2013. **109**(10): p. 2665-74.
232. Nakakubo, Y., et al., *Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(9): p. 1736-42.
233. Oguro, S., et al., *Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer*. Cancer Sci, 2015. **106**(12): p. 1750-60.
234. Paulson, K.G., et al., *CD8+ lymphocyte intratumoral infiltration as a stage-independent predictor of Merkel cell carcinoma survival: a population-based study*. Am J Clin Pathol, 2014. **142**(4): p. 452-8.
235. Paulson, K.G., et al., *Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival*. J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1539-46.
236. Feldmeyer, L., et al., *Density, Distribution, and Composition of Immune Infiltrates Correlate with Survival in Merkel Cell Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(22): p. 5553-5563.
237. Cunha, L.L., et al., *Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **77**(6): p. 918-25.
238. Shurell, E., et al., *Characterizing the immune microenvironment of malignant peripheral nerve sheath tumor by PD-L1 expression and presence of CD8+ tumor infiltrating lymphocytes*. Oncotarget, 2016. **7**(39): p. 64300-64308.
239. Berghoff, A.S., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in brain metastases of small cell lung cancer (SCLC)*. J Neurooncol, 2016. **130**(1): p. 19-29.
240. Kluger, H.M., et al., *Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(13): p. 3052-60.
241. Brunner, S.M., et al., *Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection*. Br J Surg, 2014. **101**(13): p. 1681-91.
242. Halama, N., et al., *Hepatic metastases of colorectal cancer are rather homogeneous but differ from primary lesions in terms of immune cell infiltration*. Oncoimmunology, 2013. **2**(4): p. e24116.
243. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
244. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
245. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
246. Bagga, S., et al., *Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation*. Cell, 2005. **122**(4): p. 553-63.
247. Saetrom, P., et al., *Conserved microRNA characteristics in mammals*. Oligonucleotides, 2006. **16**(2): p. 115-44.
248. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
249. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
250. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
251. Lagos-Quintana, M., et al., *New microRNAs from mouse and human*. RNA, 2003. **9**(2): p. 175-9.
252. Reinhart, B.J., et al., *MicroRNAs in plants*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1616-26.

253. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
254. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
255. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
256. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
257. Winter, J., et al., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 228-34.
258. Lai, E.C., et al., *Computational identification of Drosophila microRNA genes*. Genome Biol, 2003. **4**(7): p. R42.
259. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
260. Xue, J., et al., *MicroRNAs in cancer therapeutic response: Friend and foe*. World J Clin Oncol, 2014. **5**(4): p. 730-43.
261. Mehta, A. and D. Baltimore, *MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(5): p. 279-94.
262. Lu, L.F. and A. Liston, *MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 291-8.
263. Xiao, C. and K. Rajewsky, *MicroRNA control in the immune system: basic principles*. Cell, 2009. **136**(1): p. 26-36.
264. Schwarzenbach, H., et al., *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(3): p. 145-56.
265. Nicoloso, M.S., et al., *MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 293-302.
266. Muller, V., et al., *Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **147**(1): p. 61-8.
267. Madhavan, D., et al., *Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(21): p. 5972-82.
268. Mar-Aguilar, F., C. Rodriguez-Padilla, and D. Resendez-Perez, *Use of serum-circulating miRNA profiling for the identification of breast cancer biomarkers*. Methods Mol Biol, 2014. **1165**: p. 71-80.
269. Sheppard, H.M., et al., *MicroRNA regulation in human CD8+ T cell subsets--cytokine exposure alone drives miR-146a expression*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 292.
270. Xie, G.B., et al., *Evolution of the mir-155 family and possible targets in cancers and the immune system*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(18): p. 7547-52.
271. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
272. Dupont, W.D. and D.L. Page, *Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 146-51.
273. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, *ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics*. BMJ, 2000. **321**(7261): p. 624-8.
274. Worsham, M.J., et al., *Risk factors for breast cancer from benign breast disease in a diverse population*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(1): p. 1-7.
275. Sgroi, D.C., *Preinvasive breast cancer*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 193-221.
276. Johnson, K., D. Sarma, and E.S. Hwang, *Lobular breast cancer series: imaging*. Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 94.

277. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
278. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
279. Gown, A.M., *Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer*. Mod Pathol, 2008. **21 Suppl 2**: p. S8-S15.
280. de Azambuja, E., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. Br J Cancer, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
281. van 't Veer, L.J., et al., *Expression profiling predicts outcome in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(1): p. 57-8.
282. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10393-8.
283. Fragomeni, S.M., A. Sciallis, and J.S. Jeruss, *Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2018. **27**(1): p. 95-120.
284. Prat, A., et al., *Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer*. Oncologist, 2013. **18**(2): p. 123-33.
285. Lesko, L.J. and A.J. Atkinson, Jr., *Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 347-66.
286. Sobin, L.H., *TNM: evolution and relation to other prognostic factors*. Semin Surg Oncol, 2003. **21**(1): p. 3-7.
287. Karve, T.M. and A.K. Cheema, *Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease*. J Amino Acids, 2011. **2011**: p. 207691.
288. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
289. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
290. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
291. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 147-52.
292. Yan, L.X., et al., *MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis*. RNA, 2008. **14**(11): p. 2348-60.
293. Castellano, L., et al., *The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15732-7.
294. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-55.
295. Tahiri, A., M.R. Aure, and V.N. Kristensen, *MicroRNA Networks in Breast Cancer Cells*. Methods Mol Biol, 2018. **1711**: p. 55-81.
296. Bahrami, A., et al., *The prognostic and therapeutic application of microRNAs in breast cancer: Tissue and circulating microRNAs*. J Cell Physiol, 2018. **233**(2): p. 774-786.

297. Zhang, H.D., et al., *CircRNA: a novel type of biomarker for cancer*. Breast Cancer, 2018. **25**(1): p. 1-7.
298. Meng, S., et al., *CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 94.
299. Backes, C., E. Meese, and A. Keller, *Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects*. Mol Diagn Ther, 2016. **20**(6): p. 509-518.
300. Wilk, G. and R. Braun, *Integrative analysis reveals disrupted pathways regulated by microRNAs in cancer*. Nucleic Acids Res, 2017.
301. Piepoli, A., et al., *Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33663.
302. Khare, D., et al., *Plasma microRNA profiling: Exploring better biomarkers for lymphoma surveillance*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187722.
303. Matsuzaki, J. and T. Ochiya, *Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review*. Int J Clin Oncol, 2017. **22**(3): p. 413-420.
304. Boeri, M., et al., *MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3713-8.
305. Cava, C., et al., *Integration of mRNA expression profile, copy number alterations, and microRNA expression levels in breast cancer to improve grade definition*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97681.
306. Spranger, S., *Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment*. Int Immunol, 2016. **28**(8): p. 383-91.
307. Yaacoub, K., et al., *Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression*. Cancer Lett, 2016. **378**(2): p. 150-9.
308. Giraldo, N.A., et al., *The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy*. Virchows Arch, 2015. **467**(2): p. 127-35.
309. Wu, A.A., et al., *Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells*. Oncoimmunology, 2015. **4**(7): p. e1016700.
310. Blonska, M., N.K. Agarwal, and F. Vega, *Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels*. Semin Cancer Biol, 2015. **34**: p. 3-13.
311. Frey, A.B., *Suppression of T cell responses in the tumor microenvironment*. Vaccine, 2015. **33**(51): p. 7393-7400.
312. Xing, Y., et al., *Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment*. FEBS J, 2015. **282**(20): p. 3892-8.
313. Ostuni, R., et al., *Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 229-39.
314. Munn, D.H. and V. Bronte, *Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment*. Curr Opin Immunol, 2016. **39**: p. 1-6.
315. Marvel, D. and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3356-64.
316. Whiteside, T.L., *Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression?* Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(1): p. 67-72.
317. Banwait, J.K. and D.R. Bastola, *Contribution of bioinformatics prediction in microRNA-based cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **81**: p. 94-103.
318. Oulas, A., et al., *Prediction of miRNA targets*. Methods Mol Biol, 2015. **1269**: p. 207-29.

319. Wan, Y., et al., *Understanding the transcriptome through RNA structure*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(9): p. 641-55.
320. Georgakilas, A.G., et al., *Are common fragile sites merely structural domains or highly organized "functional" units susceptible to oncogenic stress?* Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(23): p. 4519-44.
321. Luo, C., et al., *miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 768-775.
322. Frixa, T., S. Donzelli, and G. Blandino, *Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation*. Cancers (Basel), 2015. **7**(4): p. 2466-85.
323. Hata, A. and R. Kashima, *Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2016. **51**(3): p. 121-34.
324. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
325. Tili, E., J.J. Michaille, and C.M. Croce, *MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer*. Immunol Rev, 2013. **253**(1): p. 167-84.
326. Ji, Y., J.D. Hocker, and L. Gattinoni, *Enhancing adoptive T cell immunotherapy with microRNA therapeutics*. Semin Immunol, 2016. **28**(1): p. 45-53.
327. Kikete, S., et al., *Endogenous and tumour-derived microRNAs regulate cross-presentation in dendritic cells and consequently cytotoxic T cell function*. Cytotechnology, 2016. **68**(6): p. 2223-2233.
328. Kuninty, P.R., et al., *MicroRNA Targeting to Modulate Tumor Microenvironment*. Front Oncol, 2016. **6**: p. 3.
329. Jasinski-Bergner, S., O. Mandelboim, and B. Seliger, *The role of microRNAs in the control of innate immune response in cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(10).
330. Paladini, L., et al., *Targeting microRNAs as key modulators of tumor immune response*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**: p. 103.
331. Eichmuller, S.B., et al., *Immune Modulatory microRNAs Involved in Tumor Attack and Tumor Immune Escape*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(10).
332. Gao, F., et al., *miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **431**(3): p. 610-6.
333. Bartoszewski, R., et al., *The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41862-70.
334. Yin, P., et al., *MiR-451 suppresses cell proliferation and metastasis in A549 lung cancer cells*. Mol Biotechnol, 2015. **57**(1): p. 1-11.
335. Liu, Y., et al., *Altered expression profiles of microRNAs in a stable hepatitis B virus-expressing cell line*. Chin Med J (Engl), 2009. **122**(1): p. 10-4.
336. Kulkarni, S., et al., *Genetic interplay between HLA-C and MIR148A in HIV control and Crohn disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(51): p. 20705-10.
337. Cheng, Z., et al., *MiR-152 suppresses the proliferation and invasion of NSCLC cells by inhibiting FGF2*. Exp Mol Med, 2014. **46**: p. e112.
338. Jasinski-Bergner, S., et al., *Clinical relevance of miR-mediated HLA-G regulation and the associated immune cell infiltration in renal cell carcinoma*. Oncoimmunology, 2015. **4**(6): p. e1008805.
339. Jasinski-Bergner, S., et al., *Identification of novel microRNAs regulating HLA-G expression and investigating their clinical relevance in renal cell carcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(18): p. 26866-78.

340. Kim, S., et al., *Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(10): p. 984-91.
341. Kishikawa, T., et al., *Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2739.
342. Paschen, A., J. Baingo, and D. Schadendorf, *Expression of stress ligands of the immunoreceptor NKG2D in melanoma: regulation and clinical significance*. *Eur J Cell Biol*, 2014. **93**(1-2): p. 49-54.
343. Wang, B., et al., *Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2014. **74**(20): p. 5746-57.
344. Xie, J., et al., *Ovarian tumor-associated microRNA-20a decreases natural killer cell cytotoxicity by downregulating MICA/B expression*. *Cell Mol Immunol*, 2014. **11**(5): p. 495-502.
345. Himmelreich, H., et al., *Post-transcriptional regulation of ULBP1 ligand for the activating immunoreceptor NKG2D involves 3' untranslated region*. *Hum Immunol*, 2011. **72**(6): p. 470-8.
346. Min, D., et al., *Downregulation of miR-302c and miR-520c by 1,25(OH)2D3 treatment enhances the susceptibility of tumour cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity*. *Br J Cancer*, 2013. **109**(3): p. 723-30.
347. Wu, D., et al., *Five functional polymorphisms of B7/CD28 co-signaling molecules alter susceptibility to colorectal cancer*. *Cell Immunol*, 2015. **293**(1): p. 41-8.
348. Gong, A.Y., et al., *MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes*. *J Immunol*, 2009. **182**(3): p. 1325-33.
349. Wang, W., et al., *A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma*. *Hum Genet*, 2013. **132**(6): p. 641-8.
350. Wang, X., et al., *Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia*. *Cell Signal*, 2015. **27**(3): p. 443-52.
351. Chen, L., et al., *Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5241.
352. Zhao, L., et al., *The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(29): p. 45370-45384.
353. Xu, S., et al., *miR-424(322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11406.
354. Yang, P., et al., *A functional variant at miR-24 binding site in B7-H2 alters susceptibility to gastric cancer in a Chinese Han population*. *Mol Immunol*, 2013. **56**(1-2): p. 98-103.
355. Cheung, I.Y., et al., *Deep MicroRNA sequencing reveals downregulation of miR-29a in neuroblastoma central nervous system metastasis*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014. **53**(10): p. 803-14.
356. Nygren, M.K., et al., *Identifying microRNAs regulating B7-H3 in breast cancer: the clinical impact of microRNA-29c*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(8): p. 2072-80.
357. Zhao, J., et al., *MicroRNA-187, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, inhibits cell growth and migration though targeting B7-H3*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **438**(2): p. 439-44.

358. Kneitz, B., et al., *Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3*. *Cancer Res*, 2014. **74**(9): p. 2591-603.
359. Trotta, R., et al., *miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells*. *Blood*, 2012. **119**(15): p. 3478-85.
360. Banerjee, A., et al., *Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(1): p. 225-31.
361. Ding, L., et al., *MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2*. *Cell Res*, 2010. **20**(7): p. 784-93.
362. Wu, H., et al., *MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation*. *Cancer Biol Ther*, 2012. **13**(5): p. 281-8.
363. Wang, S., X. Chen, and M. Tang, *MicroRNA-216a inhibits pancreatic cancer by directly targeting Janus kinase 2*. *Oncol Rep*, 2014. **32**(6): p. 2824-30.
364. Cao, X.Y., et al., *DNA methyltransferase3a expression is an independent poor prognostic indicator in gastric cancer*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(25): p. 8201-8.
365. Gregersen, L.H., et al., *MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8836.
366. Moles, R., M. Bellon, and C. Nicot, *STAT1: A Novel Target of miR-150 and miR-223 Is Involved in the Proliferation of HTLV-I-Transformed and ATL Cells*. *Neoplasia*, 2015. **17**(5): p. 449-62.
367. Xu, S., et al., *MicroRNA-124-3p inhibits the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting STAT3*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(3): p. 1385-94.
368. Yuan, L., et al., *IFN-gamma-mediated IRF1/miR-29b feedback loop suppresses colorectal cancer cell growth and metastasis by repressing IGF1*. *Cancer Lett*, 2015. **359**(1): p. 136-47.
369. Chaudhuri, A.A., et al., *MicroRNA-125b potentiates macrophage activation*. *J Immunol*, 2011. **187**(10): p. 5062-8.
370. Liu, Y., et al., *MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN*. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5500-10.
371. Iliopoulos, D., et al., *STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer*. *Mol Cell*, 2010. **39**(4): p. 493-506.
372. Ni, F., et al., *MicroRNA transcriptomes of distinct human NK cell populations identify miR-362-5p as an essential regulator of NK cell function*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 9993.
373. O'Connell, R.M., et al., *Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 111-22.
374. Li, Q.J., et al., *miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection*. *Cell*, 2007. **129**(1): p. 147-61.
375. Naqvi, A.R., et al., *miR-24, miR-30b and miR-142-3p interfere with antigen processing and presentation by primary macrophages and dendritic cells*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 32925.
376. Rodriguez, A., et al., *Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function*. *Science*, 2007. **316**(5824): p. 608-11.
377. O'Connell, R.M., et al., *Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder*. *J Exp Med*, 2008. **205**(3): p. 585-94.
378. He, L., et al., *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1130-4.

379. Suzuki, H.I., et al., *MicroRNA regulons in tumor microenvironment*. *Oncogene*, 2015. **34**(24): p. 3085-94.
380. Yin, Y., et al., *Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: a major link between immune evasion and tumor growth*. *Cell Res*, 2014. **24**(10): p. 1164-80.
381. Yang, P., et al., *TGF-beta-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(3): p. 291-303.
382. Gazieli-Sovran, A., et al., *miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(1): p. 104-18.
383. Lin, R., et al., *Targeting miR-23a in CD8+ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(12): p. 5352-67.
384. Yu, T., et al., *MicroRNA-491 regulates the proliferation and apoptosis of CD8(+) T cells*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30923.
385. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 787-95.
386. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. *Cell*, 2010. **141**(1): p. 39-51.
387. Squadrito, M.L., et al., *MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(7): p. 350-9.
388. Squadrito, M.L., et al., *miR-511-3p modulates genetic programs of tumor-associated macrophages*. *Cell Rep*, 2012. **1**(2): p. 141-54.
389. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(3): p. 189-98.
390. Chen, J., B.C. Wang, and J.H. Tang, *Clinical significance of microRNA-155 expression in human breast cancer*. *J Surg Oncol*, 2012. **106**(3): p. 260-6.
391. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *microRNA involvement in human cancer*. *Carcinogenesis*, 2012. **33**(6): p. 1126-33.
392. Zonari, E., et al., *A role for miR-155 in enabling tumor-infiltrating innate immune cells to mount effective antitumor responses in mice*. *Blood*, 2013. **122**(2): p. 243-52.
393. Nagorsen, D., et al., *Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival*. *J Transl Med*, 2007. **5**: p. 62.
394. Heusinkveld, M. and S.H. van der Burg, *Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 216.
395. Savas, P., et al., *Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(4): p. 228-41.
396. Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(2): p. 259-71.
397. Fortis, S.P., et al., *Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer*. *J Immunother Cancer*, 2017. **5**: p. 39.
398. Anastasopoulou, E.A., et al., *A pilot study in prostate cancer patients treated with the AE37 li-key-HER-2/neu polypeptide vaccine suggests that HLA-A*24 and HLA-DRB1*11 alleles may be prognostic and predictive biomarkers for clinical benefit*. *Cancer Immunol Immunother*, 2015. **64**(9): p. 1123-36.
399. Stokidis, S., et al. *The impact of HLA-A*02 and HLA-A*24 allele expression in prostate cancer prognosis in 3rd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy 2017*. Athens, Greece.

400. Vaxevanis, C., et al. *An IFN- γ response-based algorithm with predictive potential in AE37-vaccinated breast cancer patients* in 3rd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy 2017. Athens, Greece.
401. Voutsas, I.F., et al., *Unraveling the role of preexisting immunity in prostate cancer patients vaccinated with a HER-2/neu hybrid peptide*. *J Immunother Cancer*, 2016. **4**: p. 75.
402. Tang, X., *Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer*. *Cancer Lett*, 2013. **332**(1): p. 3-10.
403. Figel, A.M., et al., *Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(1): p. 436-51.
404. Middel, P., et al., *Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 578.
405. Becht, E., et al., *Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers*. *Adv Immunol*, 2016. **130**: p. 95-190.
406. Oldham, K.A., et al., *T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6*. *Eur Urol*, 2012. **61**(2): p. 385-94.
407. Polimeno, M., et al., *Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma*. *BJU Int*, 2013. **112**(5): p. 686-96.
408. Sharpe, K., et al., *The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(24): p. 6924-34.
409. Miyam, M., et al., *Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer*. *J Transl Med*, 2016. **14**(1): p. 227.
410. Zaretsky, J.M., et al., *Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(9): p. 819-29.
411. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
412. Shukla, S.A., et al., *Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(11): p. 1152-8.
413. Koyama, S., et al., *Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10501.
414. Anagnostou, V., et al., *Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(3): p. 264-276.
415. Mortarini, R., et al., *Impaired STAT phosphorylation in T cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(12): p. 4085-94.
416. Perez, S.A., et al., *Results from a phase I clinical study of the novel li-Key/HER-2/neu(776-790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(13): p. 3495-506.
417. Santamaria, P., *Cytokines and chemokines in autoimmune disease: an overview*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **520**: p. 1-7.
418. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 11-22.

419. Dehqanzada, Z.A., et al., *Assessing serum cytokine profiles in breast cancer patients receiving a HER2/neu vaccine using Luminex technology*. *Oncol Rep*, 2007. **17**(3): p. 687-94.
420. Zhu, X., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of serum cytokine levels in breast cancer*. *Clin Lab*, 2014. **60**(7): p. 1145-51.
421. You, F.P., et al., *Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer*. *Int Immunopharmacol*, 2017. **52**: p. 163-167.
422. Carlsson, A., et al., *Molecular serum portraits in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(34): p. 14252-7.
423. Azenshtein, E., et al., *The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity*. *Cancer Res*, 2002. **62**(4): p. 1093-102.
424. Niwa, Y., et al., *Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(2): p. 285-9.
425. Voronov, E., Y. Carmi, and R.N. Apte, *The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 114.
426. Lewis, A.M., et al., *Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment*. *J Transl Med*, 2006. **4**: p. 48.
427. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
428. Hamam, R., et al., *Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(9): p. e3045.
429. Kai, K., R.L. Dittmar, and S. Sen, *Secretory microRNAs as biomarkers of cancer*. *Semin Cell Dev Biol*, 2017.
430. Fendler, A., et al., *The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours*. *Nat Rev Urol*, 2016. **13**(12): p. 734-752.
431. Lou, W., et al., *MicroRNAs in cancer metastasis and angiogenesis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(70): p. 115787-115802.
432. Sueta, A., et al., *Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence*. *Oncotarget*, 2017. **8**(41): p. 69934-69944.
433. Al-Khanbashi, M., et al., *Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment*. *PLoS One*, 2016. **11**(4): p. e0152032.
434. Kawaguchi, T., et al., *Overexpression of suppressive microRNAs, miR-30a and miR-200c are associated with improved survival of breast cancer patients*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 15945.
435. Jena, M.K., *MicroRNAs in the development and neoplasia of the mammary gland*. *F1000Res*, 2017. **6**: p. 1018.
436. Han, J.G., et al., *A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer*. *Ann Surg Treat Res*, 2017. **92**(2): p. 55-66.
437. Jurkovicova, D., et al., *Down-regulation of traditional oncomiRs in plasma of breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2017. **8**(44): p. 77369-77384.
438. Stuckrath, I., et al., *Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2015. **6**(15): p. 13387-401.
439. Basova, P., et al., *Prediction Potential of Serum miR-155 and miR-24 for Relapsing Early Breast Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).

440. Bayraktar, R. and K. Van Roosbroeck, *miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics*. *Cancer Metastasis Rev*, 2017.
441. Santos, J.C., et al., *Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 829.
442. Kong, W., et al., *Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer*. *Oncogene*, 2014. **33**(6): p. 679-89.
443. Yang, C., et al., *The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(3): p. 843-856.
444. Guo, L.J. and Q.Y. Zhang, *Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening*. *Int J Mol Med*, 2012. **30**(3): p. 680-6.
445. Wu, Q., et al., *Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection*. *Clin Chim Acta*, 2012. **413**(13-14): p. 1058-65.
446. Huo, D., et al., *Identification of a circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2016. **7**(34): p. 55231-55248.
447. Gasparini, P., et al., *microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers*. *Oncotarget*, 2014. **5**(5): p. 1174-84.
448. Perez, E.A., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(33): p. 3744-52.
449. Wu, H., et al., *miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells*. *PLoS One*, 2007. **2**(10): p. e1020.
450. Huffaker, T.B., et al., *Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity*. *Cell Rep*, 2012. **2**(6): p. 1697-709.
451. Hippen, K.L., et al., *Effects of MicroRNA on Regulatory T Cells and Implications for Adoptive Cellular Therapy to Ameliorate Graft-versus-Host Disease*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 57.
452. So, A.Y., J.L. Zhao, and D. Baltimore, *The Yin and Yang of microRNAs: leukemia and immunity*. *Immunol Rev*, 2013. **253**(1): p. 129-45.
453. Lu, L.F., et al., *Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein*. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 80-91.
454. Baxevanis, C.N. and S.A. Perez, *Cancer Dormancy: A Regulatory Role for Endogenous Immunity in Establishing and Maintaining the Tumor Dormant State*. *Vaccines (Basel)*, 2015. **3**(3): p. 597-619.
455. Perry, M.M., et al., *Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1beta-induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(20): p. 3349-55.
456. Testa, U., et al., *miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development*. *Non-Coding RNA*, 2017. **3**(3): p. 1-22.
457. Perry, M.M., et al., *Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5689-98.
458. Sohel, M.H., *Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges*. *Achievements in the Life Sciences*, 2016. **10**(2): p. 175-186.
459. Nagata, Y., et al., *Clinical significance of HLA class I alleles on postoperative prognosis of lung cancer patients in Japan*. *Lung Cancer*, 2009. **65**(1): p. 91-7.
460. De Petris, L., et al., *Correlation between HLA-A2 gene frequency, latitude, ovarian and prostate cancer mortality rates*. *Med Oncol*, 2004. **21**(1): p. 49-52.
461. Jarry, J., et al., *The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions*. *Mol Oncol*, 2014. **8**(4): p. 819-29.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

9 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

9.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι -ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<i>Συντμήσεις</i>	
APC	Antigen-Presenting Cell
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase
BCa	Breast Cancer
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-xL	B-Cell Lymphoma-Extra Large
BLIMP-1	PR Domain Zinc Finger Protein 1
CAFs	Chromatin Assembly Factor
ccRCC	Clear Cell Renal Cell Carcinoma
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
cDNA	Complementary DNA
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia
CRC	Colorectal Cancer
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen 4
CTLs	Cytotoxic T Cell
DAP	Diaminobenzidine
DCs	Dendritic Cell
DFS	Disease-Free Survival
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ER	Estrogen Receptors
FCIS	Favorable Combined Immune Signatures
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
GDP	Guanosine Diphosphate
GITR	Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor
GTP	Guanosine Triphosphate
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	Hazard Ratio
HBV	Hepatitis B Virus
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM	Invasive Margin
IMiD	Immunomodulatory Drug
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
LN	Lymph Node
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor

MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC Class I Chain-Related Gene A
miRNAs	Micrnas
mRNA	Messenger RNA
NK	Natural Killer (Cell)
NKG2D	Natural-Killer Group 2, Member D
NKT	Natural Killer T Cell
NLR	NOD-Like Receptor
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
OS	Overall Survival
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PFS	Progression-Free Survival
PR	Progesteron Receptors
PRR	Pattern Recognition Receptor
Rag2	Recombination Activating Gene 2
rIL-2	Recombinant Interleukin-2
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid
ROCK2	Rho-Associated Protein Kinase 2
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
RAN	Ras-Related Nuclear Protein
siRNA	Small Interfering RNA
TAM	Tumor-Associated Macrophages
TC	Tumor Center
TCF1	T Cell Factor 1
TCR	T-Cell Receptor
TdLNs	Tumor-Draining Lymph Nodes
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TILs	Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TLR	Toll-Like Receptor
TLS	Tertiary Lymphoid Structures
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNF-α	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	Tnf-Related Apoptosis Inducing Ligand)
Treg	T Regulatoty (Cell)
TAA	Tumor-Associated Antigens
UCIS	Unfavorable Combined Immune Signatures
UTR	Untranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
1MT	1-Methyltryptophan

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer

Sotirios P. Fortis^{1†}, Michael Sofopoulos^{2†}, Nectaria N. Sotiriadou², Christoforos Haritos¹, Christoforos K. Vaxevanis¹, Eleftheria A. Anastasopoulou¹, Nicole Janssen³, Niki Arnogiannaki², Alexandros Ardavanis⁴, Graham Pawelec³, Sonia A. Perez^{1*†} and Constantin N. Baxevanis^{1†}

Abstract

Background: Tumor immune cell infiltrates are essential in hindering cancer progression and may complement the TNM classification. CD8+ and CD163+ cells have prognostic impact in breast cancer but their spatial heterogeneity has not been extensively explored in this type of cancer. Here, their potential as prognostic biomarkers was evaluated, depending on their combined densities in the tumor center (TC) and the tumor invasive margin (IM).

Methods: CD8+ and CD163+ cells were quantified by immunohistochemistry of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples from a cohort totaling 162 patients with histologically-confirmed primary invasive non-metastatic ductal breast cancer diagnosed between 2000 and 2015. Clinical follow-up (median 6.9 years) was available for 97 of these patients.

Results: Differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the combined TC and IM compartments (i.e., high(H)/low(L), respectively for CD8+ cells and the reverse L/H combination for CD163+ cells) were found to have significant prognostic value for survival, and allowed better patient stratification than TNM stage, tumor size, lymph node invasion and histological grade. The combined evaluation of CD8+ and CD163+ cell densities jointly in TC and IM further improves prediction of clinical outcomes based on disease-free and overall survival. Patients having the favorable immune signatures had favorable clinical outcomes despite poor clinicopathological parameters.

Conclusions: Given the important roles of CD8+ and CD163+ cells in regulating opposing immune circuits, adding an assessment of their differential densities to the prognostic biomarker armamentarium in breast cancer would be valuable. Larger validation studies are necessary to confirm these findings.

Trial registrations: Study code: IRB-ID 6079/448/10-6-13

Date of approval: 10/06/2013

Retrospective study (2000–2010)

First patient prospectively enrolled 14/2/2014

Keywords: Breast cancer, Tumor infiltration, CD8, CD163, Immunoscoring, Prognostic signature

Correspondence: perez@ciic.gr

[†]Equal contributors

¹Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Fortis et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2017) 5:39

Page 2 of 12

Background

Breast cancer (BCa) is the most common malignancy in women worldwide and is the second leading cause of female cancer deaths [1]. Although systemic therapies have increased survival rates for BCa patients, still there is considerable variation in response rates among patients with distinct clinicopathological parameters which encourages the search for novel prognostic factors contributing to the development of novel treatment options across the different molecular subtypes of BCa. Recent advances in the field of oncoimmunology imply that patients' pre-existing tumor-specific immunity in the form of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) has a substantial effect on disease progression, thus functioning as potential prognostic biomarkers [2]. Particularly, in colorectal cancer, the type, density and location of TILs (i.e., the "immunoscore") has been proposed as a more reliable prognostic biomarker than the standard AJCC/UICC TNM-classification [3]. Moreover, results from clinical trials have reported that a robust "immunoscore" predicts responses to therapies, which suggests that the adaptive immune response intratumorally may also function as a predictive biomarker [4].

CD8⁺ T cells comprise an essential component of the cellular immune system and are indispensable for cell-mediated antitumor immune responses. The presence of CD8⁺ T-cells in the tumor microenvironment of BCa patients is associated with favorable outcomes in certain molecular subtypes [5]. CD8 is also expressed on a subset of NK cells [6] and a small subpopulation of iNKT cells [7], although their possible presence among CD8⁺ TILs has not been evaluated. CD163 is a scavenger receptor upregulated by tumor-associated M2 macrophages in an anti-inflammatory tumor microenvironment. CD163 has also been detected in some cancer cells; however these cells are considered as the result of fusion between macrophages and cancer cells [8, 9]. In human malignancies [10], also including BCa [11], the presence of CD163⁺ M2 macrophages in the tumor stroma correlated with poor overall survival, while contrasting data have been reported for colorectal cancer [12]. In a recent study, localization of CD163⁺ cells in the tumor stroma, but not the tumor nest was shown to be of clinical relevance for patients with BCa [13]. In contrast, there are studies of BCa patients with different molecular subtypes showing that both stromal as well as intratumoral TILs are equally predictive for clinical outcome [14, 15].

Notwithstanding the general consensus that TILs have a prognostic value in BCa, there remain several issues which hinder their broad application as biomarkers in the routine setting. These include the identification of

immune cell populations with the most clinical relevance, their distribution in specific tumor regions and the mode of their evaluation (separate or combined) [16, 17]. Spatial distribution of immune cells in the tumor microenvironment is clinically important, as not only their densities and functions, but also their localization in the different tumor compartments has been associated with clinical outcome [18–21]. Moreover, tumor infiltration by immune cells is a dynamic process with TILs migrating to distinct tumor areas depending on tumor growth properties and factors released by the tumor and cells of the tumor stroma. This heterogeneity suggests that their separate and combined evaluation in well-defined tumor regions would be valuable [14, 20]. To this end, Pagès et al.

[22] reported that a combined assessment of the memory (CD45RO⁺) and cytotoxic phenotypes in TC and IM could increase the accuracy of prediction of clinical outcome for different patient groups in colorectal cancer. However, in evaluations of immune infiltration in BCa, to the best of our knowledge there have been no reports on the differential distribution of immune cells in these tumor compartments and their combined evaluation as reliable prognostic/predictive biomarkers. Most recently, Miyan et al. [23]

developed a scoring system based on the differential densities of CD3⁺ and CD8⁺ in the TC and IM with the aim of distinguishing between different molecular subtypes of BCa, but they did not address the clinical relevance of such an immunoscore.

In the present study, we aimed to evaluate whether assessment of CD8⁺ and CD163⁺ cell densities in single or combined tumor regions (TC and IM) improves the prognostic value of immunoscore in BCa and allows refinement of conventional prognostic parameters.

Methods

Patient selection and characteristics

A total of 162 tissue samples were available from women with histologically-confirmed invasive BCa, diagnosed between 2000 and 2015. Patients with invasive ductal carcinoma were enrolled; patients with tumors directly extending to the chest wall and/or to the skin (ulceration or skin nodules), metastatic disease or bilateral BCa at diagnosis, prior history of any kind of malignant tumor, treatment with any type of neoadjuvant therapy, were excluded from the study. The study was approved by the Institutional Review Board of St. Savas Cancer Hospital (IRB-ID 6079/448/ 10-6-13).

Assessment of tumor-infiltrating leukocytes

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks were obtained from the archives of the St. Savas

Pathology Department. Hematoxylin-Eosin (HE)-stained slides were reviewed by two independent breast pathologists in order to select the most representative slide for each tumor. Sections (4–5 μm) were stained with either CD8 (SP16, 1:80; Thermo Scientific, USA), or CD163 (10D6, 1:400; Biocare). Staining by the antibodies was initially optimized on tonsil tissues (hyperplastic tonsil from tonsillectomy). Immunostaining was performed using the Leica Bond III automation (Leica Biosystems, Germany) and Leica detection kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK). The protocol included 30-min high-pH epitope retrieval in the case of CD163 and a low-pH retrieval in the case of CD8, followed by 30 min incubation with the primary antibodies. Reactions were developed with the use of diaminobenzidine (DAB) and sections were counterstained with HE.

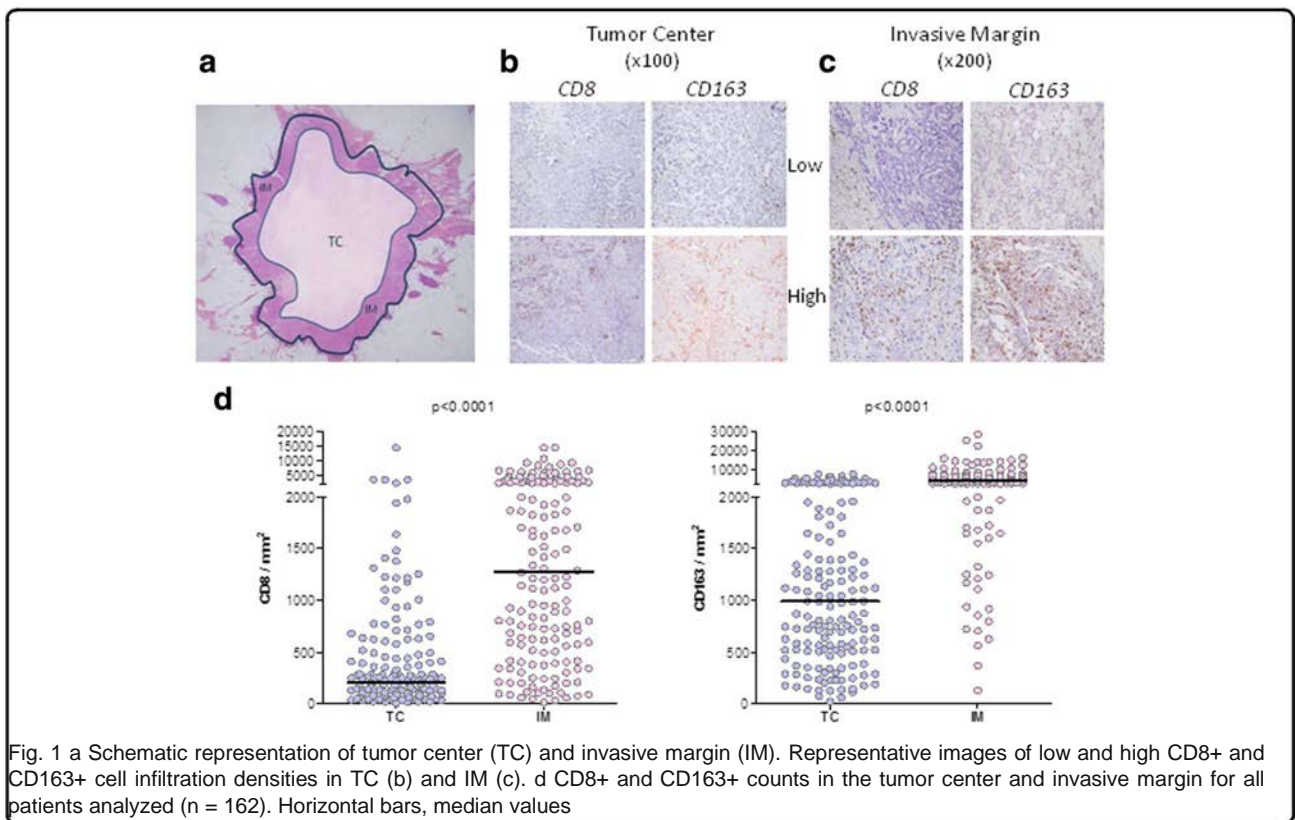
Microphotographs from each slide stained with CD8 and CD163 were captured at 12 M resolution (3840 × 3072 pixels) with a Nikon DXM-1200 Digital Eclipse Camera on a Nikon Eclipse E800 microscope with E Plan Achromat Objectives. The software used was Automatic Camera Tamer (ACT-1) Version 2. White balance was calibrated before image capture. The images were saved as JPG at 95% quality without any kind of image processing. Three photographs were captured from the central part (TC) of each tumor at ×100 magnification and three to six at higher magnification (×200), from the

tumor infiltrative margins (IM) (Fig. 1a). Representative images are presented in Fig. 1b and c).

The analysis of images and quantification of infiltrating cells was performed using Adobe Photoshop CS6 and ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Using Adobe Photoshop CS6 we picked the exact color(s) of positive cells for each marker and then converted the image to black-and-white. The images were analyzed with ImageJ software as the percentage of the surface covered by the specifically stained cells. For each infiltrating subpopulation, visual enumeration in ten representative samples was performed by two independent researchers. Finally, the surface coverage was converted to absolute numbers of infiltrating cells per mm². Median values of infiltrating cells obtained from all TC or IM photos for each patient were recorded and evaluated in further analyses.

Statistical analysis

Chi-square or Fisher’s exact test and Mann Whitney t test statistical analyses were performed by GraphPad Prism v.5.0 software. The same software was used for cumulative survival probabilities testing by Kaplan-Meier analysis with 95% confidence intervals (95%-CIs) and comparison using log rank and Gehan Breslow tests. Hazard ratios were determined using the Cox proportional hazards model. Forward stepwise selection was



used in order to exclude less significant covariates, leading to our final model. Multivariate analysis was performed using IBM SPSS statistics 22 software. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Patient characteristics

The clinicopathological characteristics of the 162 patients are presented in Table 1. Clinical follow-up data were available for 97 patients (diagnosed from 2000 to 2010), with a median follow-up period of 6.88 years (range: 0.11-10 years). Patients developing loco-regional recurrence or a second primary cancer were excluded from the clinical outcome analyses.

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients

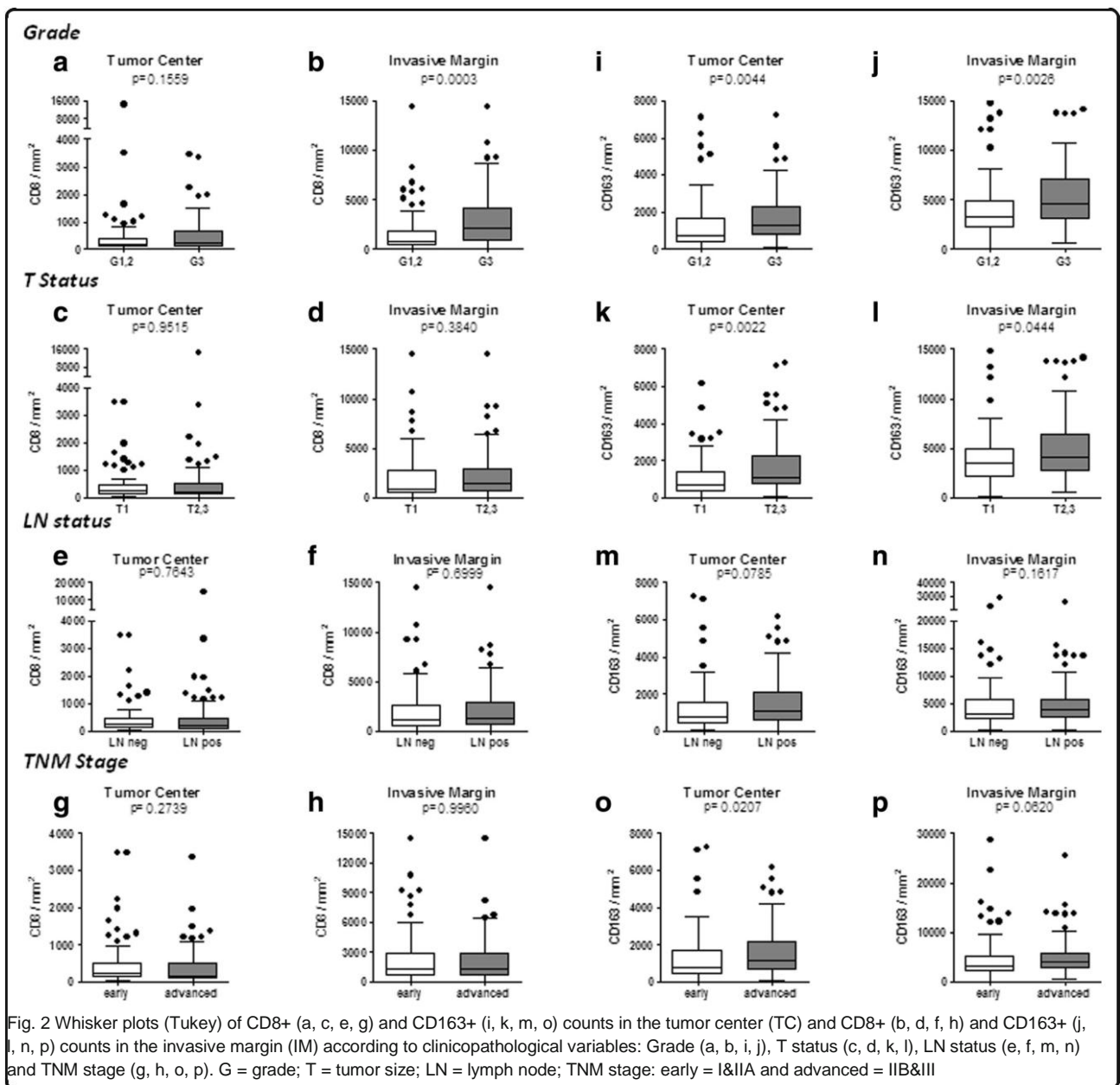
Total Number of Patients	
n = 162	
Median age (years)	Range
54	27–78
Tumor size	n
Tx	1
T1	70
T2	81
T3	10
LN status	n
N0	64
N1	56
N2	32
N3	10
AJCC stage (TNM)	n
I	45
IIA	38
IIB	34
IIIA	34
IIIB	X ^a
IIIC	11
Grade	n
1	4
2	86
3	72
Hormone receptor	n
positive	127
negative	35
HER-2/neu	n
positive	41
negative	121

^aStage IIIB patients were not eligible

Density and intratumoral distribution of CD8+ and CD163+ immune cells in defined tumor regions in BCa patients: correlations with clinicopathological features and clinical outcome

Initially, we have counted separately CD8+ and CD163+ cells for both the TC and IM and found significant differences in their absolute numbers distributed within these compartments. On average, the IM contained higher numbers of both cell types than the TC. This was shown for the total patient population (Fig. 1d) as well as for patient subgroups stratified by grade (Fig. 2a, b, i, j), T status (Fig. 2c, d, k, l), node status (Fig. 2e, f, m, n) and TNM pathological stage (Fig. 2g, h, o, p). We also evaluated as-sociations between absolute counts of CD8+ and CD163+ cells in TC and IM regions with the patients' histological grade, tumor size, lymph node status and pathological stage. The prevalence of CD8+ TILs was higher in poorly-differentiated (histological grade 3) vs grade1,2 tumors both in TC (trend) and IM (highly significant) (Fig. 2a, b). No correlation was found between CD8+ infiltration and T, LN status or disease stage (Fig. 2c-h). Intratumoral CD163+ cell counts in TC and IM were also higher in patients with grade 3 tumors (Fig. 2i, j), with T2,3 stage (Fig. 2k, l) or with positive lymph nodes (Fig. 2m, n) and also in patients with more advanced disease (stages IIB, III) (Fig. 2o, p). These data indicate an association of high absolute numbers of CD163+ cells with a worse patient prognosis.

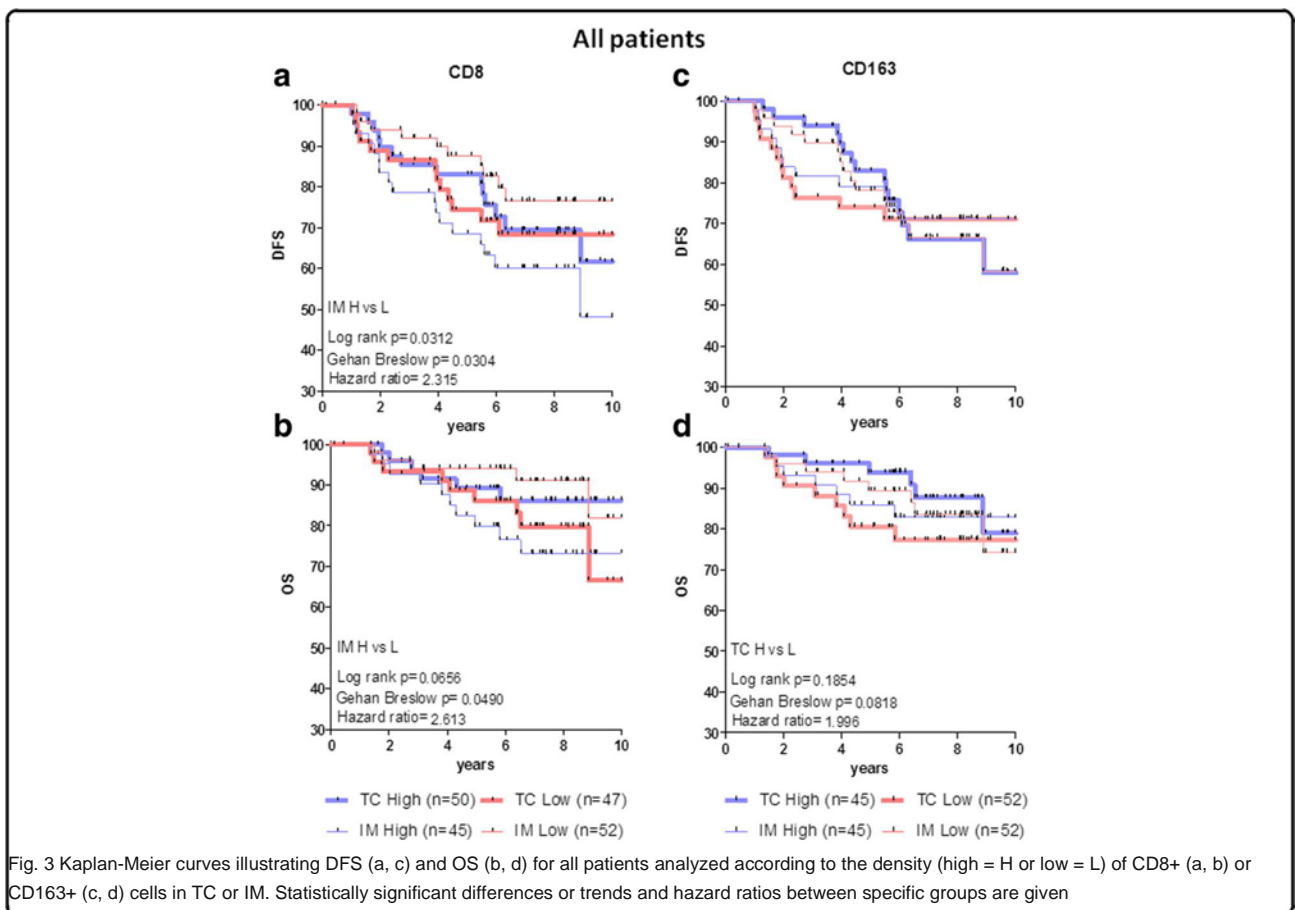
Next, we examined the association between CD8 or CD163 densities, separately in TC or IM, with clinical outcomes using the median value to delineate low (L) from high (H) density. Thus, we considered cell densities as L or H when these were below or above the median value for the respective subset from all tissues analyzed. Retrospective analyses in the total patient population with follow-up (n = 97), revealed that tumors from patients with longer DFS had significantly lower CD8+ immune cell densities within IM (CD8+ IM L), than tumors from patients who recurred more frequently (Fig. 3a). This latter group had high IM CD8+ cell densities (CD8+ IM H) and significantly reduced DFS (Fig. 3a). In contrast, no significant differences in DFS were found for patients with high or low CD8+ cell densities in the TC (Fig. 3a). There was a strong trend for improved OS in patients with CD8+ IM L vs CD8+ IM H which reached borderline significance by Gehan Breslow analysis (Fig. 3b). CD163+ cell densities in each tumor region (TC or IM) did not allow the stratification of patients into groups with statistically different DFS (Fig. 3c) or OS (Fig. 3d). We also assessed the association of CD8+ and CD163+ cell densities with DFS and OS in subgroups of patients stratified by clinicopathological variables. Kaplan-Meier curves for both DFS and OS showed strong trends for or even significantly better



clinical outcomes among groups of patients with favorable vs poor standard clinicopathological parameters (Additional file 1: Figure S1). However, these differences in recurrences and survival were based on the standard TNM staging regardless of the immune cell densities in the different tumor regions, because neither CD8+ nor CD163+ cell densities either in TC or IM had a significant prognostic value when examined separately (Additional file 1: Figures S2–S5). These data suggest that separate analyses of either CD8+ or CD163+ cell densities in single tumor regions are not useful prognostic biomarkers for tumor recurrence and survival in patients with early or advanced BCa.

Assessment of CD8+ or CD163+ cell densities in the combined tumor regions

Previous reports [18, 22] showed the usefulness of an immune score that is based on the evaluation of TILs in combined tumor regions (TC and IM) for the accurate prediction of tumor recurrence and survival in early stage patients with colorectal cancer. Based on this concept, we investigated whether the analysis of CD8+ and CD163+ cell densities combined in TC and IM could improve the prediction of risk for re-currence or survival also in BCa. For the CD8 marker, the combined analysis of TC plus IM regions with high density in TC and low density in IM (CD8+ HL)



versus the reverse combination (low density in TC and high density in IM (CD8+ LH)) allowed a more accurate discrimination for both DFS and OS for the different patient groups; patients with CD8+ HL had a better prog-nosis than CD8+ LH patients (Fig. 4a, b). In contrast, low CD163+ cell densities in TC combined with high densities in the IM (i.e., CD163+ LH) versus the inverse CD163+ HL, were correlated with strong trends for improved clinical outcome (both DFS and OS; Fig. 4c, d).

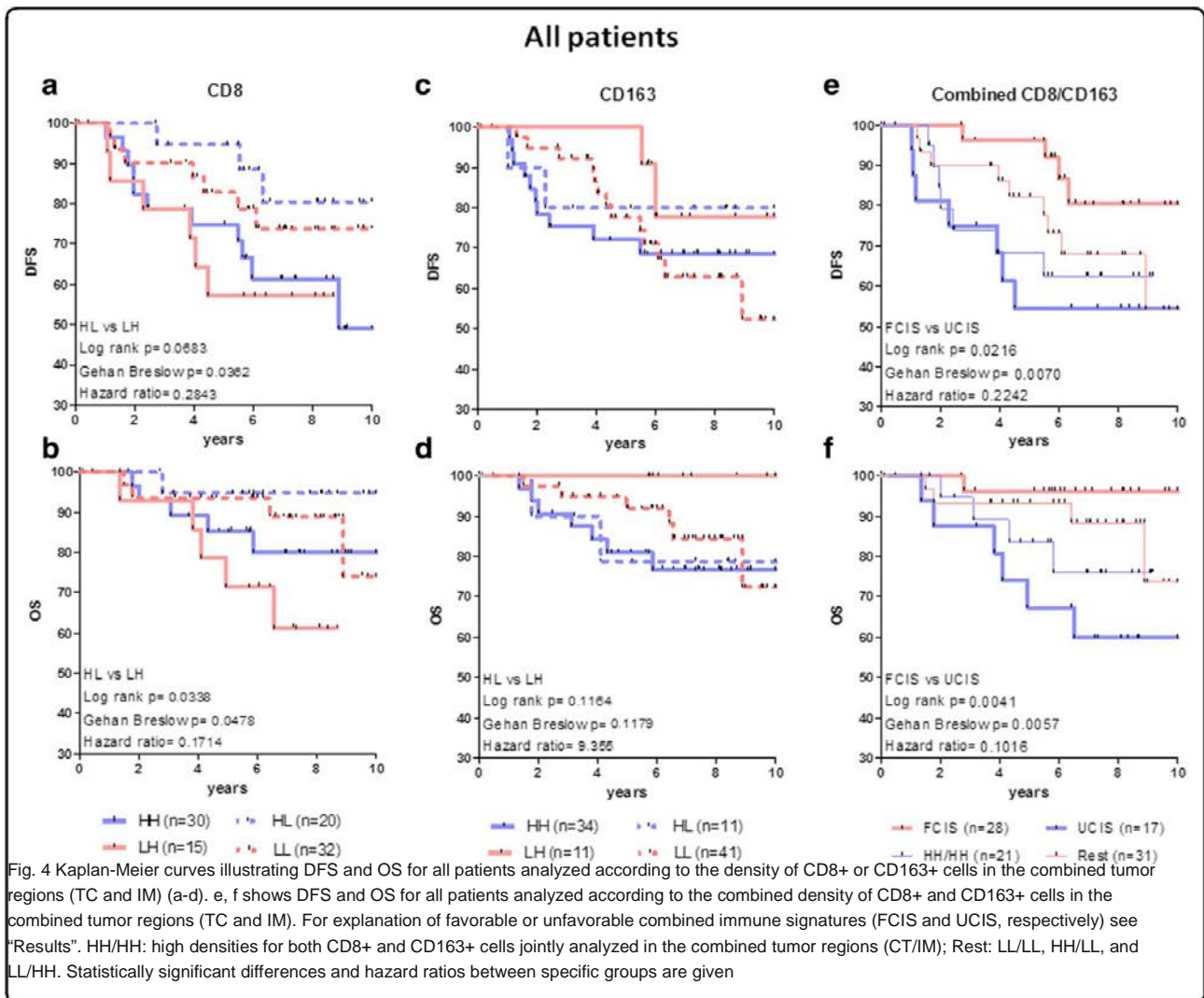
Joint assessment of CD8+ and CD163+ cell densities in the combined tumor regions

The data thus far show that the differential distribution of each immunologic cell marker (CD8+ or CD163+) in the combined tumor regions has a potential prognostic value for both DFS and OS as clinical endpoints. Next, we determined whether a combined evaluation of spatial distribution of CD8+ and CD163+ cell densities in TC and IM could increase the prognostic power for clinical outcome. This type of analyses compared patients with favorable CD8+ HL or CD163+ LH cell densities or both (assigned as the group with the favorable combined immune signatures (FCIS)) and patients having tumors with unfavorable CD8+ LH densities (excluding concomitant CD163+ LH

densities) or unfavorable CD163+ HL densities (excluding concomitant CD8+ HL densities), or both. This latter group was assigned as having the unfavorable combined immune signatures (UCIS). We found a more profound discrimination which was highly significant for both DFS and OS among patients having the FCIS versus those who had the UCIS. The estimated 5-year rates for both DFS and OS for patients with the FCIS was 96.3% compared to 54.5% DFS and 67.3% OS rates for those having the UCIS (Fig. 4e, f). Also in this type of analyses, the homogeneous distribution in both tumor regions (i.e., combined CD8+/CD163+ high and/or low cell densities in both TC and IM; HH/HH, LL/LL, HH/LL and LL/HH), could not significantly discriminate for DFS or OS (Fig. 4e, f). In fact, the LL/LL, HH/LL and LL/HH signatures showed a similar trend for improved clinical outcomes, albeit inferior to the FCIS; they were therefore grouped together as the "rest".

CD8+ and CD163+ intratumoral cell densities and their correlation with clinical outcome in BCa patients stratified by clinicopathological characteristics

We focused subsequent analyses on CD8+ and CD163+ cells hypothesizing that this intratumoral immune signature could improve the prognostic impact of established



clinico-pathological parameters. Assuming that the differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the combined tumor regions represent different levels of antitumor immunity, we sought to explore whether the favorable signatures, identified in the total patient population, could also have prognostic value for clinical outcome in subgroups of patients who were at high or low risk for recurrence according to standard clinico-pathological parameters. For this, we evaluated the prognostic effect of the favorable CD8+ HL and CD163+ LH immune signatures after stratifying the patients by histological grade (Additional file 1: Figure S6A-D), T (Additional file 1: Figure S7A-D) and lymph-node (Additional file 1: Figure S8A-D) status and pathological stage (Additional file 1: Figure S9A-D). Similarly to what was observed for the total patient population, in all stratified groups patients with CD8 HL and patients with CD163 LH, indeed, exhibited better DFS and OS.

Because our results showed a strong association between combined differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the tumor compartments TC and IM (i.e., FCIS and UCIS) and clinical outcome in the total patient population (Fig. 4e, f), we also evaluated the prognostic significance of this immune signatures in the same patients stratified by clinico-pathological parameters. We found that FCIS strongly correlated with a favorable prognosis regardless of poor standard clinico-pathological parameters (Fig. 5a-h). Conversely, UCIS always correlated with a poor prognosis in these groups of patients (Fig. 5a-h and Table 2). Importantly, clinical outcomes (both DFS and OS) for patients with high risk of recurrence having the FCIS were almost indistinguishable from those observed in patients with more favorable clinico-pathological parameters (i.e., grade 3 vs 1,2; T2,3 vs T1 status; node positive vs negative; and advanced vs early stage, respectively).

Further analyses within each group of patients with worse clinico-pathological characteristics revealed that

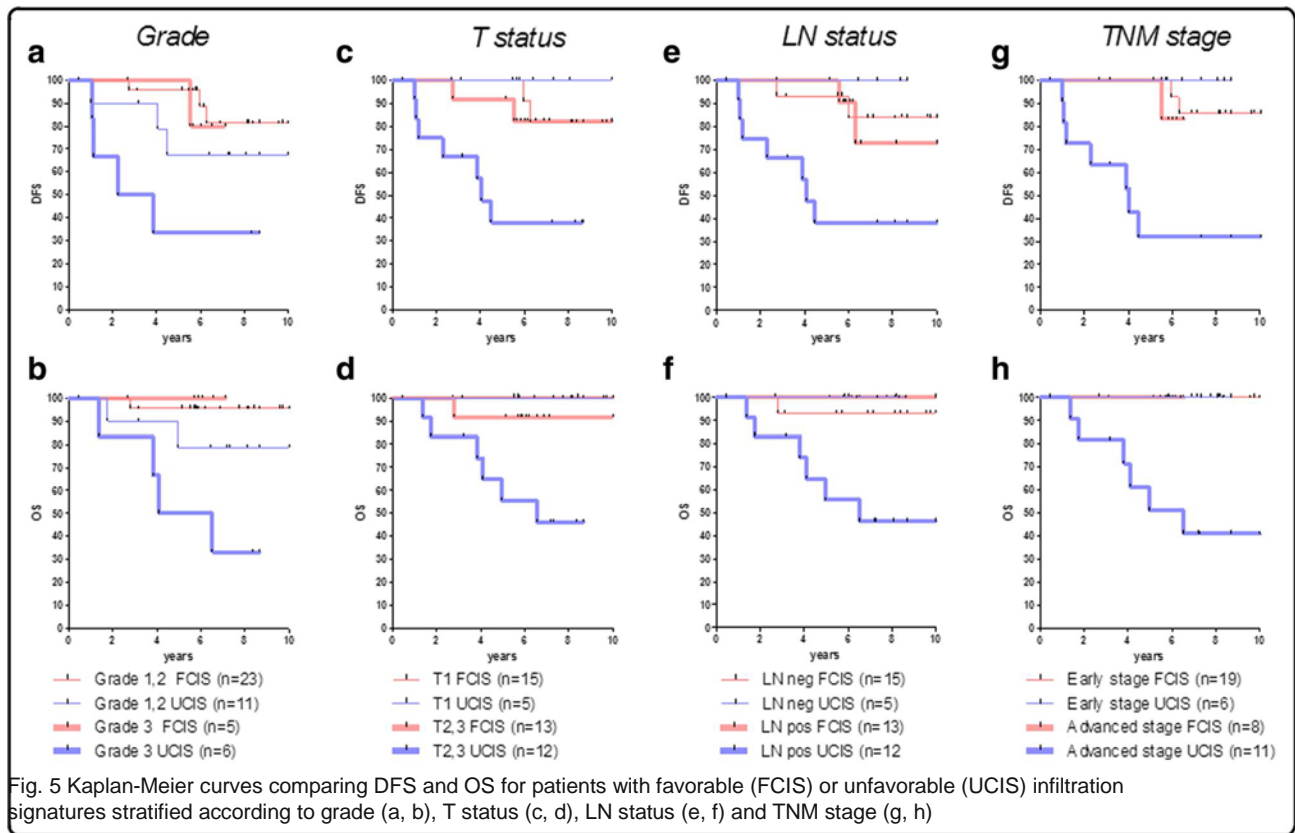


Fig. 5 Kaplan-Meier curves comparing DFS and OS for patients with favorable (FCIS) or unfavorable (UCIS) infiltration signatures stratified according to grade (a, b), T status (c, d), LN status (e, f) and TNM stage (g, h)

the “rest” (i.e., LL/LL, LL/HH, HH/LL) and HH/HH immune signatures did not have a significant prognostic value for clinical outcome (Additional file 1: Figures S6E, F, S7E, F, S8E, F and S9E, F).

Inverse relationship between FCIS and state of disease

To better understand the relationship between the in situ immune reaction, as represented by the FCIS and UCIS, with the different histopathologic parameters, we analyzed the percentages of patients expressing these signatures at each histopathologic stage. In this analysis, we included all patients (total n = 162). We observed an inverse correlation Table 2 DFS and OS comparisons in stratified groups of patients with favorable and unfavorable signatures

between the number of patients expressing the FCIS and tumor grade, T and nodal status and TNM stage (Fig. 6). In addition, there was a gradual decrease in the number of FCIS-positive patients from low to high grade tumors, T1 to T3, non-infiltrated with moderate-to-high infiltrated lymph-nodes and early-to-advanced stages (Fig. 6).

Multivariate analysis of patient DFS and OS according to clinicopathological parameters and combined immune signatures

Results from the multivariate analysis are presented in Table 3. We performed this analysis by initially including

Groups compared	DFS			OS				
	Hazard Ratio	95% CI of ratio	Log rank p	Gehan Breslow p	Hazard Ratio	95% CI of ratio	Log rank p	Gehan Breslow p
Grade 3 FCIS vs UCIS	0.2095	0.03457 to 1.270	0.0891	0.0719	0.1438	0.01995 to 1.036	0.0543	0.0589
FCIS Grade 3 vs Grade 1,2	1.604	0.1247 to 20.63	0.717	0.6238	0.2931	0.001887 to 45.53	0.6336	0.6336
T2,3 status FCIS vs UCIS	0.1924	0.04993 to 0.7417	0.0167	0.0139	0.2015	0.04510 to 0.9000	0.0359	0.0462
FCIS T2,3 vs T1	1.684	0.2194 to 12.92	0.6162	0.3775	9.488	0.1837 to 490.0	0.2636	0.2636
LN pos FCIS vs UCIS	0.1865	0.04807 to 0.7233	0.0152	0.0054	0.1035	0.02048 to 0.5231	0.0061	0.0070
FCIS LN pos vs LN neg	1.375	0.1876 to 10.08	0.754	0.9229	0.1653	0.003201 to 8.537	0.3711	0.3711
Advanced stage FCIS vs UCIS	0.1854	0.04531 to 0.7587	0.0191	0.0155	0.1584	0.02981 to 0.8417	0.0306	0.0336
FCIS Adv. stage vs Early stage	3.369	0.1545 to 73.43	0.4399	0.2995	0	0 to 0	1	1

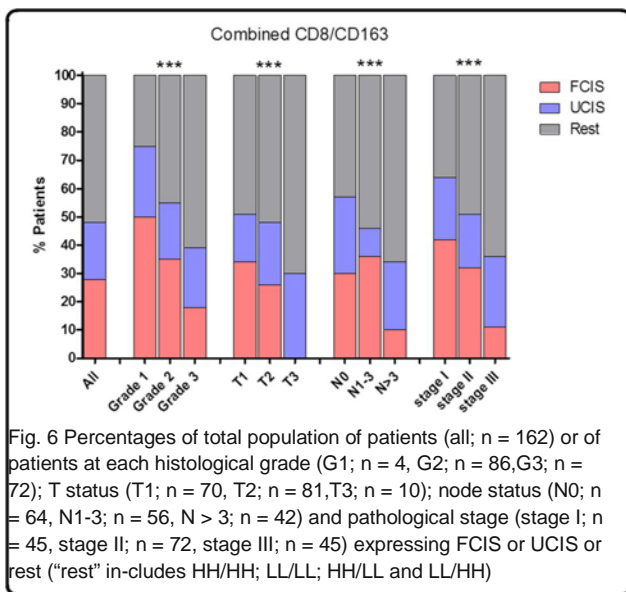


Fig. 6 Percentages of total population of patients (all; n = 162) or of patients at each histological grade (G1; n = 4, G2; n = 86, G3; n = 72); T status (T1; n = 70, T2; n = 81, T3; n = 10); node status (N0; n = 64, N1-3; n = 56, N > 3; n = 42) and pathological stage (stage I; n = 45, stage II; n = 72, stage III; n = 45) expressing FCIS or UCIS or rest ("rest" includes HH/HH; LL/LL; HH/LL and LL/HH)

into (i) the current, well-established prognostic biomarkers used in breast cancer, i.e., age (patients below or above the 50 year threshold) and pathological parameters, including T status (1,2,3), nodal status (0–3), grade (1,2,3), as well as (ii) HER-2 status (positive or negative), hormone receptor (Estrogen and/or Progesterone) status (positive or negative) and (iii) our immune signatures (FCIS, rest, UCIS, as suggested by the Log-rank survival analyses). T status and hormone receptors status remained significantly associated with both DFS and OS, while grade and HER-2 status were associated only with

OS. HER-2 status did not associate with DFS. This result may be explained by the fact that a significant number of patients were diagnosed between 2000 and mid 2006, at which time trastuzumab was not yet the standard-of-care in the adjuvant setting for early stage BCa overexpressing HER-2. Interestingly, despite the small size of samples analyzed, the immune signatures were also significantly associated with DFS and OS. In order to decide on a first model, covariates of lower importance were excluded, using a forward stepwise selection method. As a result, T status, hormone receptors status and our immune signatures were deemed of high importance for DFS and OS.

Discussion

In the present study, we demonstrate that the combined evaluation of CD8+ or CD163+ immune cell densities in the tumor center and invasive margin allows better stratification and improves the prognostic value of TNM staging in BCa. Our data also suggest that the combined evaluation of CD8+ and CD163+ cell densities jointly in TC and IM could improve the accuracy of prediction for DFS and OS. Initially, focusing on the most common TIL population, the CD8+ cells, we observed maximum DFS and OS when high CD8+ densities in the TC were combined with low densities in the IM (i.e., HL). In contrast, the inverse combination (i.e., LH) was associated with significantly higher recurrence rates and reduced OS. This finding is challenging given that the most potent favorable immunoscore value in colorectal cancer combines high CD8+ densities both in TC and IM [18,

Table 3 Multivariate Cox proportional hazard analysis for DFS and OS of patients with non-metastatic invasive breast cancer

	DFS			OS		
	Hazard Ratio	P	95.0% CI for HR (range)	Hazard Ratio	P	95.0% CI for HR (range)
Model before stepwise selection						
Age ^a	1.031	0.948	0.411–2.589	4.391	0.188	0.486–39.703
T status ^b	2.613	0.010	1.255–5.439	3.679	0.028	1.148–11.793
N stage ^b	1.222	0.512	0.671–2.225	1.125	0.815	0.420–3.010
Grade ^b	1.142	0.750	0.504–2.585	4.189	0.027	1.180–14.867
HER-2/neu	0.928	0.884	0.342–2.520	0.066	0.016	0.007–0.606
Hormone Receptors	0.277	0.004	0.277–0.669	0.168	0.007	0.046–0.621
Signatures ^b	2.063	0.041	1.031–4.126	4.850	0.014	1.374–17.122
Model after stepwise selection						
T status ^b	2.999	0.001	1.602–5.615	3.522	0.005	1.477–8.398
Hormone Receptors	0.269	0.002	0.116–0.621	0.231	0.014	0.072–0.742
Signatures ^b	2.146	0.027	1.091–4.219	4.273	0.006	1.521–11.999
TNM stage ^b	2.180	0.009	1.219–3.898	3.937	0.006	1.494–10.371
Signatures ^b	1.560	0.138	0.866–2.810	2.085	0.091	0.889–4.890

^aAge under 50 and over 50 years old

^bAll categorical covariates were transformed into numeric codes as follows : T status (T1; 1, T2; 2, T3; 3), N stage (N0; 0, N1; 1, N2; 2, N3; 3), Grade (G1; 1, G2; 2, G3; 3), Signatures (FCIS; 1, Rest; 2, UCIS; 3) TNM stage (I; 1, II; 2, III

22]. We also aimed to investigate whether the localization of macrophages in primary BCa could be of clinical relevance. CD163 represents a marker expressed primarily by the anti-inflammatory (M2) subtypes of macrophages [24]. We detected higher numbers of CD163+ than CD8+ cells in both tumor regions, consistent with the increased influx of TAMs in breast tumors [24]. In agreement with a recent report [13], we found that CD163+ cells in TC positively correlated with poor clinicopathological features, emphasizing the importance of analyzing densities of these cells locally as a prognostic factor. However, in line with our CD8+ cell scoring, we found that evaluation of CD163+ cell densities in single regions did not strongly associate with DFS or OS. Nonetheless, combined analyses indicated a favorable clinical outcome in patients having low CD163+ cell densities in TC combined with high densities in the IM. Interestingly, the poorest prognostic impact was noticed among patients whose tumors' compartments were inversely infiltrated by CD163+ cells, namely with high TC vs low IM densities.

Presently it is not clear what may cause such differential distributions among tumor compartments. Given the interrelationship between tumor biology features and immune reactions we may hypothesize that depending on locally tumor-secreted inflammatory molecules, immune cells may accumulate at distinct areas within the tumor microenvironment. Such a compartmentalization may then influence the functional status of these immune cells as this has been shown for intratumoral DCs with pro- and anti-tumor properties [25–27]. In an analogous fashion, various chemokines have been shown to selectively attract CD8+ cells at different tumor compartments [28–34], suggesting that the location of the various TIL populations is a dynamic process with pro- or antitumor effects, depending on tumor biology reflecting the stage of disease, which associates with clinical outcome in different malignancies, including BCa [23, 25, 35]. In the same lines, we show herein that cells with opposing functions (i.e., CD8+ and CD163+ cells) in distinct tumor regions and at differential densities have significant predictive roles; yet, at present it is not known whether their location in either compartment is due to migratory processes induced by locally secreted factors or architectural (contextual) barriers capturing these cells in the tumor compartments [14].

We also determined that such favorable immune cell differential densities were correlated with improved clinical outcomes in groups of patients with otherwise poor clinicopathological variables (i.e., advanced stage, large tumors, high grade and positive lymph nodes) which were comparable to those for patients with good prognosis according to standard clinicopathological criteria (i.e., early pathological stage,

low volume tumors and histologic grade and negative lymph nodes).

From a theoretical point of view, our results suggest that by the time human BCa become clinically detectable (i.e., the escape phase of immunoeediting), the adaptive immune response is still active playing a significant role in delaying tumor progression. This may not be quite compatible with the immunoeediting theory [36], given that the beneficial effect of adaptive immunity may persist throughout tumor progression, as we show here for BCa patients with more advanced disease having similar DFS and OS with early stage patients provided they have a favorable immune signature. We may propose that our favorable immune signature slows down tumor growth rates, thus increasing OS. At this point we should mention that such pre-existing immunity may, to a certain degree, be directed towards neoantigens expressed by the tumor through the emergence of nonsynonymous somatic mutations [37]. Alternatively, the FCIS may contribute to a modification of tumor stroma and tumor cells in order to negatively influence angiogenesis and extravasation and in this way to influence tumor evolution and progression. Alterations in immune cell densities and function that may occur while disease is progressing could support tumor evasion from immunosurveillance. The underlying mechanisms for the so-called acquired immune resistance have been mostly attributed to epigenetic changes [35, 38] and most recently to upregulation of alternate immune checkpoints [39] as well as to the loss of nonsynonymous somatic mutations which leads to low densities or elimination of neoantigens [40]. However, also in this case the beneficial effect of intratumoral antitumor immunity may persist during tumor progression, attenuating the metastatic potential of the tumor and resulting in better clinical outcomes. Thus, intratumoral immune infiltrates may not only reflect pre-existing immunity but also the immune response to therapy. Therefore, it will be of great importance for decisions making in terms of patients' clinical management to know whether and to what level the patients' original immune status influences survival independently of therapy.

Because the primary tumor in our BCa population was removed by surgery, the prognostic value associated with the host intratumoral immune response may reflect the quantity and quality of circulating cytotoxic effectors recognizing and lysing tumor cells in peripheral blood, lymphoid tissues or other anatomical sites. It is, however, at present unknown whether a correlation exists between the immune phenotype of tumors and the responsiveness of peripheral immune cells to immune stimulation. Mortarini et al. [41] observed that the frequency of T regulatory cells at the tumor site, correlated with increased circulating levels of TGF β and decreased

responsiveness to IL-2 stimulation by peripheral T cells. In the same lines, we have demonstrated an in-verse correlation between serum TGF β levels with immunological T cell responses to a HER-2/neu hybrid peptide used to vaccinate prostate cancer patients [42]. This points to the need to test whether there is an interrelation between the status of activation of tu-mors and the behavior of circulating cells and to compare whether this drives the systemic alteration of immune function associated with the cancer bearing status. Identification of a correlation would allow functional assessment of tumors which consequently would predict prognosis by testing circulating cells. Such analyses may be useful for assessing the role of adaptive immune responses at the tumor site and the periphery as a continuum alongside with tumor evolution.

We also show here that the frequency of patients exhibiting the FCIS was decreased among groups with poor clinicopathological variables suggesting that favorable CD8+ and CD163+ cell densities inversely correlated with the TNM stage. We may propose that disease progression associates with a worsening of this antitumor immune response resulting in a gradually in-creasing immune escape. As also discussed above,, even at this stage, the strength of the immune response could be an essential parameter for efficiently control-ling tumor evolution.

We have shown that the differential densities and spatial distribution of CD8+ and CD163+ cells as described by the FCIS could identify patients with in-creased DFS or patients who lived longer despite the fact that these were in late tumor stages according to the TNM classification. This indicates that the FCIS, as defined here, constitutes a novel candidate-indicator beyond TNM staging to improve the prediction of clinical outcomes.

Conclusions

Our study is the first to reveal that differential densities of the same immune cell subpopulation infiltrating the primary tumor at the TC and IM may have opposing prognostic impacts in BCa. The FCIS defined herein predicts favorable clinical outcomes (both DFS and OS) across heterogeneous groups of patients with advanced stage disease, large tumors, invaded lymph nodes and high histological grade tumors, and complements the established robust standard prognostic parameters in BCa. Thus, by associating TNM-based classifications and combined intratumoral immune signatures, as shown here with the FCIS, we may provide preliminary evidence for defining new subgroups of patients with distinct prognosis.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. DFS and OS in patients according to standard clinicopathological variables. Figures S2-S5. DFS (A, C) and OS (B, D) for patients stratified by grade (Figure S2), T status (Figure S3), nodal status (Figure S4) and pathological TNM stage (Figure S5) and analyzed according to the density of CD8+ (A, B) or CD163+ (C, D) cells in TC or IM. Figures S6-S9. Kaplan-Meier curves illustrating DFS (A, C, E) and OS (B, D, E) for patients stratified by grade (Figure S6), T status (Figure S7), nodal status (Figure S8) and pathological TNM stage (Figure S9) and analyzed according to the density of CD8+ (A, B) or CD163+ (C, D) cells in the combined tumor regions and to the combined immune signatures (E, F). The statistics with significant differences or strong trends between groups and the corresponding hazard ratios are shown in the respective plots. (PDF 356 kb)

Abbreviations

BCa: Breast cancer; DCs: Dendritic cells; DFS: Disease free survival; FCIS: Favorable combined immune signature; FFPE: Formalin-fixed, paraffin-embedded; HE: Hematoxylin-eosin; HR: Hazard ratio; IL-2: Interleukin-2; IM: Invasive margin; iNKT: Invariant natural killer T; NK: Natural killer cell; OS: Overall survival; TAMs: Tumor-associated macrophages; TC: Tumor center; TGF β : Transforming growth factor beta; TILs: Tumor-infiltrating lymphocytes; UCIS: Unfavorable combined immune signature

Funding

This study is supported by grant GER_1968 (ISPEBREAST) to CNB and GP from the bilateral Research and Technology Greek-German collaboration.

Availability of data and materials

The datasets during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. Paraffin embedded tissue blocks are not available. Immunohistochemistry slides and corresponding photographs are available upon request.

Authors' contributions

SPF and MS equally contributed to study design, data collection, analysis and interpretation of results and writing of the manuscript. NNS contributed to data collection and writing of the manuscript. CH, NA, AA were responsible for the collection of patients' material and clinical follow up. CV & EA contributed to data analysis and writing of the manuscript. NJ contributed to data collection and analysis. GP critically revised the manuscript. SAP and CNB equally made substantial contributions to conception and design, analysis, interpretation of data and writing the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the IRB of Saint Savas Cancer Hospital: Prospectively enrolled patients (2014–2015) signed an informed consent prior to be operated. Retrospectively analyzed patients, if presenting to give also blood sample (according to the study, data not included here) also signed the same informed consent. All other retrospectively analyzed patients (either informed by telephone call or deceased patients) were anonymized by the treating medical oncologist (AA) and the pathologists (NA and MS) and their clinical information was recorded in an anonymized database by the responsible medical doctor (CH).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece. ²Pathology Department, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece. ³Center for Medical Research, Eberhard-Karls Universität, Tübingen, Germany. ⁴First Medical Oncology Clinic, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece.

Received: 15 December 2016 Accepted: 6 April 2017

Published online: 18 April 2017

References

1. Siegel R, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9–29.
2. Gooden MJ, et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011;105(1):93–103.
3. Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(2):261–7.
4. Ingold Heppner B, Loibl S, Denkert C. Tumor-infiltrating lymphocytes: a promising biomarker in breast cancer. *Breast Care (Basel).* 2016; 11(2):96–100.
5. Ali HR, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1536–43.
6. Addison EG, et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology.* 2005;116(3):354–61.
7. O'Reilly V, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha + and CD4-CD8alpha-invariant natural killer T cells. *PLoS One.* 2011;6(12):e28648.
8. Shabo I, et al. Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and cannot be explained by cellular interaction. *BMC Cancer.* 2015;15:922.
9. Shabo I, et al. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer.* 2008;123(4):780–6.
10. Jensen TO, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(20):3330–7.
11. Lee AH, et al. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol.* 1997;50(8):669–73.
12. Nagorsen D, et al. Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med.* 2007;5:62.
13. Medrek C, et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2012;12:306.
14. Salgado R, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–71.
15. Savas P, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(4):228–41.
16. Baker K, et al. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology.* 2011;58(7):1107–16.
17. Denkert C, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):105–13.
18. Galon J, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960–4.
19. Issa-Nummer Y, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer—a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One.* 2013;8(12):e79775.
20. Loi S, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02–98. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):860–7.
21. Mahmoud SM, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1949–55.
22. Pages F, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5944–51.
23. Miyan M, et al. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med.* 2016;14(1):227.
24. Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett.* 2013;332(1):3–10.
25. Figel AM, et al. Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. *Am J Pathol.* 2011;179(1):436–51.
26. Giraldo NA, et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(13):3031–40.
27. Middel P, et al. Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:578.
28. Becht E, et al. Immune contexture, immunoscore, and malignant cell molecular subgroups for prognostic and theranostic classifications of cancers. *Adv Immunol.* 2016;130:95–190.
29. Dannenmann SR, et al. Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2013;2(3):e23562.
30. Elsassser-Beile U, et al. Different expression of Fas and Fas ligand in tumor infiltrating and peripheral lymphocytes of patients with renal cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):433–7.
31. Fridman WH, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298–306.
32. Oldham KA, et al. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *Eur Urol.* 2012;61(2):385–94.
33. Polimeno M, et al. Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte

- growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2013;112(5):686–96.
34. Sharpe K, et al. The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(24):6924–34.
 35. Zaretsky JM, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* 2016;375(9):819–29.
 36. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011; 331(6024):1565–70.
 37. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69–74.
 38. Shukla SA, et al. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat Biotechnol.* 2015;33(11):1152–8.
 39. Koyama S, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun.* 2016;7:10501.
 40. Anagnostou V, et al. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2017;7(3):264–76.
 41. Mortarini R, et al. Impaired STAT phosphorylation in T cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):4085–94.
 42. Perez SA, et al. Results from a phase I clinical study of the novel li-Key/HER-2/neu(776–790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(13):3495–506.

Peripheral T cell responses to tumour antigens are associated with molecular, immunogenetic and cellular features of breast cancer patients

Nicole Janssen¹ · Sotirios P. Fortis² · Lisa Speigl¹ · Christoforos Haritos² · Nectaria N. Sotiriadou³ · Michael Sofopoulos³ · Niki Arnogiannaki³ · Catherine Stavropoulos-Giokas⁴ · Amalia Dinou⁴ · Sonia Perez² · Graham Pawelec^{1,5,6,7} · Constantin N. Baxevanis² · Christopher Shipp¹

Received: 1 September 2016 / Accepted: 22 October 2016
Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract

Purpose Breast cancer is a leading cause of cancer deaths in women, but despite steady improvements in therapies, treatment is still suboptimal. Immunotherapy holds promise as a more effective therapy for breast cancer; supporting this, our prior study showed that patients possessing HER2-reactive CD8⁺ T cells in blood experience survival superior to patients without these cells. Here, we define a composite set of biomarkers that identify patients with T cell responses to tumour antigens.

Methods We assessed T cell responses following in vitro stimulation with the HER2, MUC1 and SUR tumour-associated antigens (TAA) by flow cytometry and intracellular cytokine staining in 50 breast cancer patients. We also measured HLA type, serum cytokines, tumour-infiltrating leukocytes and blood leukocyte populations.

Results We found few correlations between TAA-reactive T cells and HLA type, serum cytokines and tumour-infiltrating leukocytes, whereas blood leukocyte phenotypes broadly correlated with TAA responses. This showed monocytes, natural killer cells, dendritic cells and T cells to be inversely associated with both CD4⁺ and CD8⁺ T cells reactive to tumour antigens. Moreover, combining multiple parameters improved the accuracy in predicting patients with TAA-responsive T cells.

Conclusion This study therefore defines composite immune profiles that identify patients responding to TAAs which may allow better personalisation of cancer therapies.

Keywords Tumour-associated antigen Blood leukocytes Breast cancer HER2 Survivin MUC1

Nicole Janssen and Sotirios P. Fortis have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10549-016-4037-z) contains supplementary material, which is available to authorised users.

[23] Christopher Shipp
mrchristophershipp@gmail.com;
christopher.shipp@uni-tuebingen.de

+ Department of Internal Medicine II, University Hospital
Tübingen, Waldhoferstr. 22, 72072 Tübingen, Germany

+ Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas
Cancer Hospital, Athens, Greece

+ Pathology Department, Saint Savas Cancer Hospital, Athens,
Greece

+ Histocompatibility & Immunogenetics Lab, Hellenic Cord
Blood Bank- H&I Laboratory, Biomedical Research
Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece

Abbreviations

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ER	Oestrogen receptor
FoxP3	Forkhead box P3
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Human leukocyte antigen

[25]. Institute of Cancer Sciences, The University of
Manchester, Manchester M20 4BX, UK

[26]. School of Science and Technology, College of Arts
and Science, Nottingham Trent University, Burton St,
Nottingham NG1 4BU, UK

[27]. Department of Haematological Medicine, The
Rayne Institute, King's College London, London,
UK

IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 receptor antagonist
mDCs	Myeloid dendritic cells
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MUC1	Mucin 1
N	N stage
NK	Natural killer
NR	Non-responder
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
pDCs	Plasmacytoid dendritic cells
PR	Progesterone receptor
R	Responder
SI	Stimulation index
SUR	Survivin
T	Tumour stage
TAA	Tumour-associated antigens
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	Tumour necrosis factor
Tregs	Regulatory T cells

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women (<http://globocan.iarc.fr>), but mainstay treatments are still suboptimal for most patients. To address this, there is a growing interest in using immunotherapy to treat breast cancer. Immunotherapy can take many forms including monoclonal antibodies targeting tumour antigens expressed on cancer cells, so-called checkpoint inhibitors, cancer vaccines or other treatments that aim to boost the immune system. Of these, immunomodulatory antibodies that target T cell suppressor ligands or receptors have shown highly encouraging results in several types of cancer [1–3]. The effectiveness of such treatments is presumably based on T cell immune responses against tumour-associated antigens (TAAs) expressed by cancer cells, allowing these cells to kill or otherwise inhibit tumour cells and induce tumour regression. Similarly, cancer vaccines also aim to prime or boost immune responses against tumour cells, and it has been shown that both of these approaches result in stimulated T cell responses and clinical tumour regression or prolonged patient survival [4–6].

One of the most widely investigated TAAs in breast cancer is the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Our previous study showed that breast cancer patients whose peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) mounted *in vitro* CD8⁺ T cell responses to HER2 peptides experienced prolonged survival relative to patients without such responses [7]. Consistent with this, HER2 vaccination has also resulted in clinical therapeutic responses [8, 9] and tumour regression [10]. These studies closely link T cells specific for TAAs with improvements in patient clinical status. As with most types of immune

responses, TAA-reactive T cells are governed by immune regulatory factors such as regulatory T cells (Tregs) or myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which can dampen anti-tumour immune responses including those against TAAs [11–19]. Tregs and MDSCs induce immune suppression through a range of processes including cytotoxicity via granzyme B and perforin, production of inhibitory signalling molecules such as IL-10, transforming growth factor- β (TGF- β) or prostaglandin 2, or induction of T cell dysfunction through arginine depletion [20, 21]. This may offer the possibility of targeting these cells to enhance anti-tumour immunity [22]. Because many of these effector molecules are soluble, the activity of such regulatory cells may be reflected by systemic levels of suppressive factors that they produce. Indeed, serum cytokines have been associated with patient outcome [23, 24], supporting their potential as markers reflective of patient immune status.

Considering the emerging role of tumour antigen-reactive T cells and the results of our prior study which demonstrated a survival advantage for patients possessing T cells reactive to HER2, we aimed to pinpoint the patient features associated with T cell responses to tumour antigens in breast cancer. We reasoned that multiple different factors could potentially influence whether a patient possesses T cells responsive to tumour antigens and thus clinical outcome. To increase the predictive utility of such biomarkers, here, we measured broad features including immunogenetic factors, soluble signalling molecules in serum as well as cellular components in the blood and also within the tumour, with the goal of defining a composite set of biomarkers predictive of TAA responses which may better correlate with clinical outcome than tumour antigen immune responses alone, and which may also allow more effective personalised application of cancer therapies.

Materials and methods

Patients

Blood samples from 50 patients with invasive carcinoma were collected at the St. Savas Cancer Hospital in Athens between February 2014 and May 2015, one day prior to surgery. The study includes women with an age range of 27–78 (median age 56 years). Peripheral blood mononuclear cells were isolated from blood using Ficoll–Hypaque gradient and stored in liquid nitrogen before being shipped to the Tübingen University Hospital for analysis. Written informed consent was approved by the Review Board at St. Savas Cancer Hospital. The patients all had non-metastatic invasive ductal carcinoma. Patients who had tumours of

any size but without extension to chest wall were included, i.e. patients were all of AJCC stages 1, 2A, 2B, 3A, 3C but not 3B and 4. None of these patients were treated with neoadjuvant chemotherapy or were enrolled to other research protocols, nor did they have any history of cancer or other serious health problems. Tumour expression of hormone receptors [progesterone (PR) and oestrogen receptors (ER)], the HER2 oncoprotein and the marker of cell proliferation Ki67 was available for all patients (Table 1).

Detection of antigen-reactive T cells

T cell responses to HER2, Mucin1 (MUC1) and Survivin (SUR) were measured after 12 days of in vitro culture. This procedure, including the detection of reactive T cells with flow cytometry, was performed as in our prior study [7] (see Online Resource 1 for full list of antibodies

Table 1 Characteristics of the breast cancer patients

Patient clinicopathological parameters (n = 50)	
Median age (range in years)	56 (27–78)
AJCC staging	
1	15
2A	10
2B	12
3A	12
3C	1
Receptor status	
Triple negative	5
ER?	42
PR?	33
HER2?	15
Ki67	
\10%	7
10–20%	21
[20%	22
T stage	
1	21
2	26
3	3
N stage	
0	21
1	17
2	11
3	1
Grade	
1	0
2	26
3	24

employed). Cytometer setup and tracking beads (BD Bioscience) were run before and after each sample measurement to ensure consistency in machine performance. The inclusion of a positive biological control (stimulation with influenza peptides) assured consistency in sample quality and the prevention of false-negative results.

Phenotypic analysis of myeloid cells, T cells and Natural Killer cells

For characterisation of myeloid cells [including monocytes, MDSCs, plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) and myeloid DCs (mDCs)], T cells (including regulatory T cells) and Natural Killer cells (NK cells), PBMCs were thawed and stained as previously described [7], using the antibody panels in Online Resource 1. Antibody panels were established using fluorescence minus one controls. Cytometer setup and tracking beads were run before and after each sample measurement to ensure consistency in machine performance. The limited nature of patient material did not permit multiple testing of the same sample, but we performed multiple independent measurement of a healthy control donor (n = 9) in order to ensure consistency in measurement conditions.

Flow cytometry data analysis

Data were analysed with FlowJo software version 10.07 (immunophenotyping) or version 7.2.5 (antigen-reactive T cells). Flow cytometry data were analysed first by excluding events not part of the main acquisition population using a time-vs-side scatter gate. Cell doublets were then removed before the exclusion of dead cells (EMA-positive events) and cell debris with the use of a morphological gate (Online Resource 2). The assessment of T cell responses to tumour-associated antigens was performed using the same method as in our prior study [7]; we compared control (unstimulated) and peptide-stimulated cultures as described in the methods section “Detection of antigen-reactive T cells” and assigned a positive response when the frequency of T cells producing any cytokine in the stimulated sample was at least twice that of the control sample (Online Resource 4). Additionally, each response was visually assessed to ensure the presence of a clearly distinguishable population of positive events. T cell responses were considered categorically (present or absent) in addition to a quantitative assessment of the strength of response by calculating the ratio of the frequency of positive events in the stimulated sample by comparison with the unstimulated sample to give a stimulation index (SI). This method allows the detection of multiple cytokines from each patient, but does not directly assess whether production is from the same or different population of

cells. Antibody-stained leukocyte populations, including the assessment of T cell responses to TAAs, were gated according to the approaches shown in Online Resources 2–4.

Assessment of tumour-infiltrating leukocytes

Haematoxylin–Eosin-stained tumour slides were reviewed by two breast pathologists (M.S. and N.A.) to select the most representative slide of each tumour. Sections (4–5 μm) were stained individually with antibodies to CD4 (4B12, 1:40; Biogenex), CD8 (SP16, 1:80; Thermo Scientific), CD163 (10D6, 1:400; Biocare) and FoxP3 (236A/E7, 1:100; Abcam). Staining protocols for all antibodies were optimised using sections of tonsil tissues. Immunostaining was performed using the Leica Bond III automation (Leica Biosystems, Melbourne, Australia) and Leica detection kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK). The staining protocol included a 30-min high pH epitope retrieval in the case of CD4, CD163 and FoxP3 antibodies, and a low pH retrieval for CD8, which was followed by a 30-min incubation with the primary antibody. Reactions were developed with diaminobenzidine, and sections were counterstained with haematoxylin.

Micrographs (3840 \times 3072 pixels) of each slide stained with CD4, CD8, FoxP3 and CD163 were captured with a Nikon DXM-1200 Camera on a Nikon Eclipse E800 microscope with E Plan Achromat Objectives using Automatic Camera Tamer (ACT-1) Version 2 software. White balance was calibrated before image capture. The images were saved as JPG at 95% quality without image processing. Quantification of infiltrating cells was performed using Adobe Photoshop CS6 (used to select the exact colour of positive cells for each marker which was then converted to a grey scale image) and ImageJ (used to analyse the per-centage of the surface covered by the stained cells). The surface coverage of stained cells was then converted to absolute number of infiltrating cells per mm^2 . For each infiltrating subpopulation, we performed visual enumeration in ten representative regions by two independent researchers.

Patient HLA typing

DNA from peripheral blood cells was extracted using the automated Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's protocol. HLA genotyping was performed using rSSO-Luminex (LIFECODES HLA SSO Typing—RAPID, Immucor Transplant Diagnostics, INC, Stamford, CT, USA), and the results were analysed with the MATCH IT! DNA software (Immucor Transplant Diagnostics, INC, Stamford CT).

Measurement of serum cytokines

Frozen sera from patients were thawed at 37 $^{\circ}\text{C}$ and subsequently mixed well. Measurement of IL-1Ra, IL-9 and IL-10 was simultaneously performed by Luminex using the human premixed multi-analyte kit (R&D systems) according to manufacturer's instructions. RANTES/CC-chemokine ligand 5 and TGF- β determinations were performed by separate Luminex-based kits (R&D systems). The full panel of cytokines investigated additionally included IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12 p70, IL-15, IL-17A, TNF, IFN γ and GM-CSF, but levels of these cytokines could not be detected.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Two independent groups were compared using the Mann–Whitney U test. Relationships across four grouping variables were assessed with Fisher's exact test. Correlations were assessed using Spearman correlation analysis. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Because this was an exploratory study we aimed to reduce the chance of obtaining false-negative results. For this reason, statistical analyses were not corrected using the Bonferroni method, and the results should be interpreted as such.

Results

Breast cancer patients frequently show in vitro responses to HER2, MUC1 and SUR

T cells reactive to the HER2, MUC1 and SUR tumour antigens were detected in the PBMC of 50 non-metastatic breast cancer patients using an established 12 day in vitro expansion protocol. Reactive T cells were found to be common in patients, with a high frequency of responses to HER2 (96%), MUC1 (80%) and SUR (72%) (Fig. 1a). Examining CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell responses separately showed that CD4 $^{+}$ reactive T cells were more common (Fig. 1b) and produced a larger number of different cytokines than CD8 $^{+}$ cells (Fig. 1c).

T cell responses to tumour antigens are associated with clinical parameters in breast cancer

We investigated if T cell responses to HER2, MUC1 and SUR were associated with patient clinical features. This analysis showed that patients with a higher tumour grade had weaker CD4 $^{+}$ T cell responses to MUC1 ($p = 0.045$)

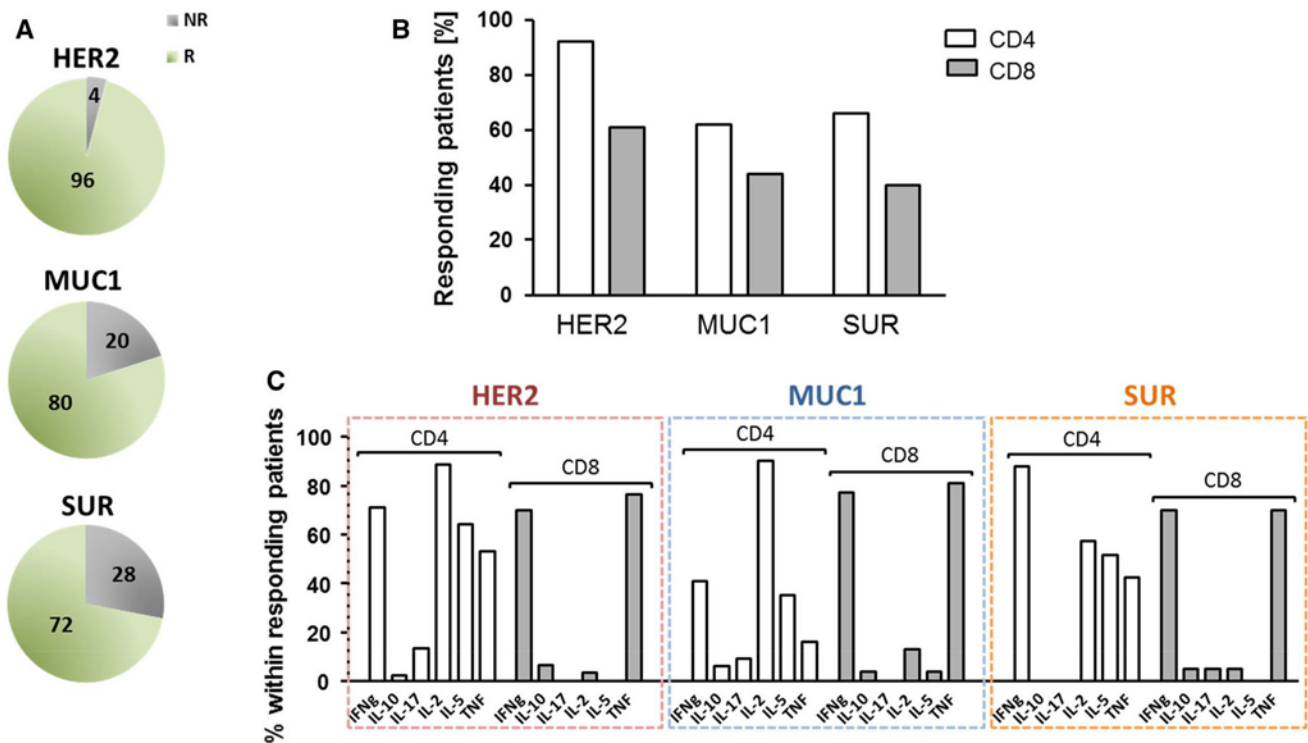


Fig. 1 T cell responses to tumour-associated antigens in breast cancer patients. CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses measured by IL-2, IL-5, IL-10, IL-17, TNF and IFN γ production were detected in the PBMC of 50 breast cancer patients after stimulation with HER2, MUC1 or SUR TAAs. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were considered responsive to an antigen if they showed a positive signal for any of the six measured cytokines. a Across these 50 breast cancer patients, HER2-reactive T cells were observed to be more common than MUC1- or SUR-reactive T cells. b Responses to all TAAs were more

commonly seen for CD4⁺ than CD8⁺ T cells. c Differences in the cytokine production profile were observed for CD4⁺ but not for CD8⁺ T cells when comparing their responses to HER2, MUC1 and SUR. The percentage for each cytokine was calculated only considering patients who responded to HER2, MUC1 or SUR. NR non-responder; R Responder; TAA tumour-associated antigen; HER2 human epidermal growth factor receptor 2; MUC1 Mucin 1; SUR Survivin

(Fig. 2a), but those with oestrogen receptor (ER)-positive tumours had stronger CD8⁺ T cell responses to HER2 ($p = 0.031$) (Fig. 2b). No associations with SUR-responding T cells were found, nor were correlations with other clinical parameters including T, N or AJCC stage, total lymph node involvement as well as expression of Ki67, HER2 or progesterone receptor in the tumour.

Serum cytokines and patient HLA type are associated with T cell responses to TAAs

Immune features associated with responses to tumour antigens were sought in the form of serum cytokines and HLA type. We reasoned that a particular cytokine milieu or due to immunoeediting, T cell responses to tumour antigens might be favoured or suppressed which might result in high frequencies of certain HLA types possessing TAA-reactive T cells. To this end, we measured serum levels of IL-1Ra, IL-9, IL-10, TGF- β 1 and RANTES and performed HLA typing. We found that only in selected cases were these features related to responses to tumour antigens; a high

proportion of HLA-A*01⁺ patients lacked T cells responsive to MUC1, whereas HLA-A*02⁺ patients were more likely to possess T cells reactive to this antigen than HLA-A*02-negative patients (Fig. 3a). Considering serum cytokines, we found higher serum IL-10 levels in patients who had CD8⁺ HER2- (Fig. 3b) and SUR- ($p = 0.02$, data not shown) responsive T cells compared to those who did not have these cells. Aside from these associations no other relationships between T cell responses and serum cytokines or HLA type were found.

Relationships between tumour leukocyte infiltration and in vitro T cell responses to tumour antigens

Based on the notion that TAA-reactive T cells are active against tumour cells in situ, we investigated if they were associated with tumour leukocyte infiltration, namely by CD4⁺, CD8⁺, FoxP3⁺ and CD163⁺ cells, which may act as local regulators of tumour immunity. These analyses revealed that there was no association between tumour leukocyte infiltration and in vitro T cell responses to HER2

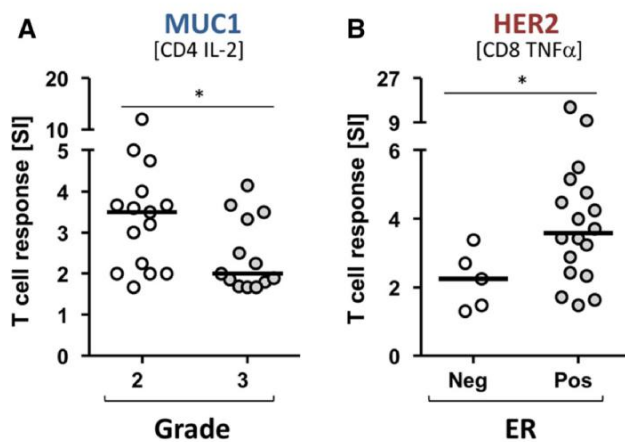


Fig. 2 T cell responses to MUC1 and HER2 correlate with tumour grade and ER receptor expression. T cell responses to the HER2, MUC1 or SUR TAAs were measured in 50 breast cancer patients following 12 days of in vitro expansion. The SI (ratio of cytokine positive cells between peptide-stimulated and unstimulated T cells) of responding CD4⁺ or CD8⁺ T cells were correlated with the patient clinical parameters grade, T, N, AJCC stage, total lymph node involvement as well as tumour expression of Ki67, HER2, ER and PR. a Patients with more advanced tumour grade showed weaker responses to MUC1. b ER-positive patients responded more strongly to HER2 than ER-negative patients. SI stimulation index; ER oestrogen receptor; HER2 human epidermal growth factor receptor 2; MUC1 mucin 1; * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test)

(Fig. 4a), but patients whose tumours were more densely infiltrated by CD163⁺, CD4⁺ T cells (Fig. 4b) as well as combined cell counts for both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (data not shown) more commonly possessed CD4⁺ T cells responding to the MUC1 antigen. Conversely, patients who showed less tumour infiltration by CD8⁺ T cells more commonly had CD8⁺ T cells responding to SUR (Fig. 4c). No other associations between TIL and antigen-reactive T cells were found.

Blood leukocyte populations as surrogate markers for anti-tumour T cell responses

The immunogenetic, molecular and cellular features investigated so far were only occasionally associated with in vitro T cell responses to tumour antigens, which led us to pursue more robust markers of tumour antigen responses in the form of blood leukocytes. To this end, 30 different myeloid and 23 lymphoid populations comprising T cells, monocytes, dendritic cells, natural killer cells, regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cell phenotypes were tested for association with T cell responses to the HER2, MUC1 or SUR antigens (see Online Resource 5 for a complete list of tested phenotypes). We were particularly interested in exploring these relationships for leukocytes with suppressor phenotypes, namely Tregs and MDSCs. Furthermore, to account for potential location-dependent differences, we also

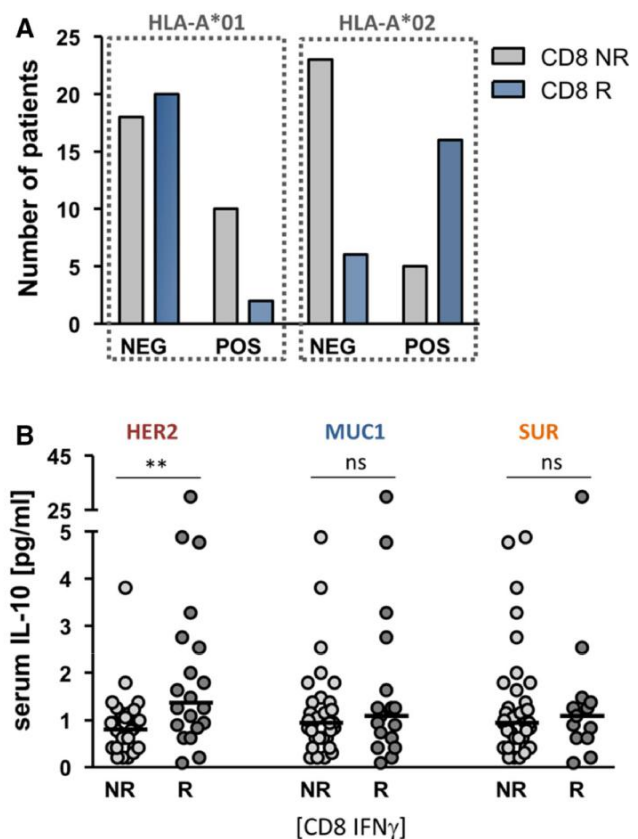


Fig. 3 Patient HLA type and serum cytokine levels correlate with T cell responses to tumour antigens. Patients with or without HER2-, MUC1- or SUR-reactive T cells were compared in terms of HLA type and serum cytokines ($n = 50$). a HLA-A*01 ($p = 0.045$) and HLA-A*02 ($p = 0.0001$) status was associated with MUC1-reactive T cells (Fisher's exact test). CD8⁺ T cells were considered responsive to an antigen if they showed a positive signal for any of the six measured cytokines. b Serum IL-10 levels were higher in patients who had IFN γ producing CD8 HER2-reactive T cells (Mann-Whitney U test) compared to patients without these cells. R responder; NR non-responder; ** $p < 0.01$; NS not significant; HER2 human epidermal growth factor receptor 2; MUC1 mucin 1; SUR survivin

re-tested a number of cell types that were investigated in tissue. This analysis revealed that many blood leukocyte populations were associated with T cell responses to HER2 and MUC1 and SUR. It was surprising that compared with phenotypically non-suppressive leukocyte populations, we found relatively few correlations for Tregs (two correlations) and MDSC phenotypes (nine correlations) (Table 2). Noteworthy was that patients with higher levels of blood monocytes presented with absent or weaker CD4⁺ and CD8⁺ T cells responsive to HER2 and MUC1 than patients with lower levels of monocytes. Similar inverse relationships were also observed for NK cells, mDCs and CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing markers of proliferation (Fig. 5), whereas other populations were positively associated with antigen-reactive T cells (Table 2). Interestingly, we observed that within monocytes, the HLA-DR⁺ fraction positively correlated with

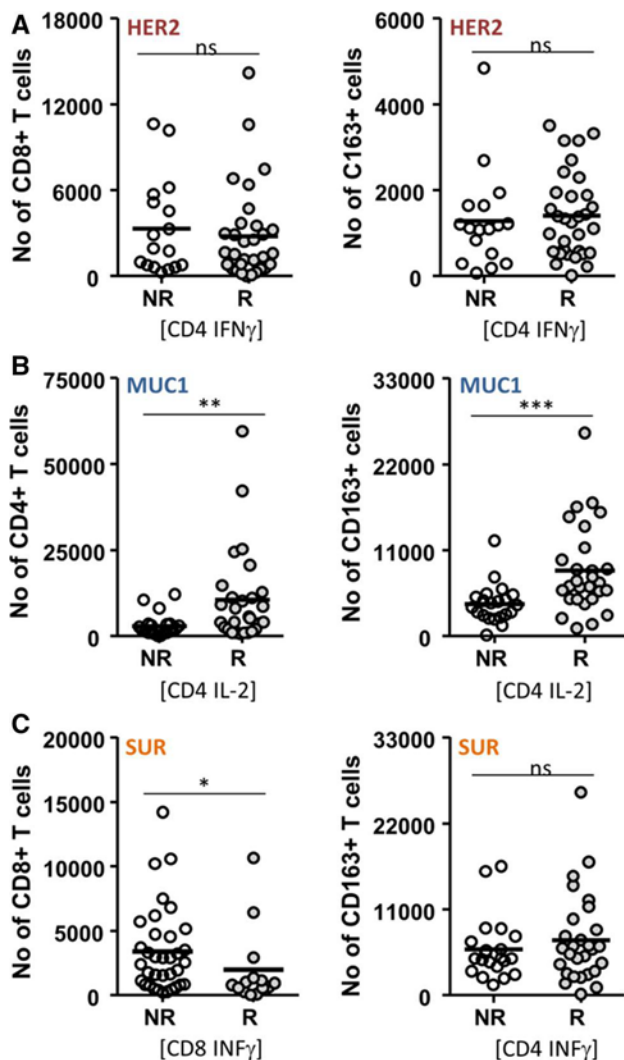


Fig. 4 Tumour-infiltrating leukocytes are associated with peripheral T cell responses to TAAs. The level of tumour leukocyte infiltration was compared for patients possessing T cells reactive to the HER2, MUC1 or SUR TAAs with those not possessing antigen-reactive T cells ($n = 50$). **a** Patients with HER2-responsive T cells showed no difference in their level of TILs. **b** Patients with MUC1-reactive T cells showed greater tumour infiltration by CD4⁺ T cells and CD163⁺ cells. **c** Patients with T cells reactive to the SUR antigen had less tumour infiltration by CD8⁺ T cells. Groups were divided according to patients who possessed the indicated T cell response and those who lacked these cells. NR non-responder; R responder; TIL, tumour-infiltrating leukocytes; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.004$; * $p < 0.04$; NS not significant (Mann–Whitney U test); TAA tumour-associated antigen; HER2 human epidermal growth factor receptor 2; MUC1 mucin 1; SUR survivin

tumour antigen-reactive T cells, while the HLA-DR- fraction was negatively associated with TAA-reactive T cells, indicating that the balance between monocyte maturation states may be relevant for the presence of anti-tumour T cells. The location of these leukocytes, whether in tissue or in blood, was also relevant to their relationship with tumour

antigen-reactive T cells; correlations for a particular cell type in blood were not found when the same cell type was present in tissue and vice versa (Fig. 4; Table 2), thereby demonstrating location-dependent differences. Figure 5 shows representative relationships between blood leukocyte frequencies and TAA T cell responses, and Table 2 provides an overview of all correlations identified. Similar relationships were obtained whether considering the strength of T cell response (stimulation index) or categorically comparing patients who had reactive T cells for each cytokine with those who did not.

Combining immune parameters improves the accuracy of predicting patients with TAA-reactive T cells

We sought to improve upon the accuracy of the parameters found to be associated with TAA-reactive T cells by analysing multiple immunological features. By combining different immune parameters, we were able to achieve superior prediction in the specificity and sensitivity in identifying patients possessing T cells reactive to HER2, MUC1 or SUR (Fig. 6a, selected results shown). Furthermore, these combinations of immune features allowed us to better stratify patients by the strength and frequency of T cell responses, i.e. into sub-groups with stronger and more frequent T cell responses or with weaker and less frequent responses (Fig. 6b, selected results shown). For example, the group of patients with below median levels of monocytes and NK cells only contained HER2 responders, with an average SI of 14.5. In comparison, the group with above median levels of these cells was made up of roughly equal numbers of responding and non-responding patients and had an average SI of 2.3 (Fig. 6b, left panel). We observed that combining different types of immunological parameters, for example, tumour-infiltrating cells and blood leukocyte populations, also resulted in better prediction of TAA responses. Patients with high levels of tumour infiltration by T cells and low levels of CD163⁺ mDCs in peripheral blood were more likely to have T cells reactive to MUC1 compared with patients without this profile (Fig. 6b, middle panel).

Discussion

This study was conducted to identify composite immunological features including tumour-infiltrating leukocytes, HLA type as well as peripheral immune cell types and cytokines, with the goal of identifying biomarkers which can accurately select breast cancer patients with responses to tumour antigens, predict clinical outcome or facilitate improved therapeutic customisation to individual patients.

Table 2 Correlations between blood leukocytes and T cell responses to HER2, MUC1 and SUR

T cell response	Leukocyte population	p value	r value
CD4 IL-2	Monocytes	0.0001	-0.54
	NK cells	0.004	-0.42
	CD4? Ki67?, CD8? Ki67?	0.04, 0.02	-0.29, -0.33
CD4 IFN	Monocytes	0.0005	-0.49
	CD14? CD124?	0.024	0.33
CD4 IL-5	Monocytes	0.0002	-0.53
	CD14? CD124?	0.007	0.39
	mDCs	0.010	-0.37
	NK cells	0.026	-0.33
CD4 TNF	Monocytes	0.0001	-0.60
	CD14? CD124?	0.0009	0.47
	mDCs	0.045	-0.30
	NK cells	0.024	-0.33
CD8 TNF	Monocytes	0.038	-0.30
	pDCs	0.016	-0.35
CD4 IFN	CD14? HLA-DR-	0.013	-0.36
	CD14? CD124?	0.049	0.29
	CD4? CD25? FoxP3? Ki67? CD45RA?	0.033	0.33
CD4 IL-2	CD16? mDCs	0.036	-0.31
CD4 IL-5	Monocytes	0.0005	-0.49
	CD14? CD124?	0.006	0.40
	mDCs	0.027	-0.32
	CD8? Ki67?, CD4? Ki67?	0.002, 0.04	-0.42, -0.29
CD8 IFN	CD4? CD25? FoxP3? Ki67? CD45RA?	0.049	-0.31
	mDCs	0.028	-0.32
	CD4?, CD8?	0.015, 0.017	-0.34, 0.34
	ratio CD4/CD8	0.0093	-0.36
CD8 IL-2			
CD8 IL-2	Lin-CD14? HLA-DR;	0.05, 0.05	-0.29, 0.29
CD8 TNF	Monocytes	0.02	-0.34
	mDCs, pDCs	0.024, 0.038	-0.33, -0.30
CD4 IL-2	CD8? Ki67?	0.012	-0.35
CD8 IFN	Lin-CD14? HLA-DR;	0.022, 0.015	-0.34, 0.35
CD8 TNF	Lin-CD14? HLA-DR;	0.021, 0.017	-0.34, 0.35

Lin, lineage markers CD3 CD19 and CD56. Correlations were assessed using the SI

We assessed T cells responding to HER2, MUC1 or SUR in 50 breast cancer patients and found certain associations between T cell responses with HLA type, serum cytokines and tumour-infiltrating leukocytes. In contrast to these limited associations, a number of different leukocytes in blood, including monocytes, natural killer cells, dendritic cells and T cells broadly correlated with tumour antigen-reactive T cells. Moreover, accuracy in selecting patients with tumour antigen-reactive T cells was improved when considering multiple patient parameters. The cluster of biomarkers identified here reveal immune profiles correlating with the presence of TAA-reactive T cells that may

allow for the selection of patients with immune systems most capable of mounting an anti-tumour response, thus potentially identifying patients who possess a wider repertoire of TAA-reactive T cells not limited to those which can be feasibly measured. Ongoing clinical follow-up of these prospectively recruited patients will reveal whether the composite set of biomarkers identified here, including TAA-reactive T cells, will allow superior survival prediction. Selecting patients using these biomarker combinations may allow personalised tailoring of patient treatments, for example, sparing patients with a favourable prognosis from otherwise unnecessary treatment, or the

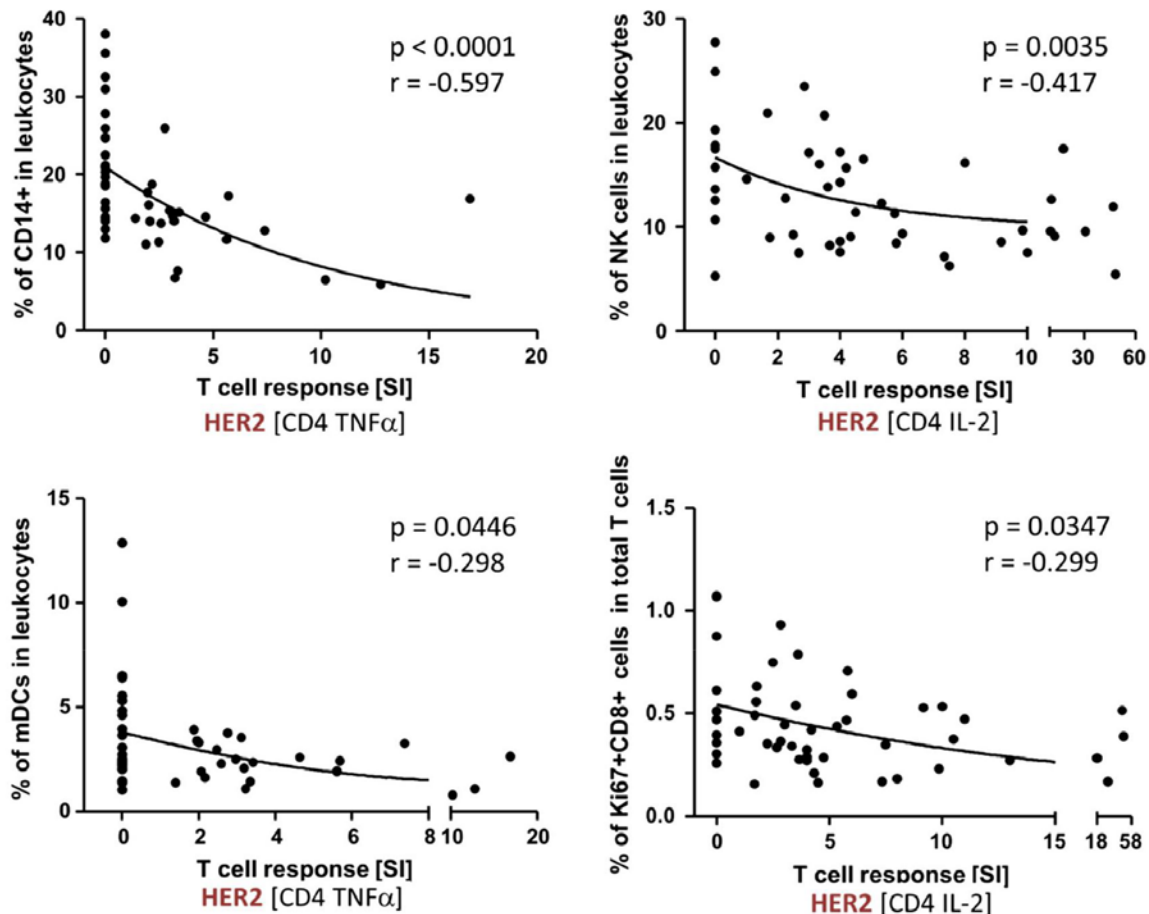


Fig. 5 Correlations between blood leukocytes and TAA-reactive T cells. Levels of human blood leukocytes correlate with T cells responding to the HER2, MUC1 or SUR TAAs ($n = 50$). Figure shows representative examples for monocytes, natural killer cells, myeloid dendritic cells and CD8⁺ T cells, which were inversely associated with TAA-reactive T cells (Spearman correlation). The SI

(ratio of cytokine positive cells between peptide-stimulated and unstimulated T cells) of responding CD4⁺ or CD8⁺ T cells were correlated with the frequency of blood leukocytes. TAA tumour-associated antigen; HER2 human epidermal growth factor receptor 2; SI stimulation index

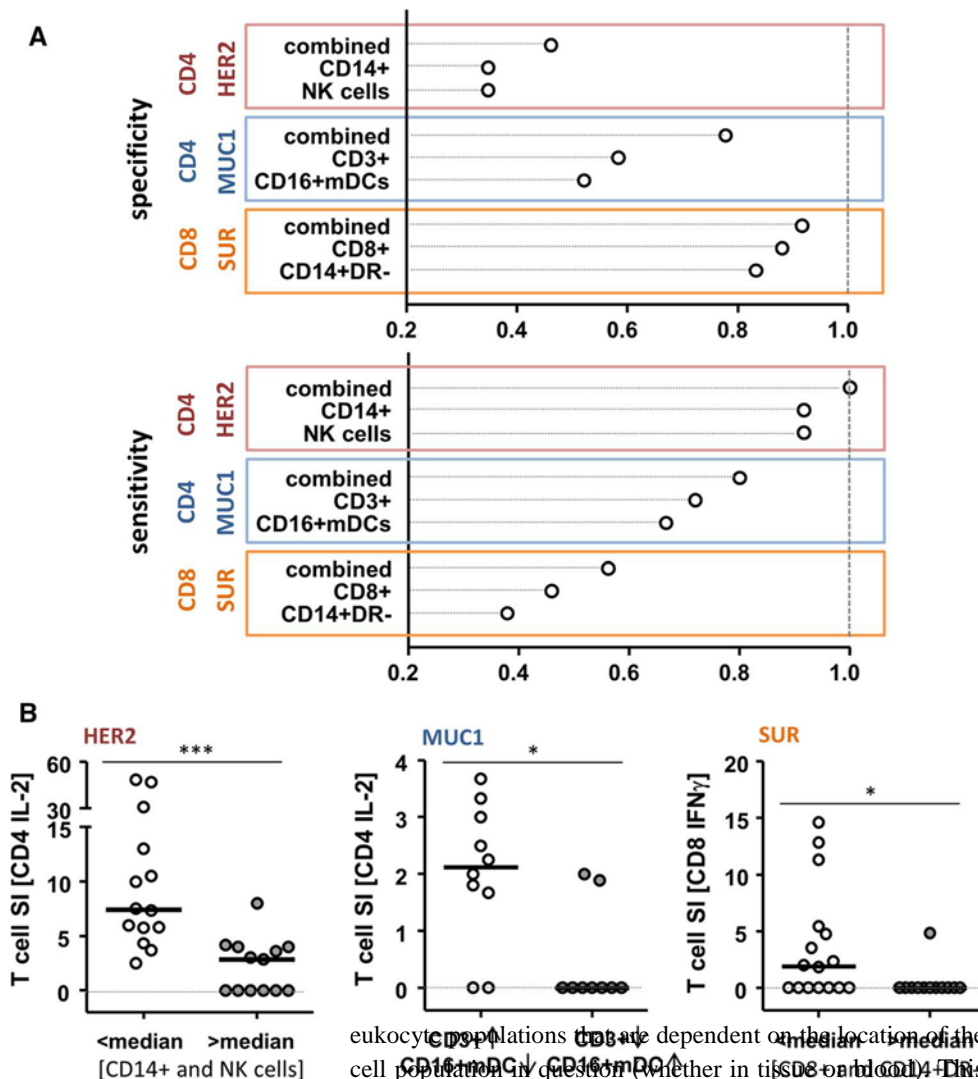
administration of more aggressive therapies for patients with a poorer prognosis.

The results from this study may also have implications for the treatment of breast cancer patients with immunotherapies. The clinical benefit of immunomodulatory antibodies (so-called check point inhibitors) relies on the presence or emergence of anti-tumour T cells, suggesting that patients with pre-existing tumour immunity in the form of TAA-reactive T cells may be more likely to respond to these drugs [25, 26]. As such, the results presented here may provide a basis for the selection of breast cancer patients more likely to benefit from treatment with immunomodulatory antibodies. Furthermore, patients without TAA-reactive T cells but who show similar immune profiles to patients with them may also benefit from treatment with these drugs due to the existence of conditions more permissible to the presence TAA-reactive T cells. These results may also extend to the use of cancer

vaccines, whereby patients who have immune profiles favourably associated with the presence of anti-tumour T cells may also be more likely to develop an immune response to the vaccine and to benefit clinically [5, 6, 27–29]. Furthermore, our results allow the selection of patients with antigen-reactive T cells producing specific cytokines. Because our prior study found that not only the general presence of TAA-reactive T cells but also the production of certain cytokines by these cells to be relevant for patient survival [7], the immune profiles identified here therefore allow a high degree of specificity in identifying those most likely to respond to immunotherapy or to have a favourable prognosis.

Despite numerous associations between blood leukocytes and TAA-reactive T cells, it was surprising that few correlations were found for populations of cells with suppressor phenotypes, namely Tregs and MDSCs. This suggests that cells corresponding to these putatively

Fig. 6 Combining multiple immunological parameters improves the accuracy of predicting patients with anti-tumour reactive T cells. a Greater specificity and sensitivity in identifying patients with tumour antigen-reactive T cells was achieved by combining immune parameters. The sensitivity and specificity was calculated based on the presence or absence of the following T cells: CD8 IFN γ ("CD8 SUR"), CD4 IL-2 ("CD4 MUC1") and CD4 IL-2 ("CD4 HER2"). b Combining multiple immune parameters also allowed the sorting of patients into groups who have stronger or weaker T cell responses to HER2, MUC1 or SUR. Representative examples shown (Mann–Whitney U test). The SI was used to represent the strength of T cell responses to HER2, MUC2 or SUR. SI stimulation index; HER2 human epidermal growth factor receptor 2; MUC1 mucin 1; SUR survivin; n = 50; ***p < 0.0005; *p < 0.02



suppressive phenotypes are not suppressive in breast cancer patients, or if they are suppressive, that they do not exert suppression against antigen-reactive T cells in blood. However, the frequencies of a number of cell populations related to MDSCs and Tregs, namely monocytes and CD4⁺ T cells, were found to be inversely related to the presence of TAA-reactive T cells. These observations suggest that there are leukocyte populations in blood which suppress T cell responses to tumour antigens, but that they remain imperfectly defined on a phenotypic level. A precise set of phenotypic markers capable of accurately identifying suppressive cells may in turn allow more accurate biomarkers for the identification of patients with tumour antigen-responsive T cells, but such markers remain elusive [21]. One obstacle to the identification of such specific markers is highlighted by the observation in this study that there are differences in the association with TAA-reactive T cells and I

eukocyte populations are dependent on the location of the cell population in question (whether in tissue or blood). This suggests that cellular location and phenotype are both relevant to the function of any given leukocyte population, and unless location-specific markers are found, may further limit the identification of marker proteins which accurately reflect cellular function.

Conclusion

This study identified composite sets of immune features which predict patients with TAA-reactive T cells. Considering that T cell responses to tumour antigens correlate with breast cancer patient survival, the biomarkers identified here which include HLA type, serum cytokines, tumour-infiltrating and blood leukocytes in addition to in vitro TAA-reactive T cells may allow superior prediction of patient survival or more personalised therapeutic management of breast cancer patients.

Funding This project (“ISPE-BREAST”) was jointly funded by the Bundesministerium für Bildung und Forschung in Germany (01EI1401) (GP as recipient) and the General Secretariat for Research and Technology in Greece (GER_1968) (CB).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Nicole Janssen, Sotirios P. Fortis, Lisa Speigl, Christoforos Haritos, Nectaria N. Sotiriadou, Michael Sofopoulos, Niki Arniogiannaki, Catherine Stavropoulos-Giokas, Amalia Dinou, Sonia Perez, Graham Pawelec, Constantin N. Baxevanis and Christopher Shipp declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Research involving animal and human rights This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors

References

- [1]. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, Larkin J, Long GV, Lorigan P, McArthur GA, Ribas A, Robert C, Schadendorf D, Garbe C (2016) Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies. *Eur J Cancer* 53:125–134. doi:10.1016/j.ejca.2015.09.013
- [2]. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhaufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Podubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crino L, Blumenschein GR Jr, Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR (2015) Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 373:1627–1639. doi:10.1056/NEJMoa1507643
- [3]. Weber JS, D’Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, Hoeller C, Khushalani NI, Miller WH Jr, Lao CD, Linette GP, Thomas L, Lorigan P, Grossmann KF, Hassel JC, Maio M, Sznol M, Ascierto PA, Mohr P, Chmielowski B, Bryce A, Svane IM, Grob JJ, Krackhardt AM, Horak C, Lambert A, Yang AS, Larkin J (2015) Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16:375–384. doi:10.1016/S1470-2045(15)70076-8
- [4]. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, Salama AK, Taylor M, Ott PA, Rollin LM, Horak C, Gagnier P, Wolchok JD, Hodi FS (2015) Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 372:2006–2017. doi:10.1056/NEJMoa1414428
- [5]. Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR, Gallino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carrabba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchiano A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Corsi M, Cascinelli N, Lewis JJ, Srivastava P, Parmiani G (2002) Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 20:4169–4180
- [6]. Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V, Boon T (2001) A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10290–10295. doi:10.1073/pnas.161260098
- [7]. Bailur JK, Gueckel B, Derhovanessian E, Pawelec G (2015) Presence of circulating Her2-reactive CD8⁺ T-cells is associated with lower frequencies of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, and better survival in older breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 17:34. doi:10.1186/s13058-015-0541-z
- [8]. Peoples GE, Gurney JM, Huelman MT, Woll MM, Ryan GB, Storrer CE, Fisher C, Shriver CD, Ioannides CG, Ponniah S (2005) Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 23:7536–7545. doi:10.1200/JCO.2005.03.047
- [9]. Disis ML, Dang Y, Coveler AL, Marzbani E, Kou ZC, Childs JS, Fintak P, Higgins DM, Reichow J, Waisman J, Salazar LG (2014) HER-2/neu vaccine-primed autologous T-cell infusions for the treatment of advanced stage HER-2/neu expressing cancers. *Cancer Immunol Immunother* 63:101–109. doi:10.1007/s00262-013-1489-4
- [10]. Mittendorf EA, Clifton GT, Holmes JP, Schneble E, van Echo D, Ponniah S, Peoples GE (2014) Final report of the phase I/II clinical trial of the E75 (nelipepimut-S) vaccine with booster inoculations to prevent disease recurrence in high-risk breast cancer patients. *Ann Oncol* 25:1735–1742. doi:10.1093/annonc/mdl211
- [11]. Bonertz A, Weitz J, Pietsch DH, Rahbari NN, Schlude C, Ge Y, Juenger S, Vlodavsky I, Khazaie K, Jaeger D, Reissfelder C, Antolovic D, Aigner M, Koch M, Beckhove P (2009) Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. *J Clin Invest* 119:3311–3321. doi:10.1172/JCI39608
- [12]. Horn T, Grab J, Schusdziarra J, Schmid S, Maurer T, Nawroth R, Wolf P, Pritsch M, Gschwend JE, Kubler HR, Beckhove P (2013) Antitumor T cell responses in bladder cancer are directed against a limited set of antigens and are modulated by regulatory T cells and routine treatment approaches. *Int J Cancer* 133:2145–2156. doi:10.1002/ijc.28233
- [13]. Hadaschik B, Su Y, Huter E, Ge Y, Hohenfellner M, Beckhove P (2012) Antigen specific T-cell responses against tumor antigens are controlled by regulatory T cells in patients with prostate cancer. *J Urol* 187:1458–1465. doi:10.1016/j.juro.2011.11.083
- [14]. Schmidt HH, Ge Y, Hartmann FJ, Conrad H, Klug F, Nittel S, Bernhard H, Domschke C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P (2013) HLA Class II tetramers reveal tissue-specific regulatory T cells that suppress T-cell responses in breast carcinoma patients. *Oncoimmunology* 2:e24962. doi:10.4161/onci.24962
- [15]. Brudvik KW, Henjum K, Aandahl EM, Bjornbeth BA, Tasken K (2012) Regulatory T-cell-mediated inhibition of antitumor immune responses is associated with clinical outcome in patients with liver metastasis from colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 61:1045–1053. doi:10.1007/s00262-011-1174-4
- [16]. Weed DT, Vella JL, Reis IM, De la Fuente AC, Gomez C, Sargi Z, Nazarian R, Califano J, Borrello I, Serafini P (2015) Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 21:39–48. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1711
- [17]. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI (2001) Increased

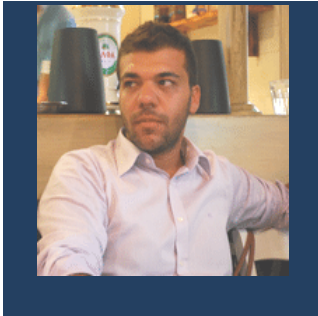
- production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166:678–689
- [18]. Solito S, Bronte V, Mandruzzato S (2011) Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells.
a. *Leukoc Biol* 90:31–36. doi:10.1189/jlb.0111021
- [19]. Messmer MN, Netherby CS, Banik D, Abrams SI (2015) Tumor-induced myeloid dysfunction and its implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 64:1–13. doi:10.1007/s00262-014-1639-3
- [20]. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory b. cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523–532. doi:10.1038/nri2343
- [21]. Shipp C, Speigl L, Janssen N, Martens A, Pawelec G (2016) A clinical and biological perspective of human myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-016-2278-y
- [22]. Castelli C, Rivoltini L, Rodolfo M, Tazzari M, Belgiovine C, Allavena P (2015) Modulation of the myeloid compartment of the immune system by angiogenic- and kinase inhibitor-targeted anti-cancer therapies. *Cancer Immunol Immunother* 64:83–89. doi:10.1007/s00262-014-1576-1
- [23]. Vayrynen JP, Kantola T, Vayrynen SA, Klintrup K, Bloigu R, Karhu T, Makela J, Herzig KH, Karttunen TJ, Tuomisto A, Makinen MJ (2016) The relationships between serum cytokine levels and tumor infiltrating immune cells and their clinical significance in colorectal cancer. *Int J Cancer* 139:112–121. doi:10.1002/ijc.30040
- [24]. Torres C, Linares A, Alejandre MJ, Palomino-Morales RJ, Caba O, Prados J, Aranega A, Delgado JR, Irigoyen A, Martinez-Galan J, Ortuno FM, Rojas I, Perales S (2015) Prognosis relevance of serum cytokines in pancreatic cancer. *Biomed Res Int* 2015:518284. doi:10.1155/2015/518284
- [25]. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birkbak NJ, Hiley CT, Watkins TB, Shafi S, Murugaesu N, Mitter R, Akarca AU, Linares J, Marafioti T, Henry JY, Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Schadendorf D, Garraway LA, Makarov V, Rizvi NA, Snyder A, Hellmann MD, Merghoub T, Wolchok JD, Shukla SA, Wu CJ, Peggs KS, Chan TA, Hadrup SR, Quezada SA, Swanton C (2016) Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 351:1463–1469. doi:10.1126/science.aaf1490
- [26]. Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, Rasalan TS, Ritter E, Gallardo HF, Xu Y, Pogoriler E, Terzulli SL, Kuk D, Panageas KS, Ritter G, Szol M, Halaban R, Jungbluth AA, Allison JP, Old LJ, Wolchok JD, Gnjatic S (2011) Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8⁺ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16723–16728. doi:10.1073/pnas.1110814108
- [27]. Lonchay C, van der Bruggen P, Connerotte T, Hanagiri T, Coulie P, Colau D, Lucas S, Van Pel A, Thielemans K, van Baren N, Boon T (2004) Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE anti-gen. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(Suppl 2):14631–14638. doi:10.1073/pnas.0405743101
- [28]. Karanikas V, Lurquin C, Colau D, van Baren N, De Smet C, Lethe B, Connerotte T, Corbiere V, Demoitie MA, Lienard D, Dreno B, Velu T, Boon T, Coulie PG (2003) Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus. *J Immunol* 171:4898–4904
- [29]. Peper JK, Stevanovic S (2015) A combined approach of human leukocyte antigen ligandomics and immunogenicity analysis to improve peptide-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 64:1295–1303. doi:10.1007/s00262-015-1682-8

Εικόνα 1-1: Ορόσημα στην εξέλιξη της ανοσοθεραπείας	11
Εικόνα 1-2: Αντικαρκινικές ανοσοθεραπείες που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια.	13
Εικόνα 1-3: Τα τρία στάδια της ανοσοδιαμόρφωσης (εξάλειψη-ισορροπία-διαφυγή του όγκου)	15
Εικόνα 1-4: Το στάδιο της εξάλειψης των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα.....	17
Εικόνα 1-5: Το στάδιο της ισορροπίας μεταξύ καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος	18
Εικόνα 1-6: Το στάδιο της αποδρομής των καρκινικών κυττάρων.....	19
Εικόνα 1-7: Εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης εναντίον του καρκινικού όγκου	21
Εικόνα 1-8: Επισκόπηση των βημάτων και των μεταβλητών που οδηγούν στην διήθηση και τη δράση των Τ-κυττάρων στους όγκους.	22
Εικόνα 1-9: Το ανοσοσκόρ (immunoscore) όπως προτάθηκε από τον Galon το 2006	23
Εικόνα 1-10: Συνδυασμός του ανοσοσκόρ με παράγοντες του ανοσοποιητικού συστήματος περιγράφουν το immune contecxture	24
Εικόνα 1-11: Το μικροπεριβάλλον του όγκου.....	25
Εικόνα 1-12: Κατηγορίες διήθησης του όγκου από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.....	26
Εικόνα 1-13: Παράγοντες που επηρεάζουν την στενή σχέση ανοσοποιητικού και καρκίνου.	27
Εικόνα 1-14: «Φραγμοί» στην ενεργοποίηση Τ-κυττάρων στον όγκο.	28
Εικόνα 1-15: «Θερμοί και ψυχροί» όγκοι.....	29
Εικόνα 1-16: Στόχος εμβολίων είναι η μετατροπή «ψυχρών» όγκων σε «θερμούς»	29
Εικόνα 1-17: Η συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας των CD8+ Τ-κυττάρων και τη συνολική επιβίωση μεταξύ των ασθενών με πρωτοπαθείς ή μεταστατικούς συμπαγείς όγκους.....	32
Εικόνα 1-18: Επιδράσεις της διήθησης υποπληθυσμών ανοσοκυττάρων στην πρόγνωση ασθενών με καρκίνο	33
Εικόνα 1-19: Κλινικά σενάρια για την αντίσταση στην ανοσοθεραπεία.....	37
Εικόνα 1-20: Γνωστοί ενδογενείς μηχανισμοί αντίστασης στην ανοσοθεραπεία.....	38
Εικόνα 1-21: Γνωστοί εξωγενείς μηχανισμοί αντίστασης στην ανοσοθεραπεία	38
Εικόνα 1-22: Η «γραμμική» κανονική οδός της επεξεργασίας των miRNAs	40
Εικόνα 1-23: Το Ago2 δημιουργεί ένα επιπλέον ενδιάμεσο, το ac-pre-miRNA	41
Εικόνα 1-24: Υπότυποι καρκίνου μαστού	45
Εικόνα 1-25: Τα miRNAs μπορεί να έχουν ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική δράση στον καρκίνο.....	47
Εικόνα 1-26: Τα MicroRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως όγκο-κατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια.	48
Εικόνα 1-27: Μηχανισμοί ανοσολογικής διαφυγής όγκων	51
Εικόνα 1-28: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης στην ανάπτυξη και δραστηριότητα ανοσοκυττάρων από miRNAs.....	56
Εικόνα 1-29: miRNAs που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και λειτουργία κυττάρων του έμφυτου σκέλους του ανοσοποιητικού συστήματος.....	58

Εικόνα 3-1: Αναπαράσταση των μεθοδολογιών που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	71
Εικόνα 3-2: Φωτογραφία του όγκου, όπου φαίνεται το κέντρο του όγκου-TC και το διηθητικό μέτωπο-IM.....	73
Εικόνα 3-3: Ενδεικτικές φωτογραφίες μετά την χρώση και στη συνέχεια με την επιλογή μόνο των «βαμμένων» περιοχών.....	74
Εικόνα 3-4: Στάδια επεξεργασίας εικόνων	75
Εικόνα 3-5: Εικόνα του σωληναρίου πριν και μετά τη φυγοκέντρηση δείγματος αίματος επιστοιβαγμένου σε διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων.....	77
Εικόνα 3-6: Διαχωρισμός κυττάρων περιφερικού αίματος μετά την φυγοκέντρηση σε διάλυμα διαχωρισμού.....	78
Εικόνα 3-7: Εικόνα του σωληναρίου BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube πριν και μετά τη φυγοκέντρηση δείγματος αίματος.....	79
Εικόνα 3-8: Αναπαράσταση της αιμοκυτταρομετρικής πλάκας Neubauer και της εικόνας του θαλάμου μέτρησης κατά την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.....	81
Εικόνα 3-9: Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων απομόνωσης των miRNAs από Α) ορό, Β) PBMCs και Γ) FFPE με τα αντίστοιχα kits.	83
Εικόνα 3-10: Γραφική παράσταση καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR.....	86
Εικόνα 3-11: Αντιπροσωπευτικές Καμπύλες αποδιάταξης (Α) και κορυφές αποδιάταξης (Β) των προϊόντων ενίσχυσης με Real-Time	87
Εικόνα 3-12: Στην εικόνα φαίνονται Α) Κορυφή αποδιάταξης και Β) καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR από τα πρώτα δοκιμαστικά πειράματα.	87
Εικόνα 4-1: Κατανομή των CD8+ & CD163+ κυττάρων στο κέντρο και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου	95
Εικόνα 4-2: Κατανομή των CD8+ & CD163+ κυττάρων στο κέντρο και στο διηθητικό μέτωπο του όγκου ανάλογα με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.	96
Εικόνα 4-3: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier των ασθενών σύμφωνα με εγκαθιδρυμένους κλινικοπαθολογικούς δείκτες.....	97
Εικόνα 4-4: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τα CD8+ & CD163+ κύτταρα ανάλογα με την πυκνότητα των υποπληθυσμών στο κέντρο TC και στο διηθητικό μέτωπο IM.	98
Εικόνα 4-5: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τον συνδυασμό CD8+ & CD163+ κυττάρων ανάλογα με την πυκνότητα των υποπληθυσμών το πρώτο γράμμα αναφέρεται στο κέντρο του όγκου TC και το δεύτερο στο διηθητικό μέτωπο IM.....	100
Εικόνα 4-6: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης.....	101
Εικόνα 4-7: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το στάδιο της νόσου.....	102
Εικόνα 4-8: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το μέγεθος του όγκου.	103
Εικόνα 4-9: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με τη διήθηση των λεμφαδένων.....	104
Εικόνα 4-10: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις ασθενείς που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης (grade), μέγεθος όγκου (T), διήθηση λεμφαδένων (LN) και σταδιοποίηση κατά TNM.....	105
Εικόνα 4-11: Ποσοστά ασθενών που χαρακτηρίζονται από τις FCIS και UCIS ανάλογα με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.....	106
Εικόνα 4-12: Α) Διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (CD4, CD8, CD163) στο κέντρο του όγκου (TC), στο διηθητικό μέτωπο (IM) και στο σύνολο (TOTAL). Β) Heatmap ασθενών όσον αφορά στη διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς στο TC, IM, TOTAL.	109

Εικόνα 4-13: Επίπεδα έκφρασης κυτταροκινών/ χημειοκινών σε ασθενείς BCa και υγιείς δότες.	110
Εικόνα 4-14: Συσχετίσεις κυτταροκινών/ χημειοκινών σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.	111
Εικόνα 4-15: Συσχετίσεις κυτταροκινών/ χημειοκινών σε υγιείς δότες.	112
Εικόνα 4-16: Σχετικά επίπεδα έκφρασης miRNAs από ορό ασθενών αλλά και υγιών δοτών.	113
Εικόνα 4-17: Σχετικά επίπεδα έκφρασης miRNAs από PBMCs ασθενών αλλά και υγιών δοτών.	114
Εικόνα 4-18: Σχηματική παρουσίαση των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των miRNAs από τον ορό και παραγόντων της κυκλοφορίας και του όγκου.	116
Εικόνα 4-19: Δενδρόγραμμα δημιουργίας ομάδων βάσει επιπέδων έκφρασης miRNAs από τον ορό ασθενών.	116
Εικόνα 4-20: Επίπεδα έκφρασης των miRNAs ανά συστάδα, όπως αυτές προέκυψαν από το πρόγραμμα SPSS, αλλά και στην ομάδα των υγιών δοτών.	117
Εικόνα 4-21: Άθροισμα λόγων miRNAs και όρια κάθε μιας από τις ομάδες που δημιουργήθηκαν.	117
Εικόνα 4-22: Υπολογισμός του δυναμικού πρόβλεψης του αθροίσματος, καθώς και των μεμονωμένων αναλογιών xi / di για κάθε ένα από τα 6 miRNAs.	118
Εικόνα 4-23: (A-B) miRSCORE αλγόριθμος όπως προκύπτει από το άθροισμα των λόγων του εκάστοτε miRNA και λαμβάνοντας υπόψη τον παράγοντα σπουδαιότητας. (C) ROC καμπύλες για την διάκριση των Cluster 1 και 2.	119
Εικόνα 4-24: Καμπύλη ROC για το σύνολο των δειγμάτων.	120
Εικόνα 4-25: Καμπύλες ROC για κάθε συστάδα/ cluster. Στον πίνακα παρατίθενται οι τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας και AUC.	121
Εικόνα 4-26: A) Επίπεδα έκφρασης miRNAs από ορό, B) Επίπεδα έκφρασης κυτταροκινών/χημειοκινών ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού. C) Ποσοστά ασθενών με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα έκφρασης κυτταροκινών/χημειοκινών ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.	122
Εικόνα 4-27: Διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς κυττάρων ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.	123
Εικόνα 4-28: Ηλικίες ασθενών ανά ομάδα ασθενών.	124
Εικόνα 4-29: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών ανά ομάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.	124
Εικόνα 4-30: Ποσοστά ασθενών που φέρουν ευνοϊκές ή δυσμενείς υπογραφές ανά ομάδες ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.	125
Εικόνα 4-31: Ποσοστά ασθενών που εκφράζουν συγκεκριμένα αλληλία όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.	126
Εικόνα 4-32: A) Επίπεδα έκφρασης miRNAs από τομές παραφίνης ανά συστάδα ασθενών όπως προέκυψε από την κατηγοριοποίηση τους με τον αλγόριθμο, B) Ποσοστιαία κατανομή ασθενών ανά συστάδα για τα επίπεδα έκφρασης κάθε miRNA. C) Ποσοστιαία κατανομή ασθενών με υψηλά (κόκκινο) ή χαμηλά (μπλε) επίπεδα έκφρασης miRNAs στην ομάδα ασθενών που χαρακτηρίζονται από δυσμενείς (UCIS) ή ευνοϊκές (FCIS) υπογραφές.	128

Πίνακας 1-1: Διαφορές μεταξύ «ανοσοσκόρ» και «ανοσολογικού προφίλ».....	25
Πίνακας 1-2: Επίδραση της πυκνότητας των τύπων ανοσοκυττάρων που διηθούν τον όγκο στην πρόγνωση ασθενών με καρκίνο.	34
Πίνακας 1-3: Τα im-miRNAs που επηρεάζουν την ανοσολογική διαφυγή του όγκου και την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων.....	54
Πίνακας 3-1: Αντιδραστήρια για τη κατασκευή cDNA.....	84
Πίνακας 3-2: Θερμικό πρωτόκολλο για τη κατασκευή cDNA.	84
Πίνακας 3-3: Στοιχειομετρία αντίδρασης.	88
Πίνακας 3-4: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR.	88
Πίνακας 3-5: Εκκινητές για την ανίχνευση των miRNAs.....	88
Πίνακας 4-1: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.	94
Πίνακας 4-2: Συγκρίσεις DFS και OS βάσει ευνοϊκών και δυσμενών υπογραφών σε ομάδες ασθενών ανάλογα με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους	106
Πίνακας 4-3: Αναλογική παλινδρόμηση κινδύνου Cox (Multivariate Cox proportional hazard analysis) για DFS και OS σε ασθενείς με διηθητικό, μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού.	107
Πίνακας 4-4: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.....	108
Πίνακας 4-5: Συσχετίσεις των miRNAs από τον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού.	113
Πίνακας 4-6: Συσχετίσεις των miRNAs από PBMCs ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	114
Πίνακας 4-7: Συσχετίσεις παραγόντων της κυκλοφορίας μεταξύ τους αλλά και με την διήθηση από ανοσοκυτταρικούς υποπληθυσμούς.....	115
Πίνακας 4-8: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών ανά συστάδα ασθενών όπως προέκυψαν από τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs του ορού.....	125



Sotirios P. Fortis
Biologist, M.Sc, PhDc
Date of birth:
 27/04/1989

Communication: tel: +302106409468, +306942074451
 e-mail: fortis@ciic.gr, sotirisfortis@gmail.com



EDUCATION

- **2015-Currently:** PhD student, National and Kapodistrian University of Athens, Greece, Medical School and Cancer Immunology and Immunotherapy Center, "Saint Savas" Cancer Hospital, Greece
- **2012-2014:** Master of Science, National and Kapodistrian University of Athens, Greece, "Applications of Biology in Medicine"
- **2007-2012:** Diploma in Biology, University of Ioannina, Department of Biological Applications & Technology, Greece

TRAINING COURSES

- **9/2017-12/2107: Translational Research in Clinical Oncology (TRACO),** Center for Cancer Research (CCR), National Cancer Institute, National Institutes of Health, Fredrick MD, USA
- **9/2017-12/2107: Cancer Immunotherapy,** Foundation for Advanced Education in the Sciences (FAES) Graduate School at National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda MD, USA

POSITION-EXPERIENCE

- **06/2017-11/2017:** PhD student, Vaccine Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Fredrick MD, USA
- **06/2016-02/2017:** Biologist in Microbiology, Hematology and Biochemistry Laboratory, 414 Military Hospital for Special Diseases, Penteli, Greece
- **2015-Currently:** PhD student, Cancer Immunology and Immunotherapy Center, "Saint Savas" Cancer Hospital, Greece. Thesis title: "Immune signatures within the tumor and in the peripheral blood as prognostic/predictive biomarkers in Breast Cancer"
- **April 2014- September 2015:** Research Associate, Cancer Immunology and Immunotherapy Center, "Saint Savas" Cancer Hospital, Greece
- **2012-2014:** Master Thesis, Cancer Immunology and Immunotherapy Center & Laboratory of Immunology in the Department of Animal and Human Physiology, in the Faculty of Biology at National and Kapodistrian University of Athens, Greece. Thesis title: "The action of prothymosin alpha (proTα) as an immunomodulator"
- **2007-2012:** Diploma Thesis, Cancer Immunology and Immunotherapy Center, "Saint Savas" Cancer Hospital, Greece. Title: "Study of the enzyme Indoleamine 2.3 Dioxygenase (IDO) and the percentages of T regulatory cells (Tregs) in the development of breast adenocarcinomas and investigation of immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment"

PUBLICATIONS

1. Dionysios C. Watson, Eirini Moysi, Antonio Valentin, Cristina Bergamaschi, Santhi Devsundaram, **Sotirios Fortis**, Claire Deleage, Jacob D. Estes, Elena Chertova, Jeffrey D. Lifson, Constantinos Petrovas, Barbara K. Felber, George N. Pavlakis. Treatment with native heterodimeric IL-15 increases cytotoxic lymphocytes and reduces SHIV RNA in lymph nodes. *PLOS Pathogens*, 2018
2. **Fortis SP**, Sofopoulos M, Sotiriadou NN, Haritos C, Vaxevanis CK, Anastasopoulou EA, Janssen N, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Pawelec G, Perez SA, Baxevanis CN. Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2017
3. **Sotirios P. Fortis**, Louisa G. Mahaira, Eleftheria A. Anastasopoulou, Ioannis F. Voutsas, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Immune profiling of melanoma tumors reflecting aggressiveness. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2017
4. Nicole Janssen, **Sotirios P. Fortis**, Lisa Speigl, Christoforos Haritos, Nectaria N. Sotiriadou, Michael Sofopoulos, Niki Arnogiannaki, Catherine Stavropoulos-Giokas, Amalia Dinou, Sonia Perez, Graham Pawelec, Constantin N. Baxevanis, Christopher Shipp. Peripheral T cell responses to tumour antigens are associated with molecular, immunogenetic and cellular features of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017
5. **Sotirios P. Fortis**, Ioannis F. Voutsas, Eleftheria A. Anastasopoulou, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis, Louisa G. Mahaira. Potential prognostic molecular signatures in a preclinical model of melanoma. *Anticancer Research*, 2017
6. Mahaira LG, Katsara O, Pappou E, Iliopoulou EG, **Fortis S**, Antsaklis A, Fotinopoulos P, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. IGF2BP1 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells Significantly Affects Their Proliferation and Is Under the Epigenetic Control of TET1/2 Demethylases. *Stem Cells Dev* 2014
7. Pinelopi Samara, Spyridoula-Aggeliki Nikou, **Sotirios Fortis**, Ioannis Voutsas, Constantin Baxevanis, Ourania Tsitsilonis. New pharmaceutical formulations in the fight against cancer: how toll-like receptor (tlr) agonists enhance the activity of anticancer vaccines. *PHARMAKEFTIKI*, 26, II, 2014

CONGRESSES – POSTER/ ORAL PRESENTATIONS

- Dionysios C. Watson, Eirini Moysi, Antonio Valentin, Cristina Bergamaschi, Santhi Devsundaram, **Sotirios Fortis**, Claire Deleage, Jacob D. Estes, Elena Chertova, Jeffrey D. Lifson, Constantinos Petrovas, Barbara K. Felber, George P. Pavlakis. IL-15 treatment increases cytotoxic lymphocytes in follicles and reduces SHIV RNA. *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston*, Massachusetts, March 2018
- Michael Sofopoulos, Christoforos K. Vaxevanis, **Sotirios P. Fortis**, Nectaria N. Sotiriadou, Niki Arnogiannaki, Alexandros Ardavanis, Dimitrios Vlachodimitropoulos, Constantin N. Baxevanis, Sonia A. Perez. Tertiary Lymphoid Structures in Breast Cancer: Evaluating their correlation with tumor immune-cell infiltration and clinical outcome. *3rd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy*, Athens, Greece, November 2017
- Savvas Stokidis, Amalia Dinou, **Sotirios P. Fortis**, Christoforos K. Vaxevanis, Marina Konstantellou, Catherine Stavropoulos-Giokas, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. The impact of HLA-A*02 and HLA-A*24 allele expression in Prostate Cancer prognosis. *3rd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy*, Athens, Greece, November 2017

- **Sotirios P. Fortis**, Michael Sofopoulos, Nectaria N. Sotiriadou, Christoforos Haritos, Christoforos K. Vaxevanis, Eleftheria A. Anastasopoulou, Niki Arnogiannaki, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. **43rd Annual Hellenic Medical Congress**, Athens, Greece, May 2017
- **Sotirios P. Fortis**, Christoforos K. Vaxevanis, Nectaria N. Sotiriadou, Michael Sofopoulos, Christoforos Haritos, Niki Arnogiannaki, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis, Louiza G. Mahaira. Liquid biopsy and tumor characteristics as probable biomarkers in breast cancer. **43rd Annual Hellenic Medical Congress**, Athens, Greece, May 2017
- **Sotirios P. Fortis**, Christoforos K. Vaxevanis, Michael Sofopoulos, Nectaria N. Sotiriadou, Christoforos Haritos, Niki Arnogiannaki, Constantin N. Baxevanis, Sonia A. Perez, Louiza G. Mahaira. Peripheral blood miRNAs: Liquid biopsy in breast cancer. **23rd Congress of Clinical Oncology**, Athens, Greece, April 2017
- **Sotirios P. Fortis**, Michael Sofopoulos, Nectaria N. Sotiriadou, Christoforos Haritos, Christoforos K. Vaxevanis, Eleftheria A. Anastasopoulou, Nicole Janssen, Niki Arnogiannaki, Alexandros Ardavanis, Graham Pawelec, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in Breast Cancer. **2nd Symposium in Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy**, Athens, Greece, 15-17 December 2016
- **Sotirios P. Fortis**, Louisa G. Mahaira, Nectaria Sotiriadou, Michael Sofopoulos, Christoforos Haritos, Nikolaos Anastasopoulos, Niki Arnogiannaki, Alexandros Ardavanis, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Prognostic relevance of tumor infiltrating immune populations and of circulating miRNAs and cytokines/chemokines in Breast Cancer (BC). **International Congress of Immunology 2016, Melbourne**, Australia, 21-26 August 2016
- **Sotirios P. Fortis**, Louisa G. Mahaira, Christoforos Haritos, Nectaria N. Sotiriadou, Michael Sofopoulos, John F. Voutsas, Eleftheria A. Anastasopoulou, Niki Arnogiannaki, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Immune signatures within the tumor and in the peripheral blood as prognostic/predictive biomarkers in Breast Cancer. **42nd Annual Hellenic Medical Congress**, Athens, Greece, May 2016 **“AWARDED IN THE FIELD OF APPLIED RESEARCH, oral presentation”**
- Eleftheria A. Anastasopoulou, Ioanna Kalogeropoulou, Christoforos Vaxevanis, Panagiotis Tzonis, Theodora Keramitsoglou, Marigoula Varla-Leftherioti, Ioannis F.Voutsas, **Sotirios P.Fortis**, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Impact of HLA Class I and Class II Antigen Expression on pre-existing antitumor immunity and outcome in cancer patients receiving active immunotherapy. **30th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference**, Kos, Greece, May 2016
- **Sotirios P. Fortis**, Christopher Shipp, Constantin N. Baxevanis, Graham Pawelec. Immune signatures within the tumor and in the peripheral blood as prognostic/predictive biomarkers in Breast Cancer. **Greek-German Days on Research, Innovation & Young Scientists 2015**, Athens, Greece, December 2015 **“AWARDED”**
- **Sotirios P. Fortis**, Louisa G. Mahaira, Michael Sofopoulos, Nectaria N. Sotiriadou, Christoforos Haritos, John F. Voutsas, Niki Arnogiannaki, Nikolaos Anastasopoulos, Christopher Shipp, Graham Pawelec, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Linking tumor with systemic environment in the search for novel biomarkers in breast cancer. **SITC Annual Meeting**, National Harbor, Maryland, November 2015
- Nicole Janssen, Graham Pawelec, Lisa Speigl, **Sotirios P. Fortis**, Christoforos Haritos, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis, Jithendra Kini Bailur, Christopher Shipp. Immune profiling of breast cancer patients: relationship between tumour antigen T cell responses with suppressor and effector leukocyte populations. **SITC Annual Meeting**, National Harbor, Maryland, November 2015
- Eleftheria A Anastasopoulou, Panagiotis Tzonis, **Sotirios P. Fortis**, Louisa Mahaira, Christoforos Vaxevanis, Alexandros Ardavanis, Elizabeth A Mittendorf, George E Peoples, Constantin N Baxevanis, Michael Papamichail, Sonia A Perez. DRB1*11 allele expression and HER2 pre-existing immunity may predict benefit

in breast cancer patients vaccinated with the HER2 modified AE37 peptide vaccine. **SITC Annual Meeting**, National Harbor, Maryland, November 2015

- **S. P. Fortis**, C. Haritos, M. Sofopoulos, N. N. Sotiriadou, N. Anastasopoulos, S. A Perez, C. N. Baxevanis. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) as prognostic/predictive biomarkers in patients with breast cancer (BCa) **4th European Congress of Immunology**, Vienna, Austria, September 2015
- **S. P. Fortis**, L. G. Mahaira, N. Anastasopoulos, C. Haritos, M. Sofopoulos, E.G. Iliopoulou, I. Kalogeropoulou, S. A Perez, C. N. Baxevanis. Liquid biopsies as tool for prognostic/predictive biomarker discovery in Breast Cancer patients **4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015**
- **Sotirios P. Fortis**, Nectaria N. Sotiriadou, Michael Sofopoulos, Christoforos Haritos, Niki Arnogiannaki, Nikos Anastasopoulos, Graham Pawelec, Michael Papamichail, Sonia A. Perez, Constantin N. Baxevanis. Intratumoral and systemic immunity as prognostic biomarkers in patients with breast cancer, **CIMT Annual Meeting**, Mainz, Germany, May 2015
- Voutsas I, Samara P, Tsiatas M, Skopeliti M, **Fortis S**, Bamias A, Georgaki s, Tsitsilonis O. Activation of the human natural killer cells NK-92 with a lymphocyte-derived cytokine-rich supernatant. **ASCO Annual Meeting**, Chicago, Illinois, May 2014
- **Fortis Sotirios**, Samara Pinelopi, Voutsas Ioannis, Baxevanis Constantinos, Tsitsilonis Ourania: Increased levels of prothymosin α promote the proliferation of murine melanoma cells. **36th Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Science**, Ioannina, Greece, May 2014
- **Fortis Sotirios**, Samara Pinelopi, Geitona Paraskeui, Voutsas Ioannis, Tsitsilonis Ourania: Activation of the human natural killer cells NK-92 with a lymphocyte-derived cytokine-rich supernatant. **40th Annual Hellenic Medical Congress**, Athens, Greece, May 2014
- Gkraikou Themis, **Fortis Sotiris**, Toukli David, Samara Pinelopi, Voutsas Ioannis, Tsitsilonis Ourania: Phenotypic changes during apoptosis of leukocyte subpopulations after incubation with thymic peptides. **36th Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Science**, Ioannina, Greece, May 2014
- Ioannou K, Samara P, Williams ED, Kappa N, **Fortis S**, Kavrohorianou A, Haralambous S, Tsitsilonis O: Prothymosin alpha and its immunoreactive decapeptide are not cytotoxic and retard tumor growth in an in vivo mouse melanoma model. **Ageing and Cancer cell biology: Convergent and divergent molecular mechanisms**, Athens, Greece, June 2013

HONORS/AWARDS

- **2016**: Informational trip in German institutions (Molecular Cancer Research Centre of the Charité, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, German Cancer Research Center & Center for Integrated Ontology, Bonn) for the award winners of the joint poster presentation at the Greek-German Days on Research, Innovation & Young Scientists at the invitation of BMBF (**Bundesministerium für Bildung und Forschung**)
- **2016**: Award in 42nd Annual Hellenic Medical Congress in the field of Applied Research
- **2015**: Young Scientist "Greek-German Days on Research, Innovation & Young Scientists 2015" Greek Ministry of Education, Research and Religious Affairs & German Federal Ministry of Education and Research
- **2013-2014**: Scholarship for postgraduate studies by the Centre for Hellenism Damianos Foundation
- **2012**: Graduated as 4th in his academic year
- **2010-2011**: Scholarship as the student with the highest score in my academic year by the State Scholarships Foundation-IKY

INVITED SPEAKER

- Masterclass on Immuno-oncology, Athens, Greece, 16-17 June 2017
- Masterclass on Immuno-oncology, Athens, Greece, 24-25 June 2016
- 2nd Conference Fertility in neoplastic patients, Athens, Greece, 24-27 June 2016
- Masterclass on Immuno-oncology, Athens, Greece, 21-22 May 2015
- M.Sc Program (Molecular Medicine) at National and Kapodistrian University of Athens, Greece

LABORATORIES SKILLS

- Animal Models: Mouse handling, intraperitoneal, subcutaneous and intravenous injections
- Quantification of infiltrating cells from FFPE slides
- DNA, RNA, miRNA extraction from body fluids and FFPE tissues, cDNA, Real Time PCR
- Long and short term Cell cultures (PBMCs and Cancer cell lines), cell cloning, cell freezing/thawing
- Multiplexed Cytokine quantification and HLA typing with the Luminex platform, ELISA, ELISPOT, magnetic-bead cell sorting, cell immunophenotyping and sorting using flow cytometry
- Intern and Master's candidate training in the lab environment

COMMUNICATION SKILLS:

- Excellent presentation and negotiation skills
- Combine patience, determination, and persistence to troubleshoot issues
- Enjoy working as a team member as well as independently
- Supervising and coordinating M.Sc candidates

EXTRACURRICULUM ACTIVITIES AND HOBBIES:

- Teaching Biology
- Acting lessons
- Traditional dancing
- Volunteer at Athens Science Festivals, Ultra-marathon Festivals