



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΠΜΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακές και ανοσολογικές «υπογραφές» στο περιφερικό  
αίμα ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου**

POST GRADUATE THESIS

**Molecular and immunologic signatures in the peripheral blood of head  
and neck cancer patients**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Ραφαηλία Κουλαξίδου  
Rafailia Koulaxidou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Σωτήριος Φόρτης  
Sotirios Fortis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

# **Molecular and immunologic signatures in the peripheral blood of head and neck cancer patients**

RAFAILIA KOLAXIDOU

dml20008

[Rafailiak17@gmail.com](mailto:Rafailiak17@gmail.com)

FIRST SUPERVISOR

SOTIRIOS FORTIS

SECOND SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEBARDIS

THIRD SUPERVISOR

EFSTATHIA PAPAGEORGIOU

AIGALEO 2022

**Επιτροπή εξέτασης**

Ημερομηνία εξέτασης: 10/02/2023

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> Εξεταστής Σωτήριος Φόρτης

2<sup>ος</sup> Εξεταστής Αναστάσιος  
Κριεμπάρδης

## Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ραφαηλία Κουλαξίδου του Στεργίου, με αριθμό μητρώου dm120008 φοιτητής/τρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι τον Φεβρουάριο 2023 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Ραφαηλία Κουλαξίδου

## Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας, στο Κέντρο Έρευνας του Καρκίνου του Γενικού Αντικαρκινικού – Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας», στα πλαίσια του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διευθυντή του Κέντρου Δρ. Μπαξεβάνη Κωνσταντίνο για την ευκαιρία που μου έδωσε. Νιώθω ευγνώμων που μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ με σπουδαίους ανθρώπους, να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, καθώς επίσης για το φιλικό περιβάλλον εργασίας, για την καθοδήγηση, την κατανόηση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν από την αρχή μέχρι το τέλος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της Διπλωματικής Εργασίας μου, μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Φόρτη Σωτήριο, που βρισκόταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, για τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε, για την συνεχή καθοδήγηση κατά την συγγραφή και την πειραματική διαδικασία και για την ακούραστη στήριξη του. Παράλειψη θα ήταν να μην αναφερθώ στην υποψήφια διδάκτορα Μπατσάκη Παναγιώτα και να την ευχαριστήσω για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε, για τις χρήσιμες συμβουλές και γνώσεις που απλόχερα μου προσέφερε και για την αδιάκοπη στήριξη της. Ευχαριστώ θερμά και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Γουλιελμάκη Μαρία για τις συμβουλές της. Η βοήθεια, αυτών των ανθρώπων, τόσο σε επιστημονικό όσο και ηθικό επίπεδο συνέβαλε όχι μόνο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας αλλά κυρίως στην ανάπτυξη μιας ουσιαστικής επικοινωνίας που για εμένα είναι ανεκτίμητη.

Ολοκληρώνοντας, εγκάρδιες ευχαριστίες στην οικογένεια μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την ηθική υποστήριξη, την συμπαράσταση και την παντός επιπέδου βοήθεια που μου προσέφεραν.



## Περίληψη

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου (ΚΚΤ) είναι ο έβδομος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως, με ιδιαίτερα υψηλή επιθετικότητα και θνησιμότητα και ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων. Καθώς η εντόπιση και η διάγνωση της νόσου πραγματοποιούνται στις περισσότερες περιπτώσεις σε προχωρημένο στάδιο, οι ασθενείς υποφέρουν από έντονα συμπτώματα, ενώ η καθυστέρηση έναρξης της θεραπείας μπορεί να οδηγήσει σε κακή πρόγνωση. Ταυτόχρονα, η απουσία επικυρωμένων προβλεπτικών βιοδεικτών οδηγεί πολλές φορές στη λανθασμένη επιλογή χορηγούμενης θεραπείας, με αυξημένη τοξικότητα και ελαττωμένη ανταπόκριση των ασθενών με ΚΚΤ. Συνεπώς, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης νέων κλινικά σημαντικών προβλεπτικών βιοδεικτών για την επιλογή των ασθενών που είναι πιθανότερο να ανταποκριθούν στην κατά περίπτωση αντικαρκινική θεραπεία.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση πρότυπων θεραπειών στην β αλυσίδα του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR Vβ), στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΚΚΤ. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας Vβ του TCR πραγματοποιήθηκε με αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) σε 24 δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από 12 ασθενείς με ΚΚΤ κατά την διάγνωση και μετά το τέλος της εκάστοτε θεραπείας. Βάσει των αποτελεσμάτων, η συχνότητα εμφάνισης και ο αριθμός των TCR κλωνότυπων παρουσίασαν μικρή αύξηση μετά τη θεραπεία στο σύνολο των ασθενών, χωρίς όμως αυτές οι μεταβολές να είναι στατιστικά σημαντικές. Παρόλα αυτά, σημαντικές αλλαγές στις συχνότητες μεταξύ των κορυφαίων 10 TCR Vβ κλωνότυπων ανιχνεύθηκαν μετά τη θεραπεία. Ορισμένοι ασθενείς ανέπτυξαν νέους κλωνότυπους σε υψηλές συχνότητες ενώ παρατηρήθηκε και η εξαφάνιση κλωνότυπων που βρίσκονταν σε αφθονία πριν από τη θεραπεία. Αυτά τα δεδομένα παρέχουν προκαταρκτικά στοιχεία ότι οι πρότυπες θεραπείες σε ασθενείς με ΚΚΤ μπορούν να επάγουν συστηματικές ανοσολογικές αποκρίσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε μελλοντικές θεραπείες για βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα. Επίσης, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την κλινική έκβαση των ασθενών της μελέτης, θα μπορούσε να αναδείξει τις μεταβολές του TCR ρεπερτορίου σε προβλεπτικό βιοδείκτη απόκρισης στη θεραπεία ασθενών με ΚΚΤ.

**Λέξεις κλειδιά:** καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, TCR ρεπερτόριο, προβλεπτικοί βιοδείκτες, αντικαρκινική θεραπεία, προσαρμοστική αντικαρκινική ανοσία

## Abstract

Head and neck cancer (HNC) is the seventh most common cancer type worldwide, with particularly high aggressiveness and mortality and a variety of clinical manifestations. As in most cases detection and diagnosis of the disease takes place at an advanced stage, patients suffer from severe symptoms, and delay in treatment initiation can lead to a poor prognosis. At the same time, the absence of validated predictive biomarkers often leads to the wrong choice of administered treatment, with increased toxicity and reduced response of HNC patients. Therefore, the need for new clinically relevant predictive biomarkers for the selection of patients who are most likely to respond to the appropriate anticancer treatment is imperative.

In the present study, the effect of standard treatments on the  $\beta$  chain of the T cell receptor (TCR V $\beta$ ), in the peripheral blood of patients with HNC, was investigated. TCR V $\beta$  sequencing was performed by next-generation sequencing (NGS) in 24 blood samples collected from 12 HNC patients at diagnosis and after the end of the treatments. Based on the results, the frequency and richness of TCR clonotypes showed a small increase after treatment in all patients, but these changes were not statistically significant. Nevertheless, significant changes in frequencies among the top 10 TCR V $\beta$  clonotypes were detected after treatment. Some patients developed new clonotypes at high frequencies, while disappearance of clonotypes that were abundant before treatment was also observed. These data provide preliminary evidence that standard therapies in HNC patients can induce systemic immune responses, which could be exploited in future therapies for improved clinical outcomes. Moreover, the correlation of the results with the patients' clinical outcomes, could highlight alterations in the TCR repertoire as a predictive biomarker of response to treatment of patients with HNC.

Keywords: head and neck cancer, TCR repertoire, predictive biomarkers, anticancer treatment, adaptive anti-cancer immunity



## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας .....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Περίληψη .....	vii
Abstract .....	viii
Κατάλογος Εικόνων .....	xii
Κατάλογος Πινάκων .....	xiii
Συνομογραφίες .....	xiv
Πρόλογος.....	1
<b>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή .....</b>	<b>2</b>
1.1 Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου .....	2
1.1.1 Συμπτωματολογία.....	2
1.1.2 Παράγοντες κινδύνου .....	4
1.1.2.1 Κάπνισμα .....	5
1.1.2.2 Κατανάλωση αλκοόλ .....	6
1.1.3 Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων – HPV.....	9
1.1.3.1 Το γονιδιωματικό προφίλ σε HPV θετικούς όγκους κεφαλής και τραχήλου .....	10
1.1.3.2 Το γονιδιωματικό προφίλ σε HPV αρνητικούς όγκους κεφαλής και τραχήλου .....	13
1.1.4 Το μικροπεριβάλλον του όγκου στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου .....	14
1.1.5 Επιδημιολογικά δεδομένα για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου .....	15
1.1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου .....	18
1.1.6.1 Χειρουργική αφαίρεση όγκου .....	18
1.1.6.2 Χημειοθεραπευτικά και στοχευμένα φάρμακα .....	18
1.1.6.3 Ακτινοθεραπεία .....	19
1.1.6.4 Ανοσοθεραπεία .....	20
1.2 Ο υποδοχέας των T κυττάρων.....	22
1.2.1 Οι λειτουργίες των T κυττάρων.....	22
1.2.2 Διαφορές υποδοχέων αντιγόνου των T και B κυττάρων .....	23
1.2.3 Αναγνώριση αντιγόνων από τους υποδοχείς TCR.....	24
1.2.4 Διάταξη των γονιδίων του υποδοχέα των T κυττάρων .....	25
1.2.5 Η ποικιλομορφία των υποδοχέων των T κυττάρων .....	27
1.2.6 Η αλληλούχιση των υποδοχέων των T κυττάρων .....	29
1.3 Ο υποδοχέας των T κυττάρων ως προγνωστικός και προβλεπτικός βιοδείκτης στον καρκίνο ...	31
1.3.1 Η ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών ανταπόκρισης των ασθενών στις αντικαρκινικές θεραπείες ..	31
1.3.2 Ο TCR ως βιοδείκτης ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία.....	33
1.3.2.1 Οι επιδράσεις της θεραπείας anti-CTLA-4 στο ρεπερτόριο του TCR.....	34

1.3.2.2 Οι επιδράσεις της θεραπείας anti-PD-L1 στο ρεπερτόριο του TCR.....	34
1.3.3 Ο TCR ως βιοδείκτης της ανοσολογικής απόκρισης στην ακτινοθεραπεία .....	35
1.3.3 Βιοδείκτες από την συνέργεια της ανοσοθεραπείας με ακτινοθεραπεία .....	36
<b>Σκοπός της μελέτης.....</b>	<b>38</b>
<b>Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>39</b>
2.1 Υλικά.....	39
2.1.1 Εμπορικά διαθέσιμα κιτ αντιδράσεων .....	39
2.1.2 Αναλώσιμα .....	39
2.1.3 Όργανα- Συσκευές .....	39
2.1.4 Λογισμικό .....	40
2.2 Μέθοδοι.....	40
2.2.1 Ασθενείς και δείγματα .....	40
2.2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA.....	41
2.2.2.1 Λύση αίματος.....	41
2.2.2.2 Δέσμευση του DNA.....	42
2.2.2.3 Καθαρισμός του απομονωμένου DNA .....	42
2.2.2.4 Έκλυση του DNA .....	43
2.2.2.5 Αποθήκευση του DNA .....	43
2.2.3 Προετοιμασία βιβλιοθηκών για την ανάλυση του TCR.....	43
2.2.3.1 Προετοιμασία της αντίδρασης για την ενίσχυση του στόχου .....	44
2.2.3.2 Μερική πέψη των αμπλικονίων .....	46
2.2.3.3 Σύνδεση αμπλικονίων με τους αντάπτορες και καθαρισμός.....	46
2.2.3.4 Καθαρισμός βιβλιοθήκης .....	47
2.2.3.5 Ενίσχυση των παρασκευασμένων βιβλιοθηκών .....	48
2.2.3.6 Καθαρισμός των ενισχυμένων βιβλιοθηκών.....	49
2.2.3.7 Έκλυση της βιβλιοθήκης.....	50
2.2.3.8 Ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών .....	50
<b>Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα .....</b>	<b>53</b>
3.1 Βασικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών .....	53
3.2 Ανάλυση του ρεπερτορίου TCR Vβ για το σύνολο των ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία .....	55
3.3 Ανάλυση των 10 πιο συχνών κλωνότυπων ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία .....	56
3.4 Μεταβολές των συχνότητων των 10 πιο συχνών κλωνότυπων ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία βάσει της CDR3 αλληλουχίας .....	60
3.5 Ανάλυση των μεταβολών των συχνότητων των TRBV και TRBJ γονιδίων στους ασθενείς μετά τη θεραπεία.....	64
<b>Κεφάλαιο 4. Συζήτηση .....</b>	<b>67</b>
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>71</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>73</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>I</b>



## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Οι ανατομικές περιοχές ανάπτυξης καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. ....	2
Εικόνα 2. Η επίδραση των καρκινογόνων παραγόντων στην εμφάνιση καρκίνου κεφαλής και τραχήλου.....	5
Εικόνα 3. Η διαδικασία μεταβολισμού της αλκοόλης από αιθανόλη σε οξικό άλας. ....	7
Εικόνα 4. Οι βασικές επιδράσεις του αλκοόλ που επάγουν την καρκινογένεση. ....	8
Εικόνα 5. Ανώμαλη ενδοκυττάρια σηματοδότηση σε HPV+ όγκο. ....	12
Εικόνα 6. Γενετικές αλλοιώσεις σε HPV- όγκο.....	14
Εικόνα 7. Κατανομή των περιστατικών κεφαλής και τραχήλου παγκοσμίως για το 2020. ....	16
Εικόνα 8. Επιδημιολογία του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου για το 2020 και προβλέψεις έως το 2040.....	17
Εικόνα 9. Δομή των Β και Τ υποδοχέων αντιγόνου. ....	24
Εικόνα 10. Η ομοιότητα του υποδοχέα των Τ κυττάρων με το θραύσμα Fab. ....	26
Εικόνα 11. Οργάνωση των αλυσίδων α και β του υποδοχέα των Τ κυττάρων.....	27
Εικόνα 12. Η δομή του TCR, με έμφαση στη θέση πρόσδεσης αντιγόνου (υπερ-μεταβλητή περιοχή). ....	28
Εικόνα 13. Προσθήκη αντιδραστηρίων για τη λύση του αίματος.....	41
Εικόνα 14. Δέσμευση του DNA στη στήλη.....	42
Εικόνα 15. Διαδοχικοί καθαρισμοί του DNA.....	42
Εικόνα 16. Έκλυση του απομονωμένου DNA.....	43
Εικόνα 17. Στατιστική ανάλυση των μεταβολών του TCR ρεπερτορίου στο σύνολο των ασθενών πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας.....	56
Εικόνα 18. Οι αλλαγές στην σειρά κατάταξης των TCR κλωνότυπων των 6 πρώτων ασθενών ως προς την συχνότητα.....	57
Εικόνα 19. Οι αλλαγές στην σειρά κατάταξης των TCR κλωνότυπων των 6 υπόλοιπων ασθενών ως προς την συχνότητα. ....	59
Εικόνα 20. Η κατανομή των επικρατέστερων TCR κλωνοτύπων βάσει των TRBV γονιδίων των 4 πρώτων ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία. ....	61
Εικόνα 21. Η κατανομή των επικρατέστερων TCR κλωνοτύπων βάσει των TRBV γονιδίων των 4 επόμενων ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία.....	62
Εικόνα 22. Η κατανομή των επικρατέστερων TCR κλωνοτύπων βάσει των TRBV γονιδίων των 4 τελευταίων ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία.....	63
Εικόνα 23. Ανάλυση του ρεπερτορίου των TRBV γονιδίων ως προς την συχνότητα εμφάνισής τους ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία.....	65
Εικόνα 24. Ανάλυση του ρεπερτορίου των TRBJ γονιδίων ως προς την συχνότητα εμφάνισής τους ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία.....	66

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Παραδείγματα βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. ....	32
Πίνακας 2. Παρασκευή του μίγματος των διφωσφορικών νουκλεοτιδίων (Deoxy nucleotide Triphosphates, dNTP) .....	44
Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που προστίθενται για την ενίσχυση της αλληλουχίας της β αλυσίδας του TCR υποδοχέα.....	45
Πίνακας 4. Πρωτόκολλο PCR για την ενίσχυση του στόχου. ....	45
Πίνακας 5. Πρωτόκολλο μερικής πέψης των αμπλικονίων στον θερμικό κυκλοποιητή. ....	46
Πίνακας 6. Αντιδραστήρια που προστίθενται για τη σύνδεση των ανταπτών στα αμπλικόνια. ..	47
Πίνακας 7. Πρωτόκολλο σύνδεσης αμπλικονίων με τους αντάπτορες στον θερμικό κυκλοποιητή. ....	47
Πίνακας 8. Αντιδραστήρια που προστίθενται για την ενίσχυση των βιβλιοθηκών. ....	48
Πίνακας 9. Πρωτόκολλο PCR για την ενίσχυση των παρασκευασμένων βιβλιοθηκών. ....	49
Πίνακας 10. Μίγμα των αντιδραστηρίων για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. ....	51
Πίνακας 11. Αντιδραστήρια για την ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών. ....	51
Πίνακας 12. Πρωτόκολλο ποσοτικής PCR για την ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών.....	51
Πίνακας 13. Σύνοψη κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών της θεραπείας του συνόλου των ασθενών της μελέτης.....	53
Πίνακας 14. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά θεραπείας ανά ασθενή της μελέτης.....	54

## Συντομογραφίες

	<b>Αγγλική ορολογία</b>	<b>Ελληνική ορολογία</b>
5'RACE	Rapid Amplification of CDNA Ends	Ταχεία ενίσχυση cDNA άκρων
KKT	Head and Neck Cancer	Καρκίνος Κεφαλής και Τραχήλου
ADH	Alcohol Dehydrogenase	Αλκοολική αφυδρογονάση
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2	Αλδεϋδική αφυδρογονάση 2
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase	Κινάση αναπλαστικού λεμφώματος
APCs	Antigen Presenting Cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like	Ένζυμο επεξεργασίας του mRNA της απολιποπρωτεΐνης Β, που προσομοιάζει με καταλυτικό πολυπεπίδιο
aSMA	a-Smooth Muscle Actin	α-ακτίνη των λείων μυών
BCR	B-Cell Receptor	Υποδοχέας Β κυττάρου
BRAF	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1	Ομόλογο Β1 του ιικού ογκογονιδίου v-raf σαρκώματος ποντικού
CAFs	Cancer Associated Fibroblasts	Ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand	Προσδέτης χημειοκίνης (μοτίβο C-C)
CDRs	Complementarity Determining Regions	Περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας
CI	Confidence Interval	Διάστημα εμπιστοσύνης
CPS	Combined Positive Score	Συνδυασμένη θετική βαθμολογία
CRT	ChemoRadioTherapy	Χημειο/ακτινοθεραπεία
CSCs	Cancer Stem Cells	Καρκινικά βλαστικά κύτταρα
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4	Κυτταροτοξικό αντιγόνο των T-λεμφοκυττάρων
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1	Κυτόχρωμα P450 2E1
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphates	Διφωσφορικά νουκλεοτίδια
EBV	Epstein-Barr Virus	Ιός Epstein-Barr
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EML4	Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4	Πρωτεΐνη που προσομοιάζει με την σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους των εχινόδερμων 4
ER	Estrogen Receptor	Υποδοχέας οιστρογόνων
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2	Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
HPV	Human Papillomavirus	Ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων
IARC	International Agency for Research on Cancer	Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο
ICIs	Immune Checkpoint Inhibitors	Αναστολείς ανοσιακών σημείων ελέγχου
IFN $\gamma$	Interferon gamma	Ιντερφερόνη $\gamma$
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
KRAS	Kirsten Ras Sarcoma viral oncogene homolog	Ομόλογο του ιικού ογκογονιδίου Kirsten σαρκώματος αρουραίου

LSCC	Laryngeal Squamous Cell Carcinoma	Καρκίνος πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα
MGMT	O <sup>6</sup> -MethylGuanine-DNA MethylTransferase	DNA μεθυλοτρανσφεράση της O <sup>6</sup> -μεθυλογουανίνης
MHC	Major Histocompatibility Complex	Μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MMR	Mismatch Repair	Επιδιόρθωση σφαλμάτων του DNA
NGS	Next Generation Sequencing	Αλληλούχιση επόμενης γενιάς
NNK	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone	4-(μεθυλ-νιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη
NPC	Nasopharyngeal Cancer	Καρκίνος του ρινοφάρυγγα
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
OPSCC	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma	Καρκίνος πλακωδών κυττάρων του στοματοφάρυγγα
PBT	Particle Beam Therapy	Θεραπεία με δέσμη σωματιδίων
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PD-1	Programmed cell Death protein 1	Πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1
PD-L1	Programmed cell Death protein 1 Ligand	Προσδέτης πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha	Υποδοχέας A του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase	Κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
PR	Progesterone Receptor	Υποδοχέας προγεστερόνης
pRB	Retinoblastoma protein	Πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος
qPCR	quantitative PCR	Ποσοτική PCR
RET	REarranged during Transfection	Ανακαταμεμημένο κατά την επιμόλυνση
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
RSS	Recombination Signal Sequences	Αλληλουχίες σήματος ανασυνδυασμού
RT	Radiation Therapy	Ακτινοθεραπεία
SD	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση
TAAAs	Tumor Associated Antigens	Σχετιζόμενα με τον όγκο πεπτιδία
TCGA	The Cancer Genome Atlas	Ο άτλας του γονιδιώματος του καρκίνου
TCR	T-Cell Receptor	Υποδοχέας T κυττάρου
TCR Vβ	T-Cell Receptor Variable beta	Μεταβλητή περιοχή της αλυσίδας β του υποδοχέα TCR
TCRSeq	TCR Sequencing	Αλληλούχιση του TCR
TNF	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
TORS	Transoral Robotic Surgery	Διαστοματική ρομποτική χειρουργική επέμβαση
TRAF	TNF-Associated Factor	Παράγοντας που σχετίζεται με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων
TRBJ	TCR Beta J gene	J γονίδιο του TCR β
TRBV	TCR Beta V gene	V γονίδιο του TCR β
Tregs	T regulatory cells	T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα
TSCC	Tonsillar Squamous Cell Carcinoma	Καρκίνος πλακωδών κυττάρων των αμυγδαλών
UMI	Unique Molecular Identifiers	Μοναδικά μοριακά αναγνωριστικά

---

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
------	------------------------------------	---

---



## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την ανάλυση της μεταβλητής περιοχής της αλυσίδας β του υποδοχέα TCR (TCR Vβ) σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (ΚΚΤ) σε δύο χρονικά σημεία: κατά την διάγνωση της νόσου και μετά το τέλος της εκάστοτε θεραπείας (χειρουργείο ή ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή συνδυασμός), με στόχο τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στην κλωνικότητα και την ποικιλομορφία του TCR ρεπερτορίου που επάγονται από τη θεραπεία, καθώς και της πιθανής εμφάνισης νέων TCR Vβ κλωνότυπων. Αυτές οι μεταβολές του TCR ρεπερτορίου θα μπορούσαν να δρουν ως προβλεπτικός βιοδείκτης απόκρισης στη θεραπεία ασθενών με ΚΚΤ.

Αναλυτικότερα, στο πρώτο κεφάλαιο, αυτό της Εισαγωγής, παρατίθενται θεωρητικά στοιχεία σχετικά με τον ΚΚΤ, την εντόπιση, την συμπτωματολογία, την επιδημιολογία και τους βασικούς παράγοντες κινδύνου, με έμφαση στη σχέση του ΚΚΤ με τη μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων. Επίσης, αναπτύσσονται οι καθιερωμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται στην κλινική πράξη έναντι αυτού του τύπου καρκίνου. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) και το ρόλο του στην αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση. Τέλος, υπογραμμίζεται η ανάγκη εύρεσης ευαίσθητων βιοδεικτών στον ΚΚΤ και αναλύονται επιστημονικά δεδομένα σχετικά με την χρηστικότητα του TCR ως προγνωστικού και προβλεπτικού βιοδείκτη σε διάφορους τύπους καρκίνου και η πιθανή του χρήση στον ΚΚΤ.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, παρουσιάζονται αναλυτικά τα Υλικά και Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

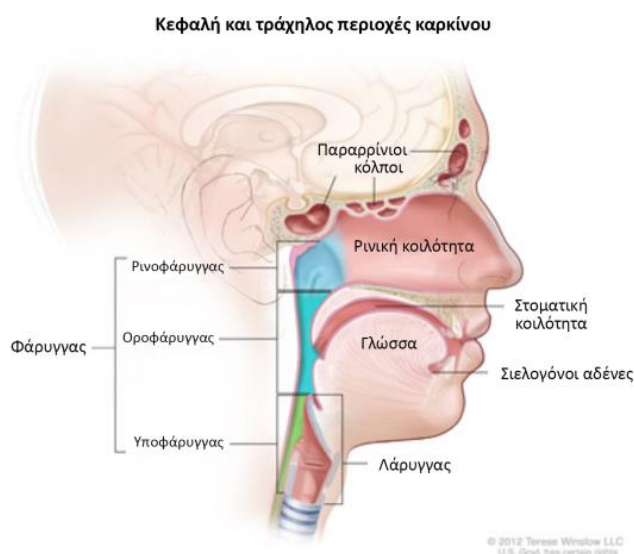
Στο τρίτο κεφάλαιο, παρατίθενται τα Αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του TCR ρεπερτορίου στα δείγματα αίματος ασθενών με ΚΚΤ που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, πριν και μετά την εκάστοτε θεραπεία.

Τέλος, στο τέταρτο κεφάλαιο αναλύονται και συζητούνται τα προκύπτοντα αποτελέσματα, στο πλαίσιο και άλλων δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών στο πεδίο. Υπογραμμίζονται τα σημαντικότερα ευρήματα της μελέτης, ενώ παράλληλα παρουσιάζονται και οι περιορισμοί. Συμπερασματικά, αναδεικνύεται η πιθανή χρήση του TCR ρεπερτορίου και των μεταβολών του, ως προβλεπτικού βιοδείκτη, για την επιλογή ασθενών με ΚΚΤ που είναι πιθανότερο να ωφεληθούν από τη θεραπεία.

## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

### 1.1 Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου

Ο όρος «καρκίνος κεφαλής και τραχήλου» (ΚΚΤ) περιγράφει κάθε τύπο νεοπλασματος που εμφανίζεται αρχικά κυρίως στα πλακώδη κύτταρα των βλεννογόνων επιφανειών του εσωτερικού της κεφαλής και της τραχηλικής περιοχής. Πάνω από το 90% των περιπτώσεων του ΚΚΤ είναι ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, που προκύπτουν από το πλακώδες επιθήλιο που επικαλύπτει τις κοιλότητες αυτές. Πιο ειδικά, ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου εστιάζεται στην στοματική κοιλότητα, η οποία απαρτίζεται από τα χείλη, τη γλώσσα, τα ούλα, τις παρειές, τη σκληρή και μαλακή υπερώα και την κάτω γνάθο, τη ρινική κοιλότητα και τους παραρρινικούς κόλπους. Επιπροσθέτως, παρουσιάζεται στον φάρυγγα όπου ανατομικά περιλαμβάνονται τα τμήματα του ρινοφάρυγγα, του στοματοφάρυγγα και του υποφάρυγγα, καθώς και στην περιοχή του λάρυγγα και των σιελογόνων αδένων (**Εικόνα 1**) (1).



**Εικόνα 1. Οι ανατομικές περιοχές ανάπτυξης καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (2).**

#### 1.1.1 Συμπτωματολογία

Στον ΚΚΤ τα συμπτώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερη ποικιλομορφία και αυτό εξαρτάται από το στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται η διάγνωση, καθώς και από την περιοχή του πρωτοπαθούς όγκου. Στις περισσότερες περιπτώσεις η εντόπιση και η διάγνωση του όγκου γίνονται σε προχωρημένο στάδιο, με τους ασθενείς να υποφέρουν από έντονα συμπτώματα.

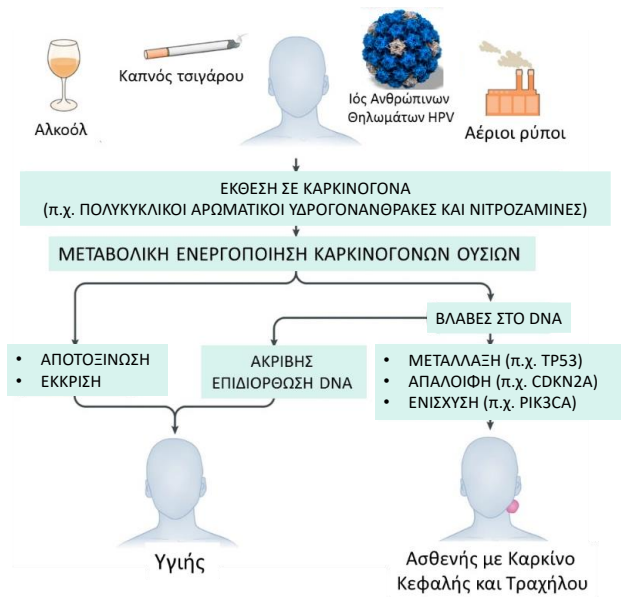
Στον καρκίνο του στοματοφάρυγγα (Oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC) κυριαρχεί το πλακώδες καρκίνωμα σε ποσοστό 90% και η εντόπισή του συνήθως γίνεται όταν ο όγκος έχει μεγαλώσει αρκετά σε μέγεθος, με έντονα τα συμπτώματα του πόνου και του καύσου, ακόμη και δυσκολία στην κατάποση και δύσπνοια (3). Η συχνότητα μετάστασης του καρκίνου του στοματοφάρυγγα στους λεμφαδένες φτάνει το 50%, λόγω της πλούσιας λεμφικής παροχέτευσης που χαρακτηρίζει αυτήν την περιοχή. Η λεμφαδενική μετάσταση, σε αρκετές περιπτώσεις, είναι το πρώτο στάδιο εντόπισης του όγκου. Ο καρκίνος της μαλθακής υπερώας εντοπίζεται πιο εύκολα κατά την κλινική εξέταση, σε αντίθεση με άλλα είδη καρκίνου του στοματοφάρυγγα, και αποτελεί περίπου το 2% όλων των ΚΚΤ (3). Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτού του καρκίνου, που τον καθιστά και ευκολότερα ανιχνεύσιμο, είναι η εικόνα της λευκοπλακίας ή και ερυθροπλακίας στην εντοπισμένη βλάβη. Η νόσος μπορεί εν συνεχεία να επεκταθεί στους γύρω ιστούς της σκληρής υπερώας, των αμυγδαλών και των καμάρων των αμυγδαλών. Ο καρκίνος πλακωδών κυττάρων των αμυγδαλών (Tonsillar Squamous Cell Carcinoma, TSCC), στα πρώτα στάδια ανάπτυξης δεν εμφανίζει συμπτώματα, ενώ κατά την εξέλιξη της νόσου τα συμπτώματα που εκδηλώνονται, όπως δυσφαγία, οδυνοφαγία, ωταλγία ή τραχηλική διόγκωση, δεν συνδέονται άμεσα με τη διάγνωση της νόσου. Τέλος, στους καρκίνους του στοματοφάρυγγα ανήκει και ο καρκίνος της γλώσσας, ο οποίος εμφανίζει μικρότερη συχνότητα εμφάνισης σε σχέση με άλλους ΚΚΤ αλλά μεγαλύτερη επιθετικότητα. Τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα που θα παρακινήσουν τον ασθενή σε περαιτέρω διερεύνηση είναι η ωταλγία και η οδυνοφαγία. Ωστόσο, η ανατομική θέση της γλώσσας, ιδιαίτερα το οπίσθιο πλάγιο τμήμα της, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην εντόπιση του όγκου και ως εκ τούτου, σε αυτές τις περιπτώσεις η νόσος διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο (3).

Στον καρκίνο του ρινοφάρυγγα (Nasopharyngeal Cancer, NPC), το 80% των ασθενών πάσχουν από ρινικά συμπτώματα τα οποία διαφέρουν σε ένταση ανάλογα με την έκταση του όγκου, όπως ρινική απόφραξη, αλλαγή στη φωνή και κακοσμία. Ωστόσο, συνήθη στον καρκίνο του ρινοφάρυγγα είναι και τα ωτολογικά συμπτώματα, που εμφανίζονται λόγω της αυξημένης μάζας που φράζει τον αερισμό της ευσταχιανής σάλπιγγας, όπως βαρηκοΐα, εκκριτική ωτίτιδα και εμβοές (4). Η κλινική εικόνα του καρκίνου του υποφάρυγγα έχει αρκετές ομοιότητες με εκείνη του καρκίνου του στοματοφάρυγγα. Μεταξύ των συμπτωμάτων που εμφανίζονται στους ασθενείς είναι

η δυσφαγία, η οδυνοφαγία, η ωταλγία, η βραχνάδα στη φωνή και η τραχηλική διόγκωση. Ο καρκίνος των πλακωδών κυττάρων είναι ο συνηθέστερος ιστολογικός τύπος καρκίνου του λάρυγγα (Laryngeal Squamous Cell Carcinoma, LSCC), όπου και σε αυτή την περίπτωση τα συμπτώματα εμφανίζονται καθυστερημένα και σε αυτές τις περιπτώσεις τα πρώτα σημάδια γίνονται αντιληπτά όταν έχει ήδη προχωρήσει σε τραχηλικές λεμφαδενικές μεταστάσεις, με κύριο σύμπτωμα τους διογκωμένους λεμφαδένες του τραχήλου. Επιπλέον, έχουν καταγραφεί ως βασικά συμπτώματα και η δύσπνοια, η οδυνοφαγία, η βραχνάδα της φωνής και η δυσκαταποσία, ακόμη και ωταλγία και αιμόπτυση (4).

### 1.1.2 Παράγοντες κινδύνου

Ο ΚΚΤ εντάσσεται στους πιο επιθετικούς καρκίνους και καταλαμβάνει την έβδομη θέση συχνότητας εμφάνισης παγκοσμίως, με περισσότερες από 660.000 νέες περιπτώσεις και 325.000 θανάτους για το 2020 (5,6). Μελέτες έχουν δείξει πως οι κυριότεροι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΚΤ είναι η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα- καθώς το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα είναι το πρώτο που έρχεται σε άμεση επαφή με αυτές τις βλαβερές ουσίες- και ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV) (**Εικόνα 2**). Ο συνδυασμός αλκοόλ και τσιγάρου αυξάνει την διαπερατότητα των κυττάρων του βλεννογόνου της στομαστικής κοιλότητας, επιτρέποντας στις καρκινογόνες ουσίες του καπνού να εισχωρούν με μεγαλύτερη ευκολία, για αυτό και οι δύο παραπάνω παράγοντες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και ως «συνεργοί» στην ανάπτυξη του καρκίνου (7).



**Εικόνα 2. Η επίδραση των καρκινογόνων παραγόντων στην εμφάνιση καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (αναπροσαρμογή από (6)).**

#### 1.1.2.1 Κάπνισμα

Υπολογίζεται ότι έως και 80% των ασθενών με ΚΚΤ είναι χρόνιοι καπνιστές (8). Η συστηματική χρήση καπνού αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου έως και πέντε φορές στην στοματική κοιλότητα και έως και δέκα φορές στον στοματοφάρυγγα και τον υποφάρυγγα, σε σχέση με τους μη καπνίζοντες. Ωστόσο, η επίδραση των καρκινογόνων ουσιών του καπνού του τσιγάρου φαίνεται πως είναι δόσοεξαρτώμενη, καθώς ο κίνδυνος εμφάνισης κακοήθειας συνδέεται στενά με την διάρκεια, την ένταση και την συχνότητα του καπνίσματος (9).

Η συνεχής έκθεση των κυττάρων της αναπνευστικής οδού στην πληθώρα καρκινογόνων ουσιών που εμπεριέχονται στον καπνό του τσιγάρου μπορεί να επάγει χρωμοσωμική αστάθεια και μη φυσιολογική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (10,11). Μία από τις χημικές ουσίες που εμπεριέχονται στον καπνό είναι η 4-(μεθυλ-νιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK), η οποία είναι η πιο ισχυρή καρκινογόνος ουσία από την οικογένεια των N-νιτροζαμινών και έχει συσχετισθεί και με άλλους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα (12). Η NNK φαίνεται πως σχετίζεται άμεσα με ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την έκφραση των miR-21, miR-155 και miR-422a, τα οποία έχουν ρυθμιστική δράση στον μηχανισμό επιδιόρθωσης σφαλμάτων του DNA (Mismatch

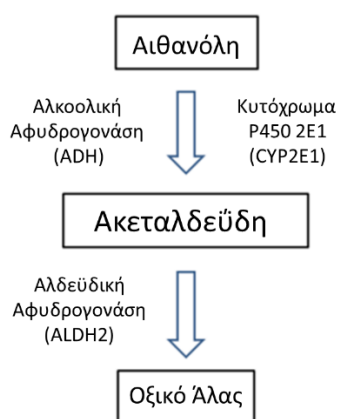
Repair, MMR) προκαλώντας τελικά ελαττωμένη έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *MSH2* και *MLH1* και αύξηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων (13). Τα ογκογόνα miR-21 και miR-155 έχουν συνδεθεί με διάφορους τύπους καρκίνου του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και ειδικά το miR-21 έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης κακής πρόγνωσης τόσο στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου όσο και στον καρκίνο του πνεύμονα (14). Επομένως, έχει προταθεί ότι τα miR-21, miR-155 και miR-422a θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες στον ΚΚΤ.

Επίσης, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2019, βρέθηκε ότι το μονοπάτι σηματοδότησης του ασβεστίου είναι απορυθμισμένο σε καπνίζοντες ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου και το γεγονός αυτό συνδέθηκε με την έκθεση αυτών των ασθενών στον καπνό του τσιγάρου (15). Ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, επηρεάζοντας ακολούθως σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου, και επάγοντας την καρκινική ανάπτυξη, εξέλιξη και μετάσταση (16,17). Ως εκ τούτου, η στόχευση του μονοπατιού σηματοδότησης του ασβεστίου, σε καρκίνους που σχετίζονται με το κάπνισμα, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου, πιθανότατα θα συνέβαλε στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπειών (18).

#### 1.1.2.2 Κατανάλωση αλκοόλ

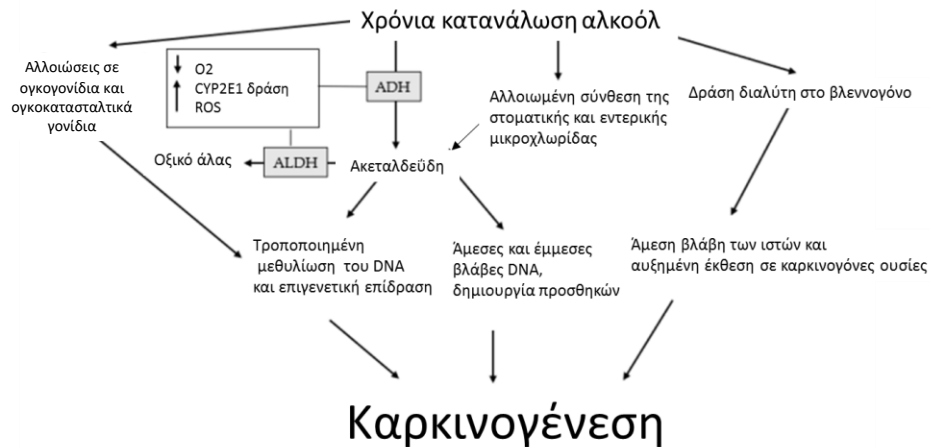
Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ συμβάλλει στην ανάπτυξη όγκων στην ευρύτερη ανατομική περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου, με τα περισσότερα περιστατικά να εστιάζονται στον στοματοφάρυγγα και τον υποφάρυγγα σε σχέση με άλλες περιοχές. Συνολικά, το ποσοστό των περιπτώσεων ΚΚΤ που οφείλονται αποκλειστικά στην κατάχρηση αλκοόλ υπολογίζεται κοντά στο 4% (9). Η συστηματική κατανάλωση αλκοόλ ενισχύει την έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων σε καρκινογόνες ουσίες, και όπως αναφέρθηκε παραπάνω και για τον καπνό του τσιγάρου, ο κίνδυνος ανάπτυξης όγκου σχετίζεται με τη διάρκεια και την ένταση της κατανάλωσης αλκοόλ (19). Διάφοροι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, όπως το οξειδωτικό στρες, οι επιγενετικές τροποποιήσεις και οι βλάβες στο DNA, έχουν συσχετιστεί με την χρόνια κατανάλωση αλκοόλ (20).

Για πρώτη φορά το 1988, ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC) ενοχοποίησε την κατανάλωση αλκοόλ ως βασικό αιτιολογικό παράγοντα για τους καρκίνους που εστιάζονται στη στοματική κοιλότητα, στον υποφάρυγγα, στον στοματοφάρυγγα και στον λάρυγγα (21). Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποιο σαφές σηματοδοτικό μονοπάτι που να σχετίζεται με την επίδραση του αλκοόλ στις νεοπλασματικές νόσους. Ωστόσο, το 2012 ο IARC κατέταξε την αιθανόλη και τον κύριο μεταβολίτη της, την ακεταλδεΐδη, ως καρκινογόνες ουσίες (22). Η αλκοόλη οξειδώνεται από την αλκοολική αφυδρογονάση (Alcohol Dehydrogenase, ADH), το κυτόχρωμα P-450 2E1 (Cytochrome P450 2E1, CYP2E1) και την καταλάση για να σχηματίσει την ακεταλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται από την αλδεϋδική αφυδρογονάση 2 (Aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) για να παράγει οξικό άλας (**Εικόνα 3**).



**Εικόνα 3.** Η διαδικασία μεταβολισμού της αλκοόλης από αιθανόλη σε οξικό άλας (23).

Η τοξικότητα του αλκοόλ οφείλεται τόσο στην αιθανόλη όσο και στα παράγωγά της, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς μέσω του οποίου η αιθανόλη μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ROS είναι μέσω της επαγωγής της έκφρασης του *CYP2E1*. Οι ROS έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική κατάσταση προκαλώντας την αύξηση του οξειδωτικού στρες και τον θάνατο των νευρικών κυττάρων λόγω της οξείδωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων και λόγω μεταβολών στο DNA που δεν επιδέχονται επιδιόρθωση (24,25). Αυτές οι αλλοιώσεις στο DNA μπορούν να οδηγήσουν σε γενετικές μεταλλάξεις και σε κυτταρική αθανασία, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκίνου (26) (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Οι βασικές επιδράσεις του αλκοόλ που επάγουν την καρκινογένεση (20).

Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες έχουν εστιάσει στον ρόλο της στοματικής μικροβιακής χλωρίδας στην παθογένεση των διαφόρων τύπων ΚΚΤ. Συγκεκριμένα, έρευνα που έγινε στις ΗΠΑ σχετικά με την τροποποίηση της σύνθεσης του μικροβιακού πληθυσμού στα αρχικά στάδια εμφάνισης του όγκου σε ασθενείς με χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, έδειξε αλλοίωση της μικροβιακής σύστασης και ειδικότερα, σημαντική μείωση της ποσότητας των γαλακτοβάκιλλων, οι οποίοι ασκούν φυσιολογικά ευεργετική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση (27). Επιπλέον, υπολογίζεται πως το 7-15% των περιστατικών καρκίνου του στόματος συνδέονται άμεσα με την αλλοίωση του στοματικού μικροβιώματος (28). Τόσο στις υγιείς όσο και στις κακοήθεις περιοχές του πολύμορφου περιβάλλοντος του στόματος του ανθρώπου εντοπίζεται μεγάλη ποικιλία μικροβιακών πληθυσμών, με αρκετά είδη βακτηρίων και μυκήτων να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του στόματος. Τα τρία βασικά είδη βακτηρίων που έχουν ενοχοποιηθεί είναι τα *Campylobacter jejuni*, *Prevotella melaninogenica* και *Streptococcus mitis*, ενώ όσον αφορά τους μύκητες, τα γένη *Rhodotorula*, *Geotrichum* και *Pneumocystis*, καθώς και τα Μικροσπορίδια *Phialophora* και *Cladophialophora* έχουν συσχετισθεί με τον καρκίνο του στόματος (29,30). Έχει αποδειχθεί ότι αρκετά στοματικά μικρόβια παράγουν μεγάλες ποσότητες ακεταλδεΐδης, η οποία με τη σειρά της επάγει την μεταλλαξογένεση και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στοματικού επιθηλίου (31). Ειδικότερα, ο *Streptococcus mitis* έχει ταυτοποιηθεί ως αιτιολογικός παράγοντας σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου του στόματος εξαιτίας της ικανότητάς του να παράγει μεγάλες ποσότητες ακεταλδεΐδης και της ισχυρής δράσης της αλκοολικής αφυδρογονάσης που διαθέτει (32).



Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η δράση των μυκήτων *Candida albicans* και *Enterococcus Faecalis*, οι οποίοι έχουν εντοπιστεί στη μικροχλωρίδα του στόματος και συνδέονται άμεσα με τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, καθώς έχει βρεθεί ότι οδηγούν στην ανώμαλη ενεργοποίηση της σηματοδότησης του μονοπατιού του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) (33,34). Ειδικότερα, ο *Enterococcus Faecalis* παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο οδηγεί στην καρκινογένεση, μέσω της επαγωγής βλαβών στο DNA, της χρωμοσωμικής αστάθειας και της μεταλλαξογένεσης (34).

### 1.1.3 Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων – HPV

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), είναι ένας ιός μικρού μεγέθους, χωρίς έλυτρο, που ανήκει στην οικογένεια των *Papillomaviridae* και το γενετικό του υλικό είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους περίπου 8.000 κιλοβάσεων (35). Αυτό που χαρακτηρίζει τους ιούς των θηλωμάτων είναι η υψηλή εξειδίκευση σχετικά με τα είδη που προσβάλλουν. Για παράδειγμα, ο HPV μολύνει αποκλειστικά τον άνθρωπο· εισβάλλει στον οργανισμό μέσω τραύματος ή ασυνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων και προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου των γεννητικών οργάνων και της στοματικής κοιλότητας, καθώς και τα επιδερμικά κύτταρα των συγκεκριμένων ανατομικών περιοχών (36).

Η κύρια οδός μετάδοσης του HPV είναι μέσω της σεξουαλικής επαφής και το ικό γονιδίωμα μπορεί να εντοπίζεται στον οργανισμό του ξενιστή ως επίσωμα για πολλά χρόνια μετά την αρχική λοίμωξη (37). Ωστόσο, καθοριστικές αλλαγές στην εξέλιξη της λοίμωξης φαίνεται να συμβαίνουν σε περιπτώσεις όπου το ικό γονιδίωμα ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή. Κατά αυτόν τον τρόπο, ο ιός μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου-ξενιστή, οδηγώντας στη δημιουργία όγκου (38).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο HPV έχει συσχετιστεί με τον ΚΚΤ, με τα ποσοστά θετικότητας του HPV θετικού καρκινώματος να έχουν αυξηθεί κατά 225% από το 1984 έως και το 2004, ξεπερνώντας την συχνότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που οφείλεται στον HPV5 (39). Αυτή η αξιοσημείωτη αύξηση μέσα στις δεκαετίες θεωρείται αποτέλεσμα αλλαγών στην σεξουαλική συμπεριφορά (40). Στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου ο HPV16 είναι ο πιο συχνός τύπος που ενοχοποιείται, με την συχνότητα εμφάνισης να πλησιάζει το 90% των περιπτώσεων και ακολουθεί ο

HPV18 (41). Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε φάνηκε πως τα περισσότερα περιστατικά ΚΚΤ που σχετίζονται με τη λοίμωξη από HPV εστιάζονται στον στοματοφάρυγγα, σε ποσοστό 22% και στα πλακώδη κύτταρα των αμυγδαλών, σε ποσοστό 47% (42). Κλινικά ευρήματα συχνά χαρακτηρίζουν τους HPV θετικούς ασθενείς με μικρούς σε μέγεθος όγκους αλλά με προχωρημένη μετάσταση, ωστόσο αποδεικνύεται πως έχουν καλή πρόγνωση, με χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου κατά 28% και με 49% μειωμένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που είναι HPV αρνητικοί (39). Στην ίδια έρευνα, τα περιστατικά ΚΚΤ που αποδίδονται στον HPV εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών που εξετάστηκαν, με τα ποσοστά να εμφανίζονται αυξημένα στη Νότια Αμερική και στην Ανατολική και Βόρεια Ευρώπη, ενώ το μικρότερο ποσοστό εντοπίστηκε στην Νότια Ευρώπη (43).

#### 1.1.3.1 Το γονιδιωματικό προφίλ σε HPV θετικούς όγκους κεφαλής και τραχήλου

Σε κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, η θετικότητα του HPV σε όγκους κεφαλής και τραχήλου έχει συσχετισθεί με θετική έκβαση της νόσου σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (44). Η έκφραση των ικόν πρωτεϊνών λειτουργεί σαν έναυσμα για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, με σημαντική αύξηση των CD8+ που παράγουν ιντερφερόνη γ (Interferon γ, IFNγ), των CD4+ (ειδικά των Th1) κυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων και των μακροφάγων. Επιπλέον, αξιοσημείωτη αύξηση εμφανίζεται στην παραγωγή χημειοκινών (CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL17, CCL21) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-2, IL-17, IL-23) (45). Εντυπωσιακά ήταν τα ευρήματα αναλύσεων δεδομένων που είναι καταχωρημένα στον άτλαντα του γονιδιώματος του καρκίνου (The Cancer Genome Atlas, TCGA), που διεξήχθησαν σε 280 ασθενείς με ΚΚΤ, και έδειξαν πως οι HPV+ όγκοι εμφανίζουν υψηλότερη ανοσογονικότητα με μεγαλύτερη ικανότητα διήθησης από τα ενεργοποιημένα CD8+ T κύτταρα. Επιπροσθέτως, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί αλλαγή στην έκφραση της πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 (Programmed cell Death protein 1, PD-1) και του προσδέτη της (Programmed cell Death protein 1 Ligand, PD-L1) αναφορικά με την κατάσταση του HPV, οι HPV+ όγκοι επιδεικνύουν μεγαλύτερη έκφραση του κυτταροτοξικού αντιγόνου των T-λεμφοκυττάρων (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4, CTLA-4) και μεγαλύτερη διήθηση T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (T regulatory cells, Tregs) σε σχέση με τους

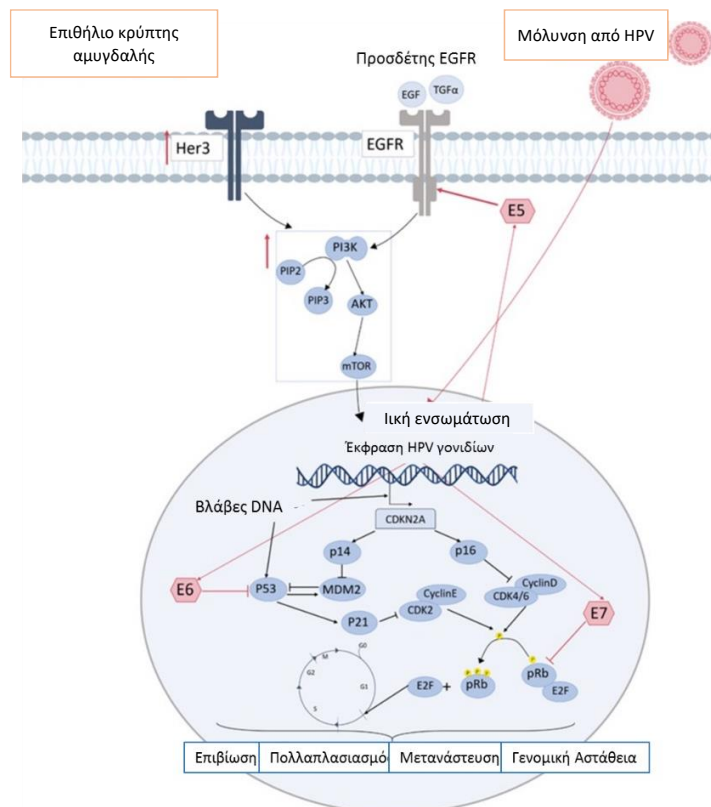
HPV- όγκους, υποδεικνύοντας ότι η θετικότητα του HPV ευνοεί την ανταπόκριση των ασθενών σε στοχευμένες αντικαρκινικές θεραπείες (46).

Σε γενετικό επίπεδο, οι αλλοιώσεις που επάγονται στον ΚΚΤ από τον HPV είναι αποτέλεσμα αδρανοποίησης των ογκοκαταστολέων p53 και pRB από τις ιικές πρωτεΐνες E6 και E7, αντίστοιχα (**Εικόνα 5**). Ειδικότερα, η ιική ογκοπρωτεΐνη E6 λειτουργεί δεσμεύοντας και αποδομώντας την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, ενώ η E7 δεσμεύει και αποδομεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma protein, pRB), επιτρέποντας την αντιγραφή του γενετικού υλικού του ιού (47). Τέλος, η πρωτεΐνη E5 παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν στην καρκινογένεση, όπως η υπερέκφραση του EGFR (48).

Με βάση τα τελευταία γονιδιωματικά δεδομένα, μεταλλάξεις στην κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol 3- Kinase, *PI3K*) εμφανίζονται στο 30% των περιπτώσεων ΚΚΤ, όπως και στα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας, με διαφορές μεταξύ των HPV+ και HPV- ασθενών (49). Η οδός σηματοδότησης της PI3K επηρεάζει τις διαδικασίες μεταγραφής και μετάφρασης ποικίλων στόχων που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό, στην επιβίωση και στην κινητικότητα των κυττάρων. Στους HPV+ όγκους, οι μεταλλάξεις του γονιδίου εστιάζονται στην περιοχή έλικας, σε αντίθεση με τους HPV- που οι μεταλλάξεις παρατηρούνται σε όλο το μήκος του γονιδίου (50). Αυτή η διαφορά θεωρείται πως έχει σημαντικό αντίκτυπο στην κλινική εξέλιξη και ακόμη μπορεί να έχει προγνωστική αξία (51). Επιπρόσθετα, το ένζυμο επεξεργασίας του mRNA της απολιποπρωτεΐνης B, που προσομοιάζει με καταλυτικό πολυπεπτίδιο (Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like, APOBEC) παίζει καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία ενός ξεχωριστού συνόλου μεταλλάξεων που ενισχύουν την καρκινογένεση σε HPV+ ασθενείς (52). Ειδικότερα, το ένζυμο APOBEC3 παρουσιάζει έντονη δράση σε όγκους ασθενών που έχουν προσβληθεί από τον HPV16 και προάγει τις μεταλλάξεις ενεργοποίησης της PI3K (53).

Με βάση τα τρέχοντα δεδομένα από την TCGA αποδεικνύεται πως ποικίλες γενετικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας του παράγοντα που σχετίζεται με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor (TNF)-Associated Factor, *TRAF*), ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου που συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση έναντι των ιών, καθώς και της δυσλειτουργίας γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (54). Σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζουν τα

μεταβαλλόμενα γονίδια μεταξύ των HPV+ και HPV- όγκων, παρόλα αυτά οι μεταλλάξεις των γονιδίων *p53*, *p16INK4A* και *pRB*, που προκαλούνται από τις E6 και E7, παρουσιάζουν ομοιότητα μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών/ όγκων (55). Μία άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη επιχείρησε να κατατάξει τους όγκους κεφαλής και τραχήλου με βάση την HPV διάγνωση σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53* και *CDKN2A*. Η κυκλίνη D1, καθώς και η δράση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, καταστέλλονται από το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16 (*CDKN2A*), έτσι ώστε να ελέγχεται ο κυτταρικός κύκλος, ενώ μεταλλάξεις στο *CDKN2A* προκαλούν υπερέκφραση της κυκλίνης D1, η οποία έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση στους ασθενείς με ΚΚΤ. Τα ευρήματα της παραπάνω μελέτης έδειξαν πως τα γονίδια που συμμετέχουν στην διαδικασία επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (MMR) υπερεκφράζονται σε HPV+ ασθενείς με ΚΚΤ, ένα μονοπάτι που επάγει αυξημένη κυτταροτοξικότητα κατά την ακτινο/χημειοθεραπεία, γεγονός που μπορεί να δηλώνει αυξημένη απόκριση αυτών των ασθενών στις παραπάνω θεραπείες (56,57).

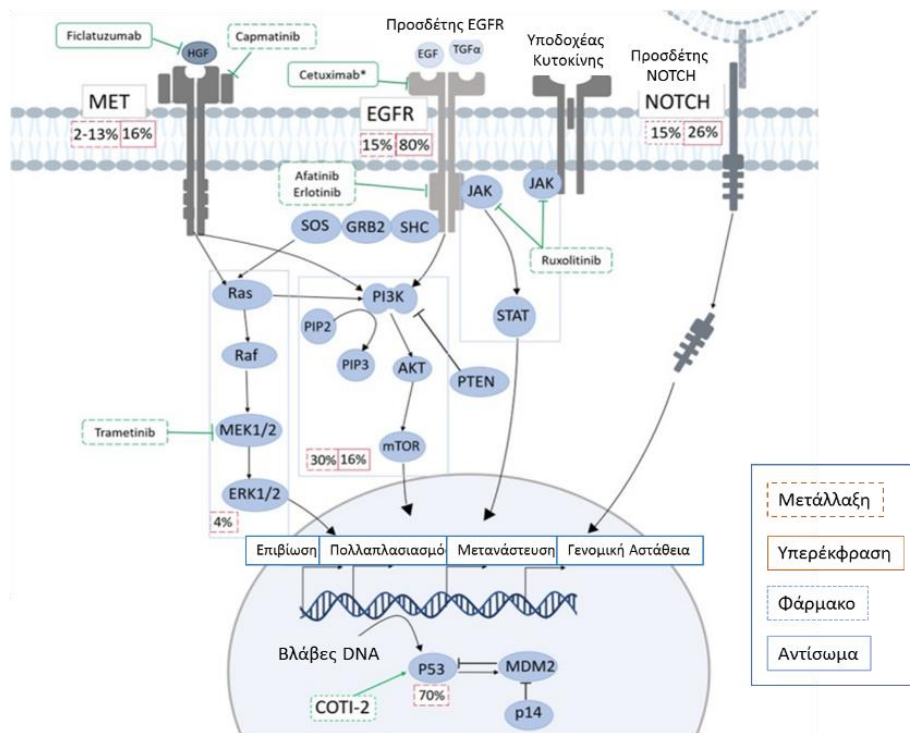


**Εικόνα 5. Ανώμαλη ενδοκυττάρια σηματοδότηση σε HPV+ όγκο (42).** Όγκος εστιασμένος στο επιθήλιο των αμυγδαλών του στοματοφάρυγγα. Το ιικό DNA μετά από την είσοδο του HPV είτε ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, είτε παραμένει εντός του κυττάρου ως επίσωμα. Η κύρια απορρύθμιση που επάγει την καρκινογένεση σε HPV-θετικούς ασθενείς

προέρχεται από την αναστολή της p53 από την ιική πρωτεΐνη E6 και της pRb από την E7. Αυτό οδηγεί στην είσοδο στον κυτταρικό κύκλο μέσω της απελευθέρωσης της E2F και στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από την p53. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της p16, η οποία στη συνέχεια δρα ως δείκτης της λοίμωξης από HPV στον ΚΚΤ. Αν και προηγουμένως θεωρούνταν δευτερεύων παίκτης, η E5 έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί τον EGFR, επάγοντας περαιτέρω το ογκογόνο δυναμικό. Μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης που φαίνεται ότι ενεργοποιούνται στον HPV+ ΚΚΤ, η οδός PI3K έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σημαντικά. ΚΚΤ: καρκίνος κεφαλής και τραχήλου; HPV: ιός ανθρώπινων θηλωμάτων.

#### 1.1.3.2 Το γονιδιωματικό προφίλ σε HPV αρνητικούς όγκους κεφαλής και τραχήλου

Η πλειοψηφία των περιστατικών που σχετίζονται με HPV αρνητικούς όγκους εμφανίζουν πολυάριθμες γονιδιακές μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλοιώσεις που συνάδουν με υψηλότερο κίνδυνο μεταστάσεων και δυσμενή κλινικά αποτελέσματα (26,55,58). Οι βασικές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν τους HPV- όγκους είναι οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης TP53, με κυρίαρχη την απώλεια των χρωμοσωμικών τμημάτων 3p και 17p, και οι μεταλλάξεις του γονιδίου *CDKN2A* λόγω απώλειας της χρωμοσωμικής περιοχής 9p. Επίσης, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *HRAS*, που οδηγούν σε μη φυσιολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών και στο γονίδιο *CASP8*, που οδηγούν στην καταστολή του κυτταρικού θανάτου (59). Επιπρόσθετα, σε HPV- όγκους παρατηρείται ενίσχυση των γονιδίων *EGFR*, *ERBB2* και *FGF1* (Εικόνα 6), που ενεργοποιούν το μονοπάτι RTK και μεταλλάξεις αδρανοποίησης των γονιδίων *FAT1* και *AJUBA* που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT. Τέλος, χαρακτηριστικές είναι οι μεταλλάξεις των γονιδίων *TP63*, *NOTCH1*, και *RIPK4*, οι οποίες διαφοροποιούν το επιθήλιο των πλακωδών κυττάρων, και των *NFE2L2* και *KEAP1*, που συμβάλλουν στο οξειδωτικό στρες (59). Εν κατακλείδι, πολλές διαφορετικές αλλαγές χαρακτηρίζουν το γονιδιακό τοπίο έκφρασης των HPV αρνητικών όγκων κεφαλής και τραχήλου, με τα στατιστικά των αναλύσεων να παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα υποτροπής, υψηλό κίνδυνο μετάστασης και μειωμένη ανταπόκριση σε συμβατικές και νεότερες θεραπείες (26,55,58).



**Εικόνα 6. Γενετικές αλλοιώσεις σε HPV- όγκο (42).** Αλλοιώσεις σε EGFR, MET και NOTCH ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την κυτταρική επιβίωση μέσα από τα μονοπάτια σηματοδότησης RAS/RAF/ERK, PI3K και JAK/STAT.

#### 1.1.4 Το μικροπεριβάλλον του όγκου στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

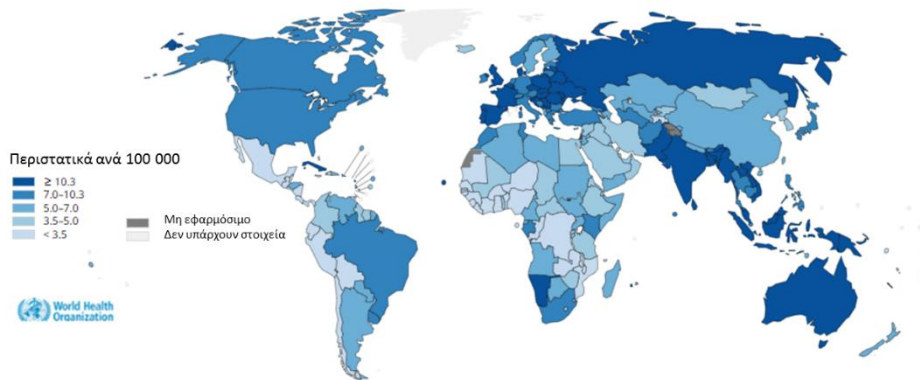
Το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι ένα αρκετά σύνθετο σύνολο καρκινικών και μη κυττάρων, το οποίο αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer Associated Fibroblasts, CAFs) και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Χαρακτηριστική είναι η παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα και τους CAFs, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), οι οποίοι διεγείρουν την αγγειογένεση και την τροφοδότηση του όγκου με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν και παράγοντες που βοηθούν στην επιβίωση και συντήρηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cells, CSCs) (60). Η διαφορά των CAFs από τους ινοβλάστες εντοπίζεται στην αδιάκοπη ενεργοποίηση της έκφρασης της  $\alpha$ -ακτίνης των λείων μυών ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin,  $\alpha$ SMA) (61). Στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, τα αυξημένα επίπεδα  $\alpha$ SMA σχετίζονται με κακή πρόγνωση της νόσου. Επιπλέον, τα CAFs αποτελούν κύρια πηγή μεταλλοπρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, στην αγγειογένεση και στην ενεργοποίηση ανοσοκατασταλτικών κυττάρων, και επιπλέον

παράγουν μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων (όπως EGF, VEGF), κυτταροκινών (όπως IL-6) και χημειοκινών που προάγουν αυτές τις διαδικασίες (59,62). Τέλος, το μικροπεριβάλλον του όγκου νευρώνεται από νευρώνες του περιφερικού νευρικού συστήματος, αλλά και από νεοσυντιθέμενους αδρενεργικούς νευρώνες, η παρουσία των οποίων αποτελεί ερέθισμα για την καρκινική ανάπτυξη (63).

#### 1.1.5 Επιδημιολογικά δεδομένα για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου κατατάσσεται στην έβδομη θέση συχνότητας παγκοσμίως (5,6). Το 2020 ο συνολικός αριθμός νέων περιστατικών παγκοσμίως έφτασε κοντά στα 380.000 και αυξημένος επιπολασμός καταγράφηκε σε περιοχές της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Αυστραλίας (**Εικόνα 7**), με βασικό αιτιολογικό παράγοντα την κατανάλωση καρκινογόνων ουσιών, ενώ τα πολυάριθμα περιστατικά στοματοφαρυγγικής λοίμωξης από HPV ενισχύουν τα ποσοστά καρκίνου κεφαλής και τραχήλου στις ΗΠΑ και τη Δυτική Ευρώπη (6). Τα περιστατικά HPV+ στοματοφαρυγγικού καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής έχουν εμφανίσει σημαντική αύξηση μέσα στις δεκαετίες. Στην δεκαετία του 1980 το ποσοστό των κρουσμάτων έφτανε το 16,3%, ενώ στη δεκαετία του 2000 αυξήθηκε σε περισσότερο από 72,7%. Θεωρείται πως αυτή η αύξηση οφείλεται και στην αναγνώριση της συσχέτισης του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου με τον HPV και στην ενίσχυση της διαγνωστικής διερεύνησης του HPV (64). Συνολικά, το 2019 στις ΗΠΑ διαπιστώθηκαν 53.000 νέα περιστατικά καρκίνου κεφαλής και τραχήλου και καταγράφηκαν 10.860 σχετικοί θάνατοι (65). Με βάση τα αποτελέσματα πολλών στατιστικών αναλύσεων που έχουν διεξαχθεί, προκύπτει πως οι άνδρες εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα προσβολής από αυτόν τον τύπο καρκίνου, κατά 2-4 φορές σε σύγκριση με τις γυναίκες. Στην πλειοψηφία, τα άτομα που διαγνώστηκαν με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου και σχετίζονταν με τους βασικούς παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα και αλκοόλ) είχαν μέση ηλικία τα 66 έτη, ενώ η μέση ηλικία των HPV+ ασθενών ήταν τα 53 έτη (64).

## Εκτίμηση ποσοστών νόσησης Παγκοσμίως το 2020 από καρκίνο Κεφαλής και Τραχήλου



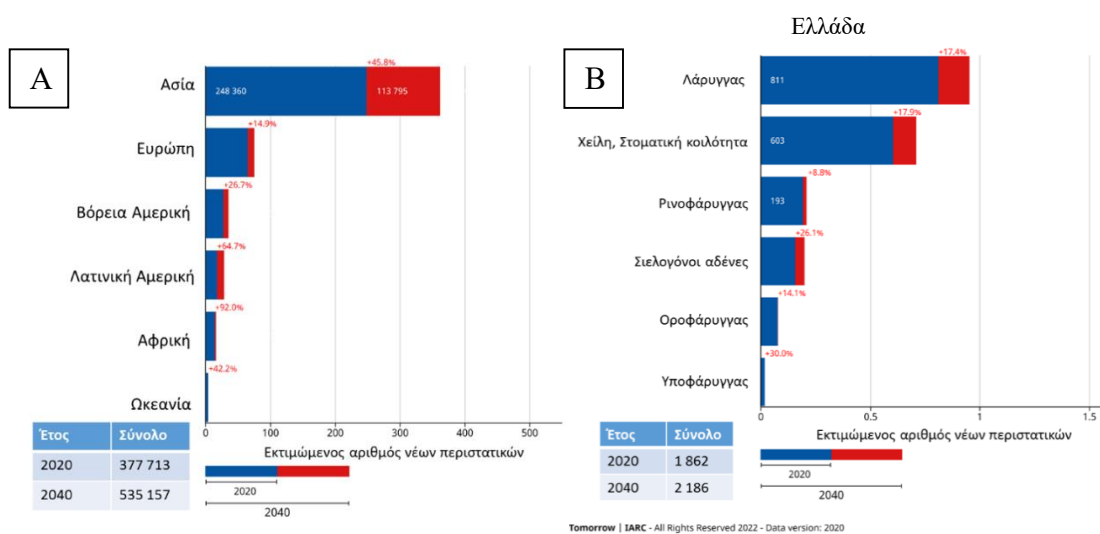
**Εικόνα 7. Κατανομή των περιστατικών κεφαλής και τραχήλου παγκοσμίως για το 2020 (66).** Με την πιο σκούρα απόχρωση επισημαίνονται οι γεωγραφικές περιοχές που εμφανίζουν υψηλότερο αριθμό νέων περιστατικών καρκίνου, ενώ όσο μειώνεται ο τόνος της απόχρωσης ανά τις περιοχές, τόσο μικρότερα είναι τα ποσοστά συχνότητας εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου.

Δυστυχώς, ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με ΚΚΤ διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (στάδιο III και στάδιο IV). Μόνο το 29% των περιστατικών υπολογίζεται πως διαγιγνώσκονται με εστιασμένη νόσο, το 47% έχει τοπική νόσο, ενώ το 20% διαγιγνώσκεται με απομακρυσμένες μεταστάσεις (67). Ωστόσο, το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών έχει εμφανίσει μικρή βελτίωση τις τελευταίες δεκαετίες, με την 5ετή επιβίωση από 55% κατά την περίοδο 1992-1996, να φτάνει το 66% κατά την περίοδο 2002-2006 (39). Τα σημάδια βελτίωσης της επιβίωσης είναι χαρακτηριστικά σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, εκτός από τους ηλικιωμένους ασθενείς άνω των 75 ετών, και σε όλες τις ανατομικές περιοχές, εκτός από αυτή του λάρυγγα, όπου τα ποσοστά επιβίωσης παραμένουν σταθερά. Με βάση τα τελευταία δεδομένα από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου του Ηνωμένου Βασιλείου (National Cancer Institute), το 2022 έχουν καταγραφεί 11.230 θάνατοι ασθενών, που είχαν προσβληθεί από καρκίνο στην στοματική κοιλότητα και στην περιοχή του φάρυγγα, ενώ το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης ασθενών με αυτόν τον τύπο καρκίνου για την περίοδο 2012-2018 ανέρχεται σε 68% (68). Αντίστοιχα, οι θάνατοι ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα το 2022 πλησιάζουν τους 3.820, αποτελώντας το 0.6% των θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως, ενώ το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης των ασθενών φτάνει στο 61% (68). Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως εκτός από τους θανάτους των ασθενών που οφείλονται στον ΚΚΤ, οι επιζώντες από αυτόν κατέχουν το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό αυτοκτονιών (63,4 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενείς), μετά τα



περιστατικά καρκίνου του παγκρέατος (86,4 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενείς). Υποκείμενοι παράγοντες που πιθανότατα οδηγούν τους ασθενείς αυτούς στην αυτοκτονία είναι η ψυχολογική δυσφορία και η χαμηλή ποιότητα ζωής (69).

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Παρατηρητήριο του Καρκίνου (Global Cancer Observatory), αναμένεται αύξηση των ετήσιων περιστατικών ΚΚΤ παγκοσμίως ως το 2040 (70). Το 2020 καταγράφηκαν παγκοσμίως 377.713 νέοι ασθενείς (Εικόνα 8). Η Ασία βρίσκεται πρώτη στην παγκόσμια κατάταξη περιστατικών ΚΚΤ, με τον αριθμό να φτάνει τα 248.360. Έπειτα ακολουθεί η Ευρώπη, με 65.279 νέα περιστατικά, τρίτη στην κατάταξη βρίσκεται η Βόρεια Αμερική και ακολουθούν η Λατινική Αμερική, η Αφρική και η Ωκεανία. Ωστόσο, έως το 2040 ο αριθμός των ετήσιων κρουσμάτων υπολογίζεται πως θα πλησιάζει τα 530.000 σε παγκόσμια κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα, στην Ελλάδα το 2020 προστέθηκαν 1.862 νέες περιπτώσεις ΚΚΤ, με τα περισσότερα περιστατικά να εστιάζονται στον λάρυγγα και έπειτα στα χείλη και στην στοματική κοιλότητα. Με βάση τα δεδομένα του Παγκοσμίου Παρατηρητηρίου του Καρκίνου, έως το 2040 θα σημειωθεί αύξηση περίπου 25%, με τα περιστατικά να πλησιάζουν τα 2.200 ετησίως (Εικόνα 8) (70).



**Εικόνα 8. Επιδημιολογία του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου για το 2020 και προβλέψεις έως το 2040 (70).** Α. Απεικονίζεται (με μπλε) αναλυτικά ο αριθμός των νέων καταγεγραμμένων ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου στις γεωγραφικές περιοχές που εμφάνισαν αυξημένο επιπολασμό το 2020 και (με κόκκινο) η εκτιμώμενη αύξηση του αριθμού τους το 2040. Β. Παρουσιάζεται (με μπλε) η ποσοτική κατανομή των περιστατικών καρκίνου ανά ανατομική θέση της κεφαλής και του τραχήλου που καταγράφηκαν στην Ελλάδα το 2020 και (με κόκκινο) η αύξηση που αναμένεται να καταγραφεί ως το 2040.

### 1.1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου

Το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση, αντικαρκινική φαρμακευτική θεραπεία (χημειοθεραπεία), ακτινοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Η εξέλιξη της θεραπείας με αντικαρκινικά φάρμακα έχει εμφανίσει ραγδαία αύξηση τα τελευταία χρόνια. Το Cetuximab ήταν το πρώτο στοχευμένο φάρμακο που εγκρίθηκε για τη θεραπεία του ΚΚΤ και ξεκίνησε να χορηγείται συνδυαστικά με ακτινοθεραπεία ή με άλλα κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα (71,72). Ωστόσο, η θεραπευτική προσέγγιση εξαρτάται από το στάδιο της νόσου και την πρωτοπαθή περιοχή (1). Στις περιπτώσεις όπου η διάγνωση γίνεται σε αρχικό στάδιο της νόσου (στάδια I και II) συνήθως συστήνεται χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία, ενώ όταν ο καρκίνος εντοπιστεί σε προχωρημένο στάδιο (στάδια III και IV) και ο όγκος είναι αδύνατον να χειρουργηθεί, αντιμετωπίζεται με ακτινοθεραπεία και σε δεύτερη φάση, με χημειοθεραπεία (6). Όλες οι θεραπείες χαρακτηρίζονται από τοξικότητα και ενδέχεται να οδηγήσουν μεταγενέστερα σε οργανική δυσλειτουργία, είτε εφαρμοστεί χειρουργική προσέγγιση είτε φαρμακευτική (73).

#### 1.1.6.1 Χειρουργική αφαίρεση όγκου

Η χειρουργική αντιμετώπιση των όγκων κεφαλής και τραχήλου εφαρμόζεται όπου είναι δυνατόν να αφαιρεθούν και τα όριά τους έχουν εντοπιστεί καθαρά, ώστε να διατηρηθεί μελλοντικά η λειτουργικότητα του οργάνου. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και την ανατομία του όγκου επιλέγεται η τεχνική αφαίρεσης· είτε με την κλασική ανοιχτή χειρουργική επέμβαση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αισθητική παραμόρφωση και μειωμένη λειτουργικότητα, είτε με διαστοματική ρομποτική χειρουργική επέμβαση (Transoral Robotic Surgery, TORS), είτε με λέιζερ (1). Η τεχνική TORS, όπως και η χειρουργική με λέιζερ, βρίσκονται σε στάδιο εξέλιξης, ωστόσο σε έμπειρα χέρια αποτελούν την πιο αποτελεσματική, ογκολογικά και λειτουργικά ασφαλή επιλογή για την αντιμετώπιση επιλεγμένων καρκίνων κεφαλής και τραχήλου (74,75).

#### 1.1.6.2 Χημειοθεραπευτικά και στοχευμένα φάρμακα

Η ανακάλυψη της σισπλατίνης την δεκαετία του '70, οδήγησε σε μεγάλη πρόοδο την χημειοθεραπεία έναντι του ΚΚΤ, και συνδυαστικά με άλλες θεραπείες

εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα ως τυπικό σχήμα για την αντιμετώπιση αυτών των τύπων καρκίνου. Επίσης, από το 2010 εφαρμόζεται συνδυαστική θεραπεία δοσεταξέλης και σισπλατίνης, η οποία εμφανίζει ικανοποιητικά ποσοστά ανταπόκρισης σε τοπικά περιορισμένους όγκους, έως 33-53% (76–78). Επί του παρόντος, στο τοπικά περιορισμένο καρκίνωμα χρησιμοποιείται ο θεραπευτικός συνδυασμός σισπλατίνης και ακτινοθεραπείας με ικανοποιητικά αποτελέσματα ανταπόκρισης των ασθενών. Επιπλέον, ο συνδυασμός Cetuximab και ακτινοθεραπείας αποτελεί αποτελεσματική θεραπευτική λύση, αν και δεν υπάρχει μελέτη που να υποδηλώνει πως είναι πιο αποτελεσματική από τις υπόλοιπες θεραπείες. Το Cetuximab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον υποδοχέα EGFR και χορηγείται πέρα από τον ΚΚΤ και για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Πρώτα, το Cetuximab εφαρμόστηκε σε περιπτώσεις που παρατηρήθηκε έκφραση του EGFR στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ωστόσο ικανοποιητικά έδειχναν τα αποτελέσματα και όταν η έκφραση του υποδοχέα ήταν αρνητική (73).

#### 1.1.6.3 Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία (Radiation Therapy, RT) μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά της χειρουργικής αφαίρεσης του όγκου ή της χημειοθεραπείας για την αντιμετώπιση της τοπικά προχωρημένης νόσου. Οι τελευταίες εξελίξεις της τεχνολογίας στο πεδίο του καρκίνου έχουν οδηγήσει στον ακριβέστερο και αποτελεσματικότερο σχεδιασμό της ακτινοθεραπείας, σε συνδυασμό με την ανατομική και λειτουργική απεικόνιση του όγκου πριν και κατά την διάρκεια της θεραπείας και τον καθορισμό των ορίων του στόχου. Ευρεία είναι η χρήση των μεθόδων της στερεοτακτικής ακτινοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας με δέσμη σωματιδίων, μέσω των οποίων έχει επιτευχθεί η ακριβής θεραπευτική ακτινοβολία του όγκου, μειώνοντας συγχρόνως τη δόση της ακτινοβολίας και τους επακόλουθους κινδύνους τοξικότητας για τους γύρω υγιείς ιστούς (1). Έχει δειχθεί ότι υπάρχει κίνδυνος μακροπρόθεσμης τοξικότητας από την χορήγηση δόσεων ακτινοβολίας που υπερβαίνουν τα 55 Gy, στους σιαλογόνους αδένες, στους μύες του λάρυγγα και στον θυροειδή αδένα, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να αντιμετωπίζουν ξηροστομία, δυσφαγία, αναρρόφηση και υποθυρεοειδισμό (79,80).

Για την αντιμετώπιση ακτινοανθεκτικών όγκων χρησιμοποιείται ως μέρος της πολύτροπης αγωγής, η θεραπεία με δέσμη σωματιδίων (Particle Beam Therapy, PBT): ιόντων άνθρακα, δέσμης πρωτονίων και ταχέων νετρονίων. Η μέθοδος αυτή προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια στην κατανομή της δόσης της ακτινοβολίας, με ελάχιστη έως μηδενική διασπορά στους φυσιολογικούς ιστούς. Για αυτό, εφαρμόζεται σε ανθεκτικούς καρκίνους του τραχήλου και της κεφαλής για την βελτίωση του τοπικού ελέγχου (81). Με βάση πρόσφατα αποτελέσματα, καλύτερο ακτινο-βιολογικό αποτέλεσμα εξασφαλίζει η μέθοδος της γραμμικής μεταφοράς ιόντων άνθρακα και γρήγορων νετρονίων, σε σύγκριση με την ακτινοβολία πρωτονίων και φωτονίων, γεγονός που υποδηλώνει ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα 2 με 2,5 φορές μεγαλύτερο (82). Η υψηλή γραμμική μεταφορά ακτινοβολίας ιόντων άνθρακα και νετρονίων χρησιμοποιήθηκε στο αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα, που είναι ένας επιθετικός, ακτινοανθεκτικός όγκος με περινευρική διείσδυση και αυξημένα ποσοστά τοπικής υποτροπής, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (81).

#### 1.1.6.4 Ανοσοθεραπεία

Ο ΚΚΤ είναι μια κακοήθης ανοσοκατασταλτική νόσος, όπου παρατηρείται μείωση του συνολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων και δυσλειτουργία στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, στα κύτταρα φυσικούς φονείς και στα διηθητικά λεμφοκύτταρα. Μέχρι και σήμερα συνεχίζεται να διερευνάται η σχέση του καρκίνου με το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και η ξεχωριστή ανοσογονικότητα ανάλογα με την αιτιολογία της νόσου και οι διάφοροι μηχανισμοί που οδηγούν σε ανοσοκαταστολή (81). Χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων στον ΚΚΤ αποτελεί το υψηλό ποσοστό έκφρασης του μορίου PD-L1, ενώ ακόμη μεγαλύτερη είναι η έκφρασή του όταν σχετίζεται με ιογενείς λοιμώξεις του HPV και του ιού Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV) (83,84). Τα μόρια PD-L1/2, που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, προκαλούν αδρανοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης των T κυττάρων μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα PD-1 επί των T κυττάρων, όπως και ο CTLA-4 υποδοχέας, που εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα, συνδέεται με τον B7 προσδέτη στα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας των ενεργοποιημένων T κυττάρων. Οι αναστολείς των ανοσιακών σημείων ελέγχου (Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs) στοχεύουν στην αναστολή των παραπάνω αλληλεπιδράσεων και κατ' επέκταση στην ενεργοποίηση των T κυττάρων έναντι του

όγκου. Τα τελευταία 10 χρόνια, οι ICIs έχουν συγκεντρώσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, για την στόχευση των PD-1 και PD-L1 στον ΚΚΤ. Το 2016, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) ενέκρινε τους παράγοντες Nivolumab και Pembrolizumab για τη θεραπεία ασθενών με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (85,86).

Πολύ ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι ασθενείς που έχουν λάβει ανοσοθεραπευτικούς παράγοντες εμφανίζουν ανταπόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο, ο αριθμός αυτών των ασθενών είναι περιορισμένος, για αυτό και είναι αναγκαία η ανάπτυξη ειδικών βιοδεικτών ανταπόκρισης για την επιλογή των ασθενών που είναι περισσότερο πιθανό να ωφεληθούν από τη θεραπεία. Τα πρώιμα αποτελέσματα της μελέτης KEYNOTE-048 δείχνουν πως η χορήγηση του ανοσοθεραπευτικού παράγοντα Pembrolizumab ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής δίνει αυξημένα επίπεδα επιβίωσης των ασθενών με έκφραση PD-L1 και με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό ΚΚΤ (81). Παράλληλα, λαμβάνουν χώρα δοκιμές φάσης III για την αξιολόγηση της θεραπείας με αντισώματα έναντι του PD-L1 και του CTLA-4 σε συνδυασμό με χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία, ελπίζοντας ότι αυτές οι δοκιμές θα οδηγήσουν στην καλύτερη πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία, θα επιτρέψουν την αποτελεσματική επιλογή ασθενών που θα επωφεληθούν από αυτά τα θεραπευτικά σχήματα και θα περιορίσουν την ανοσοκαταστολή των ασθενών. Υπό διερεύνηση βρίσκεται η κατάλληλη εφαρμογή αυτών των νέων θεραπειών, ωστόσο είναι σημαντικό το γεγονός ότι θεραπεύονται ασθενείς με τόσο κακή αρχική πρόγνωση (81).

## 1.2 Ο υποδοχέας των T κυττάρων

### 1.2.1 Οι λειτουργίες των T κυττάρων

Βασικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν τα T κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να αναγνωρίζουν μια τεράστια ποικιλία αντιγόνων και έχουν βασικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία και στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά του καρκίνου, γεγονός που έχει αποτελέσει έντονο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Τα T κύτταρα διακρίνονται από τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα επειδή στην κυτταρική επιφάνειά τους διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς. Τα T κύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών από τα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και στην πορεία μεταναστεύουν και ωριμάζουν στον θύμο αδένα. Μετά την μετανάστευσή τους, τα πρόδρομα T κύτταρα διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς υποτύπους, καθένας από τους οποίους διαθέτει ποικιλία λειτουργιών στον έλεγχο και την εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης (87).

Δύο κύριοι υπότυποι των T κυττάρων είναι τα CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> κύτταρα, τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα είναι γνωστά και ως “κύτταρα φονείς” και είναι κυτταροτοξικά, διαθέτουν δηλαδή την ικανότητα να θανατώνουν άμεσα τα κύτταρα που είναι μολυσμένα από ιούς και τα καρκινικά κύτταρα (88). Επιπλέον, τα CD8<sup>+</sup> μπορούν να στρατολογήσουν και άλλους τύπους κυττάρων μέσω της παραγωγής και έκκρισης μικρών πρωτεϊνών σηματοδότησης, των κυτταροκινών, κατά την ανοσοαπόκριση. Από την άλλη, τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται και ως “βοηθητικά κύτταρα”, σκοτώνουν έμμεσα τα κύτταρα-στόχους, ενώ χρησιμοποιούν εξίσου τις κυτταροκίνες προκειμένου να επηρεάσουν άμεσα την δράση άλλων κυτταρικών υποπληθυσμών (89).

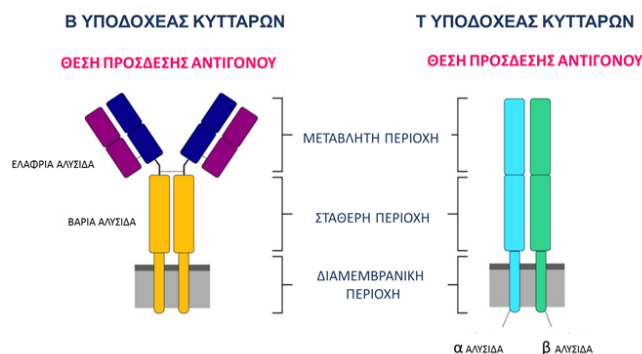
Ένας ακόμη πληθυσμός των T κυττάρων είναι τα ρυθμιστικά T κύτταρα, τα οποία φαίνεται ότι ελέγχουν την έκφραση και την εξέλιξη της αυτοανοσίας, καταστέλλοντας τα αυτοαντιδραστικά T κύτταρα, αποτρέποντας έτσι τη μη φυσιολογική αντίδραση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των εαυτών κυττάρων (90). Για αυτό τα T ρυθμιστικά κύτταρα ονομάστηκαν και “κατασταλτικά” T κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα καταστέλλουν την ενεργοποίηση των CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T κυττάρων μέσω του μηχανισμού που εξαρτάται από την φυσική επαφή μεταξύ κυττάρων. Επιπλέον, καταστέλλουν την αυτοανοσία μέσω μονοπατιών που ενεργοποιούνται από την επαφή κυττάρων και από μονοπάτια που πυροδοτούνται

από κυτταροκίνες (90). Τέλος, τα T ρυθμιστικά κύτταρα μπορούν να επιλεγούν από τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να αποτρέψουν την αναγνώριση και την ανοσολογική απόκριση έναντι των καρκινικών κυττάρων (91).

### 1.2.2 Διαφορές υποδοχέων αντιγόνου των T και B κυττάρων

Οι υποδοχείς αντιγόνων των T και B κυττάρων έχουν πολλά κοινά, καθώς είναι μόρια συγγενικά μεταξύ τους, ωστόσο κατέχουν διαφορετικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι υποδοχείς των B κυττάρων (B-Cell Receptors, BCRs) έχουν την ικανότητα να εκκρίνονται ως αντισώματα, ενώ οι υποδοχείς των T κυττάρων (T-Cell Receptors, TCRs) είναι αποκλειστικά μεμβρανικοί και δεν εκκρίνονται (92). Επομένως, οι TCRs στερούνται τις ικανότητες της εξουδετέρωσης και ωψονοποίησης των αντισωμάτων και στοχεύουν στην αναγνώριση του αντιγόνου και στην ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Μια ακόμη σημαντική διαφορά που χαρακτηρίζει τους δυο υποδοχείς είναι ο μηχανισμός αναγνώρισης των αντιγόνων. Οι BCRs μπορούν να αναγνωρίζουν και να συνδέονται άμεσα με μια μεγάλη ποικιλία μορίων, ενώ από την άλλη οι TCRs αναγνωρίζουν μόνο μικρά πεπτιδικά θραύσματα πρωτεϊνικών αντιγόνων, τα οποία παρουσιάζονται μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs) του οργανισμού (92,93). Επιπλέον και στην δομή τους εμφανίζουν διαφορές (**Εικόνα 9**), καθώς οι υποδοχείς των T κυττάρων αποτελούνται από δύο ετεροδιμερείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό και έπειτα κάθε αλυσίδα του υποδοχέα αποτελείται από δυο εξωκυτταρικές περιοχές, μια διαμεμβρανική και μια κυτταροπλασματική ουρά (91). Ανάλογη δομή έχει και η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα των BCRs, ωστόσο η διχαλωτή δομή τους διαθέτει δυο θέσεις πρόσδεσης του αντιγόνου, σε αντίθεση με τους TCRs που έχουν αποκλειστικά μια μόνο αντιγονική θέση πρόσδεσης (92,94).

## ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ Β ΚΑΙ Τ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Εικόνα 9. Δομή των Β και Τ υποδοχέων αντιγόνου (95).

### 1.2.3 Αναγνώριση αντιγόνων από τους υποδοχείς TCR

Οι υποδοχείς των Τ κυττάρων ανιχνεύουν την εισβολή ενός ενδοκυτταρικού παθογόνου, επειδή τα μολυσμένα κύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους μικρά πεπτιδικά θραύσματα πρωτεϊνικών αντιγόνων, τα οποία έχουν μεταφερθεί από εξειδικευμένα πρωτεϊνικά μόρια του κυττάρου ξενιστή, γνωστά ως μόρια MHC. Τα πεπτιδικά θραύσματα συνδέονται σε μια σχισμή στη εξωκυτταρική πλευρά του μορίου MHC, η οποία και αποτελεί βασικό δομικό χαρακτηριστικό του μορίου. Τα μόρια αυτά είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από ένα μεγάλο σύμπλεγμα γονιδίων, το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (92). Για πρώτη φορά, τα μόρια MHC εντοπίστηκαν από την έντονη ανοσολογική απόκριση που προκλήθηκε σε μεταμοσχευμένους ιστούς (96,97). Τα μόρια αυτά, έχουν την ικανότητα να εκφράζονται σε διαφορετικές εκδοχές στον πληθυσμό, για αυτό και μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολυμορφικά. Αυτό σημαίνει πως οι περισσότεροι άνθρωποι είναι ετερόζυγοι για τα μόρια MHC και αυτό το γεγονός αυξάνει το εύρος των πεπτιδίων των παθογόνων που μπορούν να δεσμευτούν σε αυτά (98). Επομένως, κάθε υποδοχέας TCR είναι ειδικός για ένα μοναδικό συνδυασμό πεπτιδίου και μορίου MHC, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως περιορισμός του MHC (99).

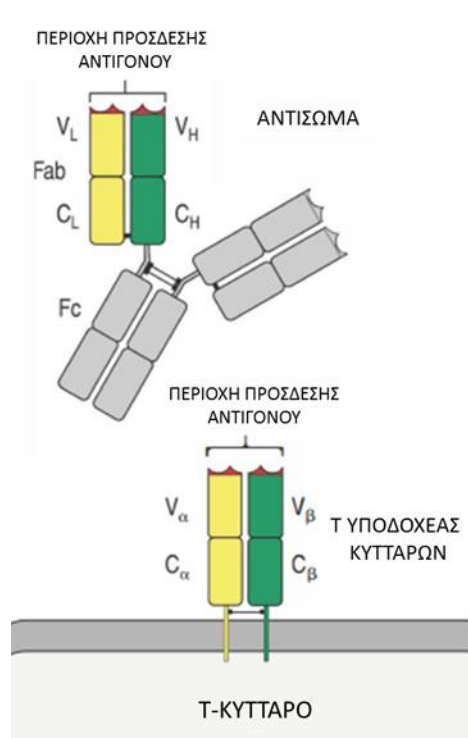
Υπάρχουν δύο τύποι μορίων MHC, τα MHC I και MHC II, που απαρτίζονται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες και είναι πολυμορφικά μη ομοιοπολικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Το MHC I εμφανίζεται συνήθως στην διαδικασία σηματοδότησης ιογενών λοιμώξεων στα κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> Τ κύτταρα. Βρίσκεται στην επιφάνεια των



εμπύρηνων κυττάρων του σώματος και τα πεπτίδια που παρουσιάζουν τα μόρια MHC αυτού του τύπου έχουν μήκος 8-10 αμινοξέα και προέρχονται από την επεξεργασία ξένων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (100). Από την άλλη, το MHC II παρουσιάζει πεπτίδια που έχουν μήκος 13-17 αμινοξέα, τα οποία προέρχονται από το εξωκυτταρικό περιβάλλον (101). Εντοπίζεται αποκλειστικά στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των B κυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων και των μακροφάγων (91). Μέσω της αναγνώρισης του μορίου MHC II από τα βοηθητικά CD4+ T κύτταρα διεγείρονται οι ενισχυτικοί βραχίονες του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση των CD8+ κυττάρων συμβάλλει στην αύξηση της ευαισθησίας των T κυττάρων στα αντιγόνα και στην εκκίνηση της σηματοδότησης του υποδοχέα των T κυττάρων (102).

#### 1.2.4 Διάταξη των γονιδίων του υποδοχέα των T κυττάρων

Για πρώτη φορά η αναγνώριση των υποδοχέων των T κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία φάνηκε να δεσμεύονται σε μία συγκεκριμένη κλωνοποιημένη περιοχή των T κυττάρων (92). Η λειτουργία αυτών των αντισωμάτων στόχευε είτε στην αναστολή της αναγνώρισης του αντιγόνου από τον κλωνότυπο, είτε στην ενεργοποίησή του, μιμούμενοι το αντιγόνο. Τελικά, αυτά τα κλωνοτυπικά αντισώματα απέδειξαν ότι κάθε T κύτταρο διαθέτει στην επιφάνειά του περίπου 30.000 υποδοχείς αντιγόνου και κάθε υποδοχέας απαρτίζεται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την  $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) και την  $\beta$  (TCR $\beta$ ), οι οποίες ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό (92). Η δομή του ετεροδιμερούς  $\alpha$ : $\beta$  θυμίζει αρκετά τη δομή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης Fab, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10**, και ο ρόλος του βασίζεται στην αναγνώριση των αντιγόνων από τα T κύτταρα. Επίσης, υπάρχει και μια ομάδα T κυττάρων, που στην επιφάνειά τους φέρουν έναν υποδοχέα που αποτελείται από ένα διαφορετικό ζεύγος πολυπεπτιδικών αλυσίδων, τις  $\gamma$  και  $\delta$ , χωρίς να παρατηρούνται δομικές αλλαγές. Ωστόσο, λειτουργικά οι υποδοχείς  $\gamma$ : $\delta$  των T κυττάρων έχουν διαφορετικό τρόπο αναγνώρισης του αντιγόνου από τους υποδοχείς  $\alpha$ : $\beta$ , καθώς και διαφορετικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, γεγονός το οποίο δεν έχει διευκρινισθεί ακόμα πλήρως (103).

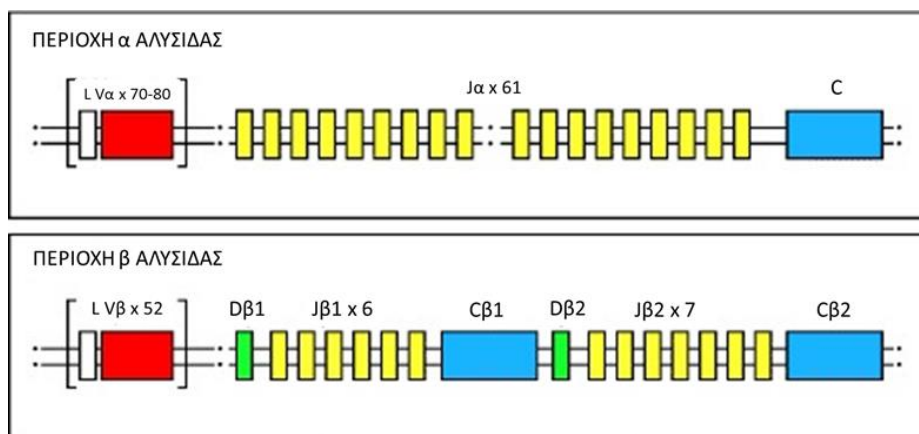


**Εικόνα 10. Η ομοιότητα του υποδοχέα των T κυττάρων με το θραύσμα Fab (92).**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι υποδοχείς των T κυττάρων εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τις ανοσοσφαιρίνες και επιπλέον κωδικοποιούνται από ομόλογα γονίδια (104). Κατά την ανάπτυξη των T κυττάρων στον θύμο αδένα, τα γονίδια του TCR αναδιατάσσονται προκειμένου να σχηματιστούν τα εξώνια της V (variable) περιοχής. Αυτός ο μηχανισμός αναδιάταξης είναι κοινός για τα B και T κύτταρα. Όπως συμβαίνει και στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, έτσι και τα τμήματα του γονιδίου των υποδοχέων των T κυττάρων πλαισιώνονται από αλληλουχίες σήματος ανασυνδυασμού (Recombination Signal Structures, RSS), επταμερείς και μη, και αναγνωρίζονται από παρόμοια ένζυμα. Επίσης, ένα χαρακτηριστικό που είναι εξίσου κοινό και στις δύο περιπτώσεις, είναι η παρουσία P- και N- νουκλεοτιδίων στις ενώσεις μεταξύ των τμημάτων των γονιδίων V (variable) και J (joining) του TCR $\alpha$  και των γονιδίων V, D (diversity) και J του TCR $\beta$  (92,105).

Όπως και στην περίπτωση των ανοσοσφαιρινών, με τις βαριές και ελαφριές αλυσίδες, έτσι και στους υποδοχείς των T κυττάρων οι αλυσίδες  $\alpha$  και  $\beta$  απαρτίζονται από μία μεταβλητή αμινοτελική περιοχή (V) και από μία σταθερή περιοχή (C). Ο TCR $\alpha$  περιλαμβάνει τα γονιδιακά τμήματα V και J (V $\alpha$  και J $\alpha$ ). Κατ' αναλογία, ο TCR $\beta$ , περιέχει τα τμήματα των γονιδίων V, J και D. Πιο αναλυτικά, η οργάνωση των

γονιδιακών τμημάτων των TCR $\alpha$  και TCR $\beta$  αναπαρίσταται στην **Εικόνα 11**. Η αλληλουχία του TCR $\alpha$  απαρτίζεται από 70-80 τμήματα γονιδίων V $\alpha$ , ωστόσο δεν είναι γνωστό πόσα από τα τμήματα αυτά είναι λειτουργικά. Πριν από κάθε τμήμα του γονιδίου V $\alpha$  προηγείται ένα εξώνιο, το οποίο κωδικοποιεί την πρώτη αλληλουχία (L) (92). Ο γενετικός τόπος των J $\alpha$ , που βρίσκονται σε απόσταση από τα τμήματα των V $\alpha$ , αποτελείται από 61 γονιδιακά τμήματα και ακολουθείται από ένα μόνο γονίδιο C (106). Το γονίδιο C διαθέτει ξεχωριστά εξώνια για τις σταθερές περιοχές και για τις περιοχές διασύνδεσης (J) και ένα μόνο εξώνιο το οποίο κωδικοποιεί τις κυτταροπλασματικές και διαμεμβρανικές περιοχές. Από την άλλη, η οργάνωση του TCR $\beta$  διαφέρει από εκείνη του TCR $\alpha$ , καθώς ο TCR $\beta$  διαθέτει μια ομάδα από 52 λειτουργικά τμήματα γονιδίων V $\beta$  (107). Έπειτα, ακολουθούν δυο ξεχωριστές ομάδες, που η καθεμία αποτελείται από ένα γονιδιακό τμήμα D, ενωμένο με 6 ή 7 τμήματα των γονιδίων J και ένα μόνο γονίδιο C. Αυτές οι δύο ξεχωριστές ομάδες γονιδίων βρίσκονται σε απόσταση από την περιοχή V $\beta$ . Κάθε γονίδιο C του TCR $\beta$  διαθέτει διαφορετικά εξώνια για κάθε περιοχή που κωδικοποιεί, δηλαδή την σταθερή περιοχή, την περιοχή άρθρωσης και την διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή (92).

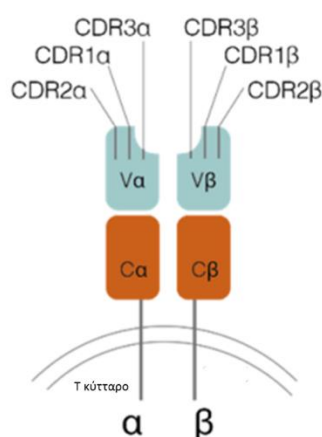


**Εικόνα 11. Οργάνωση των αλυσίδων α και β του υποδοχέα των T κυττάρων (92).**

### 1.2.5 Η ποικιλομορφία των υποδοχέων των T κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αλυσίδες α και β του υποδοχέα των T κυττάρων αποτελούνται από πολλαπλά μεταβλητά (V) και διασυνδεδετικά (J) τμήματα για τους TCR $\alpha$  και TCR $\beta$  και τμήματα ποικιλομορφίας (D) για τους TCR $\beta$  (108). Οι περιοχές V(D)J ανασυνδυάζονται μεταξύ τους, και έτσι τυχαία τμήματα των V και J

για την αλυσίδα του TCR $\alpha$  και τυχαία τμήματα των V, D και J του TCR $\beta$  σχηματίζουν λειτουργικές αλληλουχίες κωδικοποίησης της μεταβλητής περιοχής. Και έπειτα, ανασυνδυάζεται αυτή η αλληλουχία με ένα τμήμα C και μεταγράφεται σε λειτουργική αλυσίδα  $\alpha$  και  $\beta$  (109). Η δομή των TCR $\alpha$  και TCR $\beta$  απαρτίζεται από τρεις υπερμεταβλητούς βρόχους, που είναι γνωστοί και ως περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (Complementarity Determining Regions, CDRs), CDR1, CDR2 και CDR3 (92). Η δομή της θέσης πρόσδεσης του αντιγόνου των T υποδοχέων έχει πολλές ομοιότητες με την αντίστοιχη θέση ενός μορίου αντισώματος. Οι CDR3 περιοχές σχηματίζουν το κέντρο της θέσης πρόσδεσης του αντιγόνου με την συμβολή των τμημάτων των γονιδίων V και J (και D). Οι περιοχές CDR1 και CDR2 τοποθετούνται στην περιφέρεια της θέσης πρόσδεσης του αντιγόνου και κωδικοποιούνται εντός των γονιδιακών τμημάτων V (73) (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Η δομή του TCR, με έμφαση στη θέση πρόσδεσης αντιγόνου (υπερ-μεταβλητή περιοχή) (73).

Στην περιοχή CDR3 παρατηρούνται τυχαίες προσθήκες, απαλοιφές -ή και τα δύο ταυτόχρονα- νουκλεοτιδίων (N) στις θέσεις ένωσης μεταξύ των τμημάτων (N(D)N), γεγονός που προσδίδει υψηλή μεταβλητότητα στην συγκεκριμένη περιοχή (110). Από την άλλη, στις περιοχές CDR1 και CDR2 εμφανίζεται μικρότερη ποικιλομορφία, σε σχέση με τα μόρια των αντισωμάτων, καθώς έρχονται σε επαφή με το MHC που θεωρείται λιγότερο μεταβλητό συστατικό (111). Επομένως, η μεγάλη ποικιλομορφία των TCR είναι αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού των γονιδιακών τμημάτων V(D)J των TCR $\alpha$  και TCR $\beta$ , των προσθηκών και των απαλοιφών N(D)N και

της ετεροδιμερούς σύζευξης των αλυσίδων  $\alpha$  και  $\beta$ , με αποτέλεσμα να διασφαλίζεται η ικανότητα αναγνώρισης μιας μεγάλης ποικιλίας αντιγόνων από τους υποδοχείς (92).

### 1.2.6 Η αλληλούχιση των υποδοχέων των T κυττάρων

Με την άφιξη της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η εκτίμηση της ποικιλομορφίας των ρεπερτορίων έγινε πολύ εύκολη και έφερε επανάσταση στην διερεύνηση των υποδοχέων των T κυττάρων. Πριν την είσοδο της τεχνολογίας NGS, η ποσοτικοποίηση των κλωνότυπων TCR υπολογιζόταν θεωρητικά, ωστόσο με την επανάσταση των τεχνολογιών επετεύχθη η ακριβέστερη χαρτογράφηση τους (112). Η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης και η εξέλιξη των βιοπληροφορικών εργαλείων τα τελευταία χρόνια έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για το ρεπερτόριο των TCR. Ωστόσο, η πληθώρα όλων αυτών των τεχνολογιών έχουν δημιουργήσει και μια διακύμανση στα δεδομένα που λαμβάνονται. Η μεταβλητότητα αυτή, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων, όπως της αρχικής πηγής του υλικού – DNA ή RNA – όσο και της ποσότητάς του, της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων ή μαζικών πληθυσμών, της διαδικασίας της προετοιμασίας των βιβλιοθηκών και των διαφόρων βιοπληροφορικών εργαλείων που βρίσκουν εφαρμογή στην διόρθωση ή στην ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και της αλληλούχισης (111,113,114).

Η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων επηρεάζει στενά την αξιολόγηση της ποικιλομορφίας. Η μεθοδολογία NGS άνοιξε τον δρόμο στις δοκιμασίες υψηλής απόδοσης αλληλούχισης του TCR (TCR Sequencing, TCRSeq), που βοήθησαν στον χαρακτηρισμό των ρεπερτορίων των υποδοχέων T κυττάρων (115). Για την εκτίμηση της ποικιλομορφίας των TCR μέσω της αλληλούχισης, πρέπει να ληφθεί υπόψη το αρχικό υλικό, δηλαδή το DNA ή το RNA. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του DNA είναι η σταθερότητα του μορίου στον αριθμό των αντιγράφων στο κύτταρο, για αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως. Από την άλλη, οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία, καθώς δεν συνυπολογίζεται ο αποκλεισμός των αλληλομόρφων και προκύπτουν σφάλματα εξαιτίας των υπολειμματικών αναδιατάξεων V(D)J και επομένως υπερεκτιμάται η ποικιλομορφία (115,116). Αντιθέτως, το RNA έχει μικρότερη σταθερότητα και η έκφραση ποικίλλει από κύτταρο

σε κύτταρο, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ποσοτικοποίησή του TCR (111). Ωστόσο, μεγαλύτερη ευαισθησία φαίνεται να έχουν οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν RNA γιατί λύνουν το πρόβλημα του αποκλεισμού αλληλομόρφων και διορθώνουν τα σφάλματα της ενίσχυσης και της αλληλούχισης με την εφαρμογή μοναδικών μοριακών αναγνωριστικών (Unique Molecular Identifiers, UMI) (117).

Η ανάλυση ενός και μόνο κυττάρου, σε σύγκριση με τις μεθόδους ανάλυσης μαζικών πληθυσμών κυττάρων, επιτυγχάνει την αλληλούχιση τόσο της  $\alpha$  όσο και της  $\beta$  αλυσίδας των TCR σε ένα μόνο κύτταρο (111,113). Ωστόσο, η  $\beta$  αλυσίδα έχει την δυνατότητα να συζευχθεί με διαφορετικές αλυσίδες  $\alpha$  σε διαφορετικά κύτταρα και αντίστροφα, επομένως υποβαθμίζεται το μέτρο της ποικιλομορφίας. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παράγοντας που επηρεάζει την μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων είναι η προετοιμασία των βιβλιοθηκών. Η μέθοδος της multiplex-PCR χρησιμοποιεί εκκινητές όλων των γονιδίων V, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η ενίσχυση νέων αλληλόμορφων παραλλαγών και να υποβαθμίζεται το μέτρο της ποικιλομορφίας. Από την άλλη, με τις τεχνολογίες της ταχείας ενίσχυσης cDNA άκρων (Rapid Amplification of CDNA Ends, 5'RACE) ενισχύονται άγνωστες μεταβλητές, καθώς χρησιμοποιείται η δραστηριότητα τερματικής τρανσφεράσης του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (113,118,119).

1.3 Ο υποδοχέας των T κυττάρων ως προγνωστικός και προβλεπτικός βιοδείκτης στον καρκίνο

1.3.1 Η ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών ανταπόκρισης των ασθενών στις αντικαρκινικές θεραπείες

Οι προβλεπτικοί βιοδείκτες αποτελούν δείκτες της πιθανότητας ανταπόκρισης ή αντίθετα, της έλλειψης ανταπόκρισης μιας ομάδας ασθενών σε μια συγκεκριμένη θεραπεία και επιτρέπουν την αναγνώριση και επιλογή εκείνων των ασθενών που είναι πιο πιθανό να ωφεληθούν από μια δεδομένη θεραπεία, προστατεύοντας παράλληλα τους ασθενείς από τις τοξικότητες αναποτελεσματικών θεραπειών (120).

Ένα παράδειγμα προβλεπτικού βιοδείκτη στον καρκίνο του μαστού είναι η έκφραση της πρωτεΐνης-υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2) (Πίνακας 1). Περίπου το 15% έως 20% των ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού έχουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης HER2 (μέλος της οικογένειας των διαμεμβρανικών υποδοχέων EGFR), που σχετίζεται με ανταπόκριση σε παράγοντες που στοχεύουν τη HER2, όπως η τραστοζουμάμπη, η περτουζουμάμπη, και η τραστοζουμάμπη-εμτανσίνη (121). Ένα άλλο παράδειγμα είναι η έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού, η οποία συσχετίζεται με την ευαισθησία σε θεραπευτικούς ορμονικούς παράγοντες (Πίνακας 1).

Στον μεταστατικό NSCLC, σε ασθενείς με όγκους που φέρουν μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 ή 21 του γονιδίου του *EGFR* ή στην πρωτεΐνη σύντηξης EML4-ALK, αυτές αποτελούν βιοδείκτες πρόβλεψης της ανταπόκρισης των ασθενών σε στοχευμένες θεραπείες έναντι του EGFR (gefitinib ή erlotinib) ή της ALK (crizotinib), αντίστοιχα (121) (Πίνακας 1). Στους ανταποκρινόμενους ασθενείς, αυτές οι θεραπείες είναι πιο αποτελεσματικές από την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Αυτές οι σωματικές μεταλλάξεις εντοπίζονται μόνο σε μια υπο-ομάδα ασθενών με μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (μεταλλάξεις EGFR στο 15%-20% και μετατόπιση EML4-ALK σε 3%-5%). Η ανάπτυξη ισχυρών, κλινικά εφαρμόσιμων βιοδεικτών που προσδιορίζουν αυτές τις αλλαγές επέτρεψε την επιλογή μόνο εκείνων των ασθενών που θα ωφεληθούν από τη στοχευμένη θεραπεία.

**Πίνακας 1. Παραδείγματα βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (121).**

Τύπος καρκίνου	Βιοδείκτης	Προγνωστική ή προβλεπτική αξία
Ολιγοδενδρογλοίωμα	Ταυτόχρονη απαλοιφή των 1p και 19q	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Ολιγοδενδρογλοίωμα	Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου <i>MGMT</i>	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς	Μετάλλαξη γονιδίου <i>RET</i>	Προγνωστική
Καρκίνος μαστού	Έκφραση PR	Προγνωστική
Καρκίνος μαστού	Έκφραση ER	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Καρκίνος μαστού	Ενίσχυση γονιδίου <i>HER2</i>	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Καρκίνος πνεύμονα	Μετάλλαξη γονιδίου <i>EGFR</i>	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Καρκίνος πνεύμονα	Μετατόπιση <i>EML4-ALK</i>	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Καρκίνος στομάχου	Ενίσχυση γονιδίου <i>HER2</i>	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Καρκίνος παχέος εντέρου	Μετάλλαξη γονιδίου <i>KRAS</i>	Προβλεπτική
Μελάνωμα	Μετάλλαξη γονιδίου <i>BRAF</i>	Προγνωστική/ Προβλεπτική
Γαστρεντερικός στρωματικός καρκίνος	Μετάλλαξη γονιδίου <i>KIT</i>	Προβλεπτική
Γαστρεντερικός στρωματικός καρκίνος	Μετάλλαξη γονιδίου <i>PDGFRA</i>	Προβλεπτική

*MGMT*, DNA μεθυλοτρανσφεράση της O<sup>6</sup>-μεθυλογουανίνης; *RET*, ανακαταναμημένο κατά την επιμόλυνση; PR, υποδοχέας προγεστερόνης; ER, υποδοχέας οιστρογόνων; *HER2*; Ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας; *EGFR*, υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα; *EML4*, πρωτεΐνη που προσομοιάζει με την σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους των εχινόδερμων 4; *ALK*, κινάση αναπλαστικού λεμφώματος; *KRAS*, ομόλογο του ιικού ογκογονιδίου Kirsten σαρκώματος αρουραίου; *BRAF*, ομόλογο B1 του ιικού ογκογονιδίου v-raf σαρκώματος ποντικού; *PDGFRA*, υποδοχέας A του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα.

Προκειμένου να είναι κλινικά χρήσιμος, ένας βιοδείκτης θα πρέπει να προσδιορίζεται σε ένα δείγμα που είναι εύκολα προσβάσιμο και μπορεί να ληφθεί εύκολα με τυποποιημένα πρωτόκολλα συλλογής και επεξεργασίας. Οι βιοδείκτες που απαιτούν σειριακές αξιολογήσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα θα πρέπει να μπορούν να συλλέγονται με ελάχιστα επεμβατικό τρόπο. Η ίδια η ανάλυση του βιοδείκτη θα πρέπει να είναι ειδική για τον τύπο της νόσου που δοκιμάστηκε και να είναι αναπαραγώγιμη, με κατάλληλα κατώφλια (cut-offs) που υποδεικνύουν την παρουσία ή την απουσία του βιοδείκτη. Είναι σημαντικό οι βιοδείκτες να επικυρώνονται σε έναν ανεξάρτητο κλινικό πληθυσμό που διαφέρει από τον πληθυσμό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του βιοδείκτη. Η χρήση ενός συγκεκριμένου βιοδείκτη θα πρέπει να



οδηγεί σε μια κλινική απόφαση που συνδέεται με κλινικά σημαντικά αποτελέσματα, όπως βελτίωση της επιβίωσης ή της ποιότητας ζωής ή μειωμένη τοξικότητα (121).

### 1.3.2 Ο TCR ως βιοδείκτης ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία

Η συμβολή της ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου, ειδικότερα με τους αναστολείς των ανοσιακών σημείων ελέγχου, είναι πολύ σημαντική. Παρόλα αυτά, ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών που λαμβάνει την ανοσοθεραπεία δεν ανταποκρίνεται σε αυτή. Υπάρχει η ανάγκη κατανόησης των ανοσολογικών μηχανισμών που συμβάλλουν στην ανταπόκριση των ασθενών στις ανοσοθεραπείες και ο εντοπισμός προβλεπτικών βιοδεικτών ανταπόκρισης, ώστε να αναπτυχθούν θεραπείες στις οποίες θα ανταποκρίνεται η πλειοψηφία των ασθενών (122). Οι ήδη υπάρχοντες προ-θεραπευτικοί βιοδείκτες ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία, όπως η διήθηση του όγκου από CD8<sup>+</sup> T κύτταρα, η έκφραση του υποδοχέα PD-L1 και το φορτίο των μεταλλάξεων και των νεοαντιγόνων, έχουν χαμηλή προγνωστική αξία. Επομένως, οι προ-θεραπευτικοί βιοδείκτες είναι σημαντικοί αλλά ένας πρώιμος βιοδείκτης κατά την εκάστοτε θεραπεία θα έδινε μια πιο ξεκάθαρη εικόνα της ανταπόκρισης στη θεραπεία (123).

Ο εντοπισμός των βιοδεικτών μπορεί να γίνει μεταξύ της έναρξης της ανοσοθεραπείας και κατά την διάρκεια αυτής. Οι σημαντικές μεταβολές στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το ρεπερτόριο των T κυττάρων, στο διάστημα αυτό θα μπορούσαν να δώσουν μια εικόνα της ανοσολογικής απάντησης στην ανοσοθεραπεία. Τα ρεπερτόρια των T κυττάρων, μέσω της αλληλούχισης υψηλής απόδοσης, αποτελούν ένα ολοκληρωμένο προφίλ που δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης των μεταβολών των υποδοχέων των T κυττάρων και των μηχανισμών απόκρισής τους. Η διερεύνηση αυτών των αλλαγών στο ρεπερτόριο των T κυττάρων μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την έκβαση της θεραπείας. Επομένως, ο χαρακτηρισμός του ρεπερτορίου των T κυττάρων είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης της ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία και δίνει την δυνατότητα καλύτερης προσέγγισης του στόχου (124).

Η αντιμετώπιση του καρκίνου με τις θεραπείες anti-CTLA-4 και anti-PD-L1 έχει δείξει σημαντικά αποτελέσματα στην ανταπόκριση ορισμένων ασθενών με ανάλογους τύπους καρκίνου (125). Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, η θεραπεία anti-

CTLA-4 έχει οδηγήσει σε καλύτερη εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα. Από την άλλη, πολύ ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα των ανταποκρίσεων από τη θεραπεία με anti-PD-L1 σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, με λέμφωμα Hodgkin, καρκίνο του μαστού, νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνο της ουροδόχου κύστης και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (124).

#### 1.3.2.1 Οι επιδράσεις της θεραπείας anti-CTLA-4 στο ρεπερτόριο του TCR

Από τη θεραπεία με anti-CTLA-4 σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα έχει καταγραφεί αυξημένη ποικιλομορφία του ρεπερτορίου του TCR μετά από αυτήν. Η αυξημένη ποικιλομορφία του ρεπερτορίου του υποδοχέα μετά τη θεραπεία έχει θεωρηθεί πως είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας νέων κλωνότυπων που αντιδρούν κατά του όγκου, όπως επίσης υποδηλώνει και η αύξηση των νέων CD8+ ειδικών για το μελάνωμα TCRs που ανιχνεύονται μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, παρά την αυξημένη ποικιλομορφία, οι συστηματικές επιδράσεις του ρεπερτορίου του υποδοχέα είναι περιορισμένες. Παρόλα αυτά, η μεγάλη ποικιλομορφία των T κυττάρων στο περιφερικό αίμα έχει συνδεθεί με τοξικότητα της θεραπείας έναντι του CTLA-4, οδηγώντας στην ενεργοποίηση αυτό-αντιδραστικών T κυττάρων (126). Από την άλλη, παρουσιάζεται ικανοποιητική ανταπόκριση και αυξημένη συνολική επιβίωση από τη θεραπεία anti-CTLA-4 στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται αυξημένη κλωνικότητα του ρεπερτορίου του υποδοχέα των T κυττάρων. Επομένως, οι αναλύσεις του ρεπερτορίου του TCR οδηγούν στο συμπέρασμα πως η ενισχυμένη προϋπάρχουσα ανοσία, όπως η αυξημένη κλωνικότητα του TCR, σε συνδυασμό με την αύξηση της συγκέντρωσης των T κυττάρων από την anti-CTLA-4 θεραπεία μπορούν να οδηγήσουν στην επίτευξη αποτελεσματικής απάντησης στην ανοσοθεραπεία (127).

#### 1.3.2.2 Οι επιδράσεις της θεραπείας anti-PD-L1 στο ρεπερτόριο του TCR

Όπως και στην περίπτωση της anti-CTLA-4 θεραπείας, στον καρκίνο του δέρματος (μελάνωμα) η θεραπεία με anti-PD-L1 παρουσιάζει μεγάλη ανταπόκριση και ικανοποιητική κλινική εικόνα των ασθενών, όταν συσχετίζεται με αυξημένη κλωνικότητα των T κυττάρων πριν από τη θεραπεία (128). Επίσης, βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα της anti-PD-L1 θεραπείας, σε συνδυασμό με την αυξημένη κλωνικότητα

μετά τη θεραπεία, έχουν καταγραφεί και στο μεταστατικό μελάνωμα, στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στο γλοιοβλάστωμα και στον μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (115). Είναι αξιοσημείωτο, πως η αυξημένη κλωνικότητα των T κυττάρων που έχει ανιχνευθεί σε δείγματα όγκων κατά την διάρκεια της θεραπείας, εμφανίζεται κυρίως στη θεραπεία με ένα μόνο παράγοντα anti-PD-L1 παρά σε συνδυαστική θεραπεία με δύο παράγοντες anti-PD-L1/anti-CTLA-4 (129). Επομένως, η anti-PD-L1 θεραπεία έχει την ικανότητα να διατηρεί αλλά και να επανενεργοποιεί προϋπάρχοντα T κύτταρα κατά του όγκου. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί η δημιουργία νέων κλωνότυπων TCR σε ασθενείς με πλακώδη κυτταρικά καρκινώματα, όπως είναι και ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία anti-PD-L1 (130). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως σε κάποιες περιπτώσεις τα υφιστάμενα διηθητικά λεμφοκύτταρα δεν έχουν την δυνατότητα αναζωογόνησης και πως η ανοσολογική απόκριση των T κυττάρων εντός του όγκου κατά την ανοσοθεραπεία, ίσως είναι συνέπεια των νέων ρεπερτορίων TCR που έχουν επηρεάσει το μικροπεριβάλλον του όγκου. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως η θεραπευτική ανταπόκριση στους αναστολείς ανοσιακών σημείων ελέγχου συνδέεται άμεσα με την κλωνικότητα και ποικιλομορφία του ρεπερτορίου του TCR (115). Επομένως, η ανάλυση του ρεπερτορίου του TCR ως βιοδείκτης ωφελεί στην παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας των ασθενών που υποβάλλονται σε ανοσοθεραπείες, καθώς επίσης προσφέρει πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι του όγκου (115,127).

### 1.3.3 Ο TCR ως βιοδείκτης της ανοσολογικής απόκρισης στην ακτινοθεραπεία

Έχει καταστεί σαφές ότι η ακτινοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει δυναμικές αλλαγές στο ρεπερτόριο του TCR, πιθανά μέσω της ειδικής αναγνώρισης σχετιζόμενων με τον όγκο πεπτιδίων (Tumor Associated Antigens, TAAs) από τα νεκρά καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα συστηματικές αποκρίσεις έναντι του όγκου. Τέτοιες αλλαγές στην κλωνική δυναμική του TCR που παρατηρούνται σε ασθενείς με καρκίνο είναι σύμφωνες με την εμφάνιση νέων κλωνότυπων TCR που δρουν έναντι του όγκου καθώς και με την επέκταση ειδικών TCR κλωνοτύπων έναντι του όγκου, η οποία επάγεται από την RT (131).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, εντοπίστηκε αυξημένη κλωνικότητα των T κυττάρων κατά την διάρκεια της RT και προκάλεσε έντονο ενδιαφέρον αυτή η σημαντική αλλαγή των κλωνότυπων του TCR. Αυτές οι παρατηρήσεις, ύστερα από ανάλυση δειγμάτων περιφερικού αίματος, τα οποία έδειξαν αυξημένες συχνότητες των 10 πρώτων κλωνότυπων TCR μετά την RT, οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η θεραπεία με ακτινοβολία ενισχύει την επέκταση των κλώνων των T κυττάρων που προορίζονται για την καταπολέμηση του όγκου, στο περιφερικό αίμα (132). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από την ανάλυση του TCR ρεπερτορίου στο αίμα ασθενών με καρκίνο προστάτη πριν και μετά από την ακτινοθεραπεία, με επιπλέον την εμφάνιση νέων TCR κλωνοτύπων σε υψηλές συχνότητες (133).

Η διερεύνηση των μεταβολών του TCR μετά από ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με NSCLC έδειξε μία ελάττωση στον αριθμό των μοναδικών TCR κλωνότυπων μετά την RT, αλλά η κλωνικότητα και η ποικιλομορφία κατά Shannon δεν άλλαξαν. Επιπλέον, σε τέσσερις ασθενείς που ανέπτυξαν μεταστάσεις εντός 7 μηνών είχε παρατηρηθεί χαμηλότερη ποικιλομορφία κατά Shannon μετά την RT συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάσταση (134).

### 1.3.3 Βιοδείκτες από την συνέργεια της ανοσοθεραπείας με ακτινοθεραπεία

Η εμφάνιση της ανοσοθεραπείας αποτελεί σταθμό στην θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου, ωστόσο ανταπόκριση στη θεραπεία έχουν ορισμένοι μόνο από τους ασθενείς και σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Η ερμηνεία των ανοσολογικών μηχανισμών που διαμεσολαβούν οι ανοσοθεραπείες θα οδηγήσει στην εύρεση προγνωστικών βιοδεικτών ανταπόκρισης και στη δημιουργία θεραπευτικών σχημάτων που θα βρίσκουν εφαρμογή στην πλειοψηφία των ασθενών. Οι ισχυρές αντικαρκινικές αποκρίσεις από την ανοσοθεραπεία, μέσω την ενεργοποίησης των αδρανοποιημένων T κυττάρων, σε συνδυασμό με τους ανοσοτροποποιητικούς μηχανισμούς της ανοσοθεραπείας έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν την αντικαρκινική δραστηριότητα και παράλληλα εξασθενούν την ανοσολογική ισχύ του όγκου (135). Με βάση αυτά τα δεδομένα, η συνέργεια της ανοσοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας φαίνεται πως συνδέεται με πιο ευνοϊκή πρόγνωση και συνολική επιβίωση.

Πιο συγκεκριμένα, η αποκατάσταση της αγγείωσης εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου έχει παρατηρηθεί με την συνδυαστική χορήγηση ακτινοθεραπείας με δύο ICIs, anti-PD-1 και anti-CTLA-4. Επιπλέον, από την συνέργεια αυτή, χαρακτηριστική είναι η ενίσχυση της ακτινο-ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων και της ικανότητας της ακτινοθεραπείας να προωθεί την αντικαρκινική ανοσία τροποποιώντας το μικροπεριβάλλον του όγκου. Για να επιτευχθεί όμως αυτό, δραστηριοποιείται ένα σύνολο κυττάρων του ανοσοποιητικού, τα CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, τα οποία παράγουν ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) και ενεργοποιούν ηωσινόφιλα παρουσία αυξημένων επιπέδων χημειοκινών (CCL5, CCL11) και ιντερλευκίνης-5 (IL-5). Συνεπώς, για την πρόβλεψη της αποκατάστασης της αγγείωσης εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, η συσσώρευση των CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> και ηωσινόφιλων T κυττάρων και ο συνδυασμός INF- $\gamma$ , CCL5, CCL11 και IL-5 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες (122,123,136).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Formenti και τους συνεργάτες του, αποδείχθηκε πως ασθενείς με NSCLC που έλαβαν συνδυασμένη θεραπεία RT και ICIs, χαρακτηρίστηκαν από παραγωγή INF- $\beta$  και πυροδότηση αντικαρκινικής απόκρισης των T κυττάρων (137). Από την ανάλυση της συχνότητας των κλώνων του TCR στο περιφερικό αίμα των ασθενών, φάνηκε πως μετά την RT επεκτάθηκαν σημαντικά οι κλώνοι των υποδοχέων σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην συνδυασμένη θεραπεία. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε σημαντικό εύρημα, καθώς οι μεταβολές του ρεπερτορίου του TCR πριν και μετά την RT αύξησαν την προγνωστική αξία για την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία σε σχέση με τους δείκτες.

Συνολικά, τέτοιες αλλαγές στο ρεπερτόριο του TCR μετά από την εκάστοτε θεραπεία έχουν τη δυνατότητα να χρησιμεύσουν ως αποτελεσματικοί βιοδείκτες εξέλιξης της νόσου και/ή ανταπόκρισης στη θεραπεία.

## Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μεταβλητής περιοχής της αλυσίδας β του υποδοχέα TCR (TCR Vβ) σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου σε δύο χρονικά σημεία: κατά την διάγνωση της νόσου και μετά το τέλος της εκάστοτε θεραπείας (χειρουργείο ή ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή συνδυασμός), με στόχο τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στην κλωνικότητα και την ποικιλομορφία του TCR ρεπερτορίου που επάγονται από τη θεραπεία, καθώς και της πιθανής εμφάνισης νέων TCR Vβ κλωνότυπων.

## Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Εμπορικά διαθέσιμα κιτ αντιδράσεων

Purelink® Genomic DNA Mini Kit, Thermofisher Scientific

Ion Torrent Oncomine™ Human Immune Repertoire, Thermofisher Scientific

dNTP Mix (25mM), Thermofisher Scientific

Agencourt™ AMPure™ XP Reagent, Beckman Coulter

Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit, Thermofisher Scientific

Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit-Chef, Thermofisher Scientific

Ion 530™ Chip Kit, Thermofisher Scientific

#### 2.1.2 Αναλώσιμα

Ακροφύσια για πιπέτες, Gilson

Βελόνες αιμοληψίας, BD Biosciences

Σύριγγες, BD Biosciences

Σωληνάρια με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), (BD Vacutainer Blood Collection Tubes), BD Biosciences

Σωληνάρια φυγοκέντρησης διαφόρων όγκων, BD Biosciences

MicroAmp™ Adhesive Films, Thermofisher Scientific

Πλάκες PCR 96 θέσεων, Thermofisher Scientific

MicroAmp™ Compression Pad, Thermofisher Scientific

MicroAmp™ Optical Reaction Plate, Thermofisher Scientific

#### 2.1.3 Όργανα- Συσκευές

Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Eppendorf 5410

Επωαστήρας (heatblock), Thermofisher Scientific

Αναδευτήρας με ρύθμιση θερμοκρασίας, Thermofisher Scientific

Πιπέτες, Gilson

Vortex Genie 2, Scientific Industries

DynaMag™-96 Side Magnet, Thermofisher Scientific

Ion Chef™, Thermofisher Scientific

GeneStudio™ S5, Thermofisher Scientific

#### 2.1.4 Λογισμικό

S5 Torrent Server VM, Thermofisher Scientific

Ion Reporter™ 5.16, Thermofisher Scientific

Graphpad Prism 8.0, GraphPad Software

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Ασθενείς και δείγματα

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν δώδεκα (12) ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου που υποβλήθηκαν σε κατάλληλη θεραπεία (χειρουργείο ή ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή συνδυασμός). Η μελέτη έχει υποβληθεί και εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Έρευνας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής και από την αντίστοιχη Επιτροπή του Γενικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας». Οι έρευνες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Πριν από τη συλλογή βιολογικού υλικού λήφθηκε γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες.

Για την διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος σε σωληνάρια με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ως αντιπηκτικό παράγοντα.

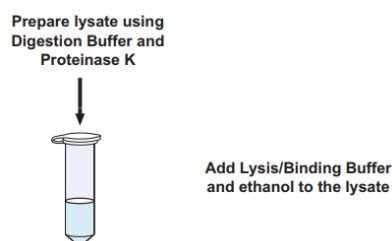


## 2.2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA

Για την διαδικασία απομόνωσης DNA χρησιμοποιείται το PureLink® Genomic DNA Mini Kit, το οποίο έχει σχεδιαστεί για την αποτελεσματική και γρήγορη απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, δείγματα αίματος, ιστούς FFPE (ιστός με σφράγιση με φορμόλη και παραφίνη) και άλλα είδη δειγμάτων, ωστόσο στην παρούσα μελέτη το kit χρησιμοποιείται για την απομόνωση DNA από ολικό αίμα. Με την χρήση των ειδικών αντιδραστηρίων, το DNA καθαρίζεται ταχέως χρησιμοποιώντας μία ειδική στήλη. Το απομονωμένο DNA έχει μέγεθος 20-50 kb και είναι κατάλληλο για PCR. Το πλήρες πρωτόκολλο περιγράφεται παρακάτω και είναι διαθέσιμο από το (138).

### 2.2.2.1 Λύση αίματος

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία για την απομόνωση του γενωμικού DNA, ρυθμίζεται ο αναδευτήρας-κλίβανος στους 55°C. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο προστίθενται 200 µL φρέσκου δείγματος αίματος. Σε αυτό προστίθενται 20 µL Proteinase K, η οποία συμβάλλει στην αποτελεσματική λύση ιστών και κυττάρων και 20 µL RNase A, η οποία αποδομεί το RNA που υπάρχει στο δείγμα ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα της επιμόλυνσης του καθαρισμένου δείγματος DNA. Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, συμπληρώνονται 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer αναδεύοντας καλά, ώστε να γίνει ένα ομοιογενές διάλυμα. Επωάζεται το διάλυμα στους 55°C για 10 λεπτά για την προώθηση της δράσης των ενζύμων. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 200 µL 96–100% αιθανόλης στο διάλυμα και αναδεύεται καλά, για να ομογενοποιηθεί (**Εικόνα 13**).



**Εικόνα 13. Προσθήκη αντιδραστηρίων για τη λύση του αίματος.**

### 2.2.2.2 Δέσμευση του DNA

Το διάλυμα (~640  $\mu\text{L}$ ) που παρασκευάστηκε στο προηγούμενο στάδιο μεταφέρεται σε στήλη PureLink® Spin Column και φυγοκεντρείται σε  $10,000 \times g$  για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 14).



Apply sample to a PureLink™ Spin Column

Απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής και τοποθετείται η στήλη περιστροφής σε καθαρό σωληνάριο PureLink® Collection Tube, που περιλαμβάνεται μέσα στο κιτ.

Εικόνα 14. Δέσμευση του DNA στη στήλη.

### 2.2.2.3 Καθαρισμός του απομονωμένου DNA

Πριν ξεκινήσουν οι καθαρισμοί, συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος αιθανόλης 96–100% στο PureLink® Genomic Wash Buffer 1 και στο PureLink® Genomic Wash Buffer 2, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται σε κάθε ετικέτα. Τα διαλύματα πλυσίματος αναδεύονται καλά, σημειώνεται στις ετικέτες τους η προσθήκη της αιθανόλης και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.



Wash the column with Wash Buffer 1



Wash the column with Wash Buffer 2

Εικόνα 15. Διαδοχικοί καθαρισμοί του DNA.

Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer 1 στην στήλη και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου στις  $10,000 \times g$  για 1 λεπτό. Απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής και τοποθετείται νέο σωληνάριο PureLink® Collection Tube (Εικόνα 15). Ακολουθεί το πλύσιμο με 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστο αριθμό στροφών ( $>16000 \times g$ ) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και έπειτα απορρίπτεται ξανά το σωληνάριο συλλογής (Εικόνα 15). Η στήλη φυγοκεντρείται ξανά για 1 λεπτό χωρίς κανένα διάλειμμα, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα αιθανόλης.

#### 2.2.2.4 Έκλυση του DNA

Η στήλη τοποθετείται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο 1.5-mL και προστίθενται στάγδην 30  $\mu$ L από το PureLink® Genomic Elution Buffer. Επωάζεται για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε μέγιστες στροφές για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (**Εικόνα 16**). Για την ανάκτηση περισσότερου DNA, επανατοποθετείται το διάλυμα έκλυσης από το σωληνάριο πίσω στην στήλη και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση σε μέγιστες στροφές. Τέλος, αφαιρείται και απορρίπτεται η στήλη και αποθηκεύεται το σωληνάριο εντός του οποίου περιέχεται το καθαρό DNA.



Elute DNA with  
Elution Buffer

**Εικόνα 16.** Έκλυση του απομονωμένου DNA.

#### 2.2.2.5 Αποθήκευση του DNA

Για την αποφυγή επανειλημμένης ψύξης και απόψυξης του καθαρού DNA, συστήνεται η αποθήκευση του DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μεταγενέστερες εφαρμογές.

#### 2.2.3 Προετοιμασία βιβλιοθηκών για την ανάλυση του TCR

Για την προετοιμασία των βιβλιοθηκών (libraries) DNA για την ενίσχυση των στόχων TCR  $\beta$  χρησιμοποιείται το Oncomine™ Human Immune Repertoire της Ion Torrent. Η δοκιμασία Oncomine™ TCR Beta-SR Assay, πάνω στην οποία βασίστηκε και η παρούσα μελέτη, είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), που μετρά με ακρίβεια την ποικιλομορφία του ρεπερτορίου των T κυττάρων και την κλωνική επέκταση σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων.

Η μέθοδος NGS αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά άλματα στις βιολογικές επιστήμες, δίνοντας την δυνατότητα στα εργαστήρια να εκτελούν πληθώρα εφαρμογών και να εμβαθύνουν σε βιολογικά συστήματα που δεν μπορούσαν να αναλυθούν εις βάθος έως τώρα. Η NGS είναι μία τεχνολογία αλληλούχισης που προσφέρει εξαιρετικά αυξημένη απόδοση και ταχύτητα, και βρίσκει εφαρμογή σε ποικίλους επιστημονικούς κλάδους, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, στη βοτανική, στη μικροβιολογία και στη γενετική. Είναι μία μέθοδος αλληλούχισης εκατομμυρίων βάσεων DNA και

χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών γονιδίων ή γονιδιακών περιοχών.

Επιπλέον, η μέθοδος NGS βρίσκει εφαρμογές και στην ογκολογία, προσφέροντας την δυνατότητα τα καρκινικά γονιδιώματα να μπορούν να μελετηθούν συστηματικά στο σύνολό τους. Το γεγονός αυτό παρέχει πολλά οφέλη, όπως στη σαφή διάγνωση της νόσου και την ακριβέστερη πρόγνωση της, στην ταξινόμηση της νόσου και δυνητικά τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε όγκους που μπορούν να στοχευθούν από φάρμακα ειδικά για τις μεταλλάξεις αυτές. Συνεπώς, η αποκρυπτογράφηση της αλληλουχίας των καρκινικών όγκων για κάθε άτομο μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την εξατομικευμένη διαχείρισή του.

#### 2.2.3.1 Προετοιμασία της αντίδρασης για την ενίσχυση του στόχου

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, το πρώτο βήμα πριν ξεκινήσει η κατασκευή των βιβλιοθηκών είναι να τοποθετηθεί μια πλάκα PCR 96 θέσεων σε μία παγωμένη βάση ή στον πάγο, ενώ παράλληλα προετοιμάζεται η αραιώση του μίγματος των διφωσφορικών νουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide Triphosphates, dNTP) (25 mM) ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 7.5 mM. Για αυτήν την διαδικασία προστίθενται τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον **Πίνακα 2** σε αποστειρωμένο σωληνάριο, το οποίο κλείνεται καλά και αναδεύεται.

**Πίνακας 2. Παρασκευή του μίγματος των διφωσφορικών νουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide Triphosphates, dNTP) 7.5 μM.**

Αντιδραστήριο	Όγκοι
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	14 μL
dNTP Mix (25 mM)	6 μL
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 μL</b>

Έπειτα, αποψύχεται σταδιακά στον πάγο το 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix στον πάγο εφόσον έχει γίνει ήπια ανάδευση και φυγοκέντρωση. Σε κάθε δείγμα προστίθενται οι αντίστοιχοι όγκοι των αντιδραστηρίων που αναγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα 3**. Για πολλαπλές χρήσεις, παρασκευάζεται ένα Master Mix με τους όγκους των αντιδραστηρίων πολλαπλασιασμένους επί τον αριθμό των δειγμάτων.

**Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που προστίθενται για την ενίσχυση της αλληλουχίας της β αλυσίδας του TCR υποδοχέα.**

Αντιδραστήριο	Όγκοι
gDNA (200 ng)	X μL
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4 μL
5X Oncomine™ TCR Beta-SR Panel	4 μL
dNTP Mix (7.5 mM που προετοιμάσαμε στο προηγούμενος)	2 μL
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	10 – X μL
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 μL</b>

Σφραγίζεται η πλάκα με αυτοκόλλητη μεμβράνη MicroAmp™ Adhesive Film, αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται ώστε να συλλεχθούν πιθανόν οι σταγόνες που έχουν μένει στα τοιχώματα του σωληναρίου. Εναλλακτικά, πριν καλυφθεί η πλάκα από τη μεμβράνη είναι δυνατόν να γίνει ήπια ανάδευση με την χρήση της πιπέτας. Ακολουθεί η PCR, προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές στόχοι, με τους θερμικούς κύκλους που ορίζει το ακόλουθο πρωτόκολλο (**Πίνακας 4**).

**Πίνακας 4. Πρωτόκολλο PCR για την ενίσχυση του στόχου.**

Στάδιο	Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αναμονή	Δράση του ενζύμου	95°C	2 λεπτά
25 κύκλοι	Αποδιάταξη DNA	95°C	30 δεύτερα
	Υβριδισμός των εκκινητών	60°C	45 δεύτερα
	Επιμήκυνση των εκκινητών	72°C	45 δεύτερα
Αναμονή	Τελική επέκταση	72°C	10 λεπτά
Αναμονή	-	10°C	Έως 1 ώρα

Μετά το πέρας των θερμικών κύκλων, αφαιρείται η πλάκα από τον θερμικό κυκλοποιητή. Στο σημείο αυτό, ο κατασκευαστής δίνει την δυνατότητα παύσης της διεργασίας και αποθήκευση της αντίδρασης εντός του θερμικού κυκλοποιητή στους 10°C για έως 1 ώρα, είτε στους -20°C για μεγαλύτερο διάστημα.

### 2.2.3.2 Μερική πέψη των αμπλικονίων

Σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο FuPa για να πραγματοποιηθεί η πέψη των εκκινητών, το οποίο πριν χρησιμοποιηθεί αναδεύεται και φυγοκεντρείται σύντομα. Όσο προετοιμάζεται η αντίδραση, τα δείγματα συντηρούνται στον πάγο και προστίθενται σε κάθε ένα από αυτά 2  $\mu\text{L}$  του αντιδραστηρίου FuPa. Έπειτα, γίνεται καλή ανάδευση του μίγματος και σύντομη φυγοκέντρωση. Επαναποθετούνται τα δείγματα στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελείται το πρόγραμμα που αναφέρεται στον **Πίνακα 5**.

**Πίνακας 5. Πρωτόκολλο μερικής πέψης των αμπλικονίων στον θερμικό κυκλοποιητή.**

Θερμοκρασία	Χρόνος
50°C	10 λεπτά
55°C	10 λεπτά
60°C	20 λεπτά
10°C	Αναμονή (μέχρι 1 ώρα)

### 2.2.3.3 Σύνδεση αμπλικονίων με τους αντάπτορες και καθαρισμός

Σε αυτό το στάδιο τα αντιδραστήρια αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, αναδεύονται καλά και φυγοκεντρώνονται ήπια πριν την χρήση τους για την διάσπαση ιζήματος που πιθανόν να έχει δημιουργηθεί κατά την απόψυξη τους. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το Switch Solution, το Ion Torrent™ Dual Barcode Kit 1–96 adapters και DNA Ligase. Με την χρήση του ενζύμου επιτυγχάνεται η σύνδεση των προσαρμογέων (adapters) και των κωδικών ιχνηλασιμότητας (barcodes), οι ποσότητες των οποίων αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 6**).

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, κατά την χρήση του Ion Torrent™ Dual Barcode Kit 1–96 adapters, για την αποφυγή επιμόλυνσης πρέπει να αφαιρείται η μεμβράνη μόνο από τα πηγάδια που έχουν χρησιμοποιηθεί, τα οποία είναι μιας και μόνο χρήσης.

**Πίνακας 6. Αντιδραστήρια που προστίθενται για τη σύνδεση των ανταπτόρων στα αμπλικόνια.**

Σειρά προσθήκης	Αντιδραστήριο	Όγκος
1	Switch Solution	4 $\mu$ L
2	Ion Torrent™ Dual Barcode Kit 1–96 adapters	2 $\mu$ L
3	DNA Ligase	2 $\mu$ L
-	<b>Συνολικός όγκος</b> (συμπεριλαμβανομένου ~22 $\mu$ L των αμπλικονίων)	<b>~30 <math>\mu</math>L</b>

Καλύπτεται η πλάκα με νέα αυτοκόλλητη μεμβράνη MicroAmp™ Adhesive Film, ακολουθεί ανάδευση και ήπια φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Έπειτα τοποθετείται ένα MicroAmp™ Compression Pad στην πλάκα και ρυθμίζεται ο θερμικός κυκλοποιητής στο εξής πρόγραμμα (**Πίνακας 7**).

**Πίνακας 7. Πρωτόκολλο σύνδεσης αμπλικονίων με τους ανάπτορες στον θερμικό κυκλοποιητή.**

Θερμοκρασία	Χρόνος
22°C	30 δεύτερα
68°C	5 λεπτά
72°C	5 λεπτά
10°C	Αναμονή (μέχρι και 1 ώρα)

Σε αυτό το σημείο μπορεί να διακοπεί η αντίδραση και τα δείγματα να αποθηκευτούν στους -20°C ή να προχωρήσει απευθείας στο επόμενο στάδιο που είναι ο καθαρισμός των βιβλιοθηκών.

#### 2.2.3.4 Καθαρισμός βιβλιοθήκης

Πρωτίστως, αφαιρείται από το ψυγείο το Agencourt™ AMPure™ XP Reagent πριν από την χρήση του, ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται καλά προκειμένου να διασπαστούν τα σφαιρίδια. Προετοιμάζεται διάλυμα αιθανόλης 70%, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω στο στάδιο με τα πλυσίματα, υπολογίζοντας ότι για κάθε δείγμα αναλογούν 350  $\mu$ L αιθανόλης.

Φυγοκεντρείται ελαφρώς η πλάκα με τα δείγματα και ξεσφραγίζεται προσεκτικά. Σε κάθε βιβλιοθήκη προστίθενται 45 µL Agencourt™ AMPure™ XP Reagent. Αναδεύεται το εναιώρημα με τα σφαιρίδια με το DNA μέχρι να γίνει ένα ομοιογενές μίγμα. Αφήνεται για επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα μεταφέρεται η πλάκα στον μαγνήτη DynaMag™-96 Side Magnet για 2 λεπτά ή μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, χωρίς να διαταραχθούν τα σφαιρίδια που έχουν προσκολληθεί στον μαγνήτη, και απορρίπτεται. Έπειτα, προστίθενται 150 µL φρέσκα παρασκευασμένης αιθανόλης 70% και, στη συνέχεια μετατοπίζεται η πλάκα από πλευρά σε πλευρά στις δύο θέσεις του μαγνήτη για να πλυθούν τα σφαιρίδια. Αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο και απορρίπτεται, διατηρώντας τα σφαιρίδια. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Εφόσον έχει απορριφθεί όλη η ποσότητα αιθανόλης, αφήνεται η πλάκα στον μαγνήτη για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία για να στεγνώσουν τα σφαιρίδια, χωρίς να υπερξηρανθούν. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται σε αυτό το στάδιο, καθώς η εναπομένουσα αιθανόλη μπορεί να αναστείλει την ενίσχυση της βιβλιοθήκης.

#### 2.2.3.5 Ενίσχυση των παρασκευασμένων βιβλιοθηκών

Αυτό το στάδιο είναι προαιρετικό και εκτελείται σε περιπτώσεις όπου η ποιότητα ή η ποσότητα του αρχικού υλικού είναι αμφισβητήσιμη. Η ενίσχυση των καθαρισμένων βιβλιοθηκών μπορεί να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά τον καθαρισμό, πριν από την έκλουσή τους από τα σφαιρίδια Agencourt™ AMPure™ XP. Σε αυτή τη διαδικασία εκλούεται η βιβλιοθήκη απευθείας σε μίγμα ενίσχυσης και στη συνέχεια εκτελούνται 5-9 θερμικοί κύκλοι ενίσχυσης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της βιβλιοθήκης αναγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα 8**.

**Πίνακας 8. Αντιδραστήρια που προστίθενται για την ενίσχυση των βιβλιοθηκών.**

Αντιδραστήριο	Όγκος
1X Library Amp Mix	50 µL
25X Library Amp Primers	2 µL
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>52 µL</b>

Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση της πλάκας και τοποθέτηση αυτής στο μαγνήτη για 2 λεπτά. Έπειτα, μεταφέρονται περίπου 50µL από το υπερκείμενο σε νέα



πλάκα, η οποία σφραγίζεται με MicroAmp™ Adhesive Film και εκτελείται PCR με τους παρακάτω θερμοκούς κύκλους (**Πίνακας 9**).

**Πίνακας 9. Πρωτόκολλο PCR για την ενίσχυση των παρασκευασμένων βιβλιοθηκών.**

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αναμονή	98°C	2 λεπτά
5 κύκλοι*	98°C	15 δεύτερα
	64°C	1 λεπτό
Αναμονή	10°C	Αναμονή

\*Οι 5 κύκλοι είναι επαρκείς, ωστόσο ο κατασκευαστής προτείνει πως μπορούν να εκτελεστούν έως και 9 κύκλοι ενίσχυσης της βιβλιοθήκης.

#### 2.2.3.6 Καθαρισμός των ενισχυμένων βιβλιοθηκών

Σε αυτό το στάδιο, προετοιμάζονται δύο κύκλοι καθαρισμών της βιβλιοθήκης με το αντιδραστήριο Agencourt™ AMPure™ XP Reagent, το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για όσο διαρκεί η διαδικασία και αναδεύεται καλά πριν από τη χρήση του.

##### *Πρώτος γύρος καθαρισμού*

Ξεσφραγίζεται η πλάκα, εφόσον έχει φυγοκεντρηθεί, για να συλλεχθεί όλη η ποσότητα του δείγματος στον πυθμένα των πηγαδιών, και προστίθενται 25 µL (0.5X του όγκου του δείγματος) από το Agencourt™ AMPure™ XP Reagent σε κάθε πηγάδι. Αναμειγνύεται το εναιώρημα των σφαιριδίων με το DNA με πιπέτα, ώστε να γίνει ομοιογενές το μίγμα. Επωάζεται το μίγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα τοποθετείται η πλάκα στον μαγνήτη DynaMag™-96 Side Magnet για 5 λεπτά ή έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Προσεκτικά μεταφέρεται το υπερκείμενο, που περιέχει τα επιθυμητά αμπλικόνια, σε νέα πλάκα 96-well PCR plate.

##### *Δεύτερος γύρος καθαρισμού*

Στο υπερκείμενο που έχει μεταφερθεί στην καινούρια πλάκα προστίθενται σε κάθε δείγμα 60 µL (1.2X του όγκου του δείγματος) από το Agencourt™ AMPure™ XP Reagent. Με πιπέτα αναμειγνύεται το εναιώρημα των σφαιριδίων με το DNA και αφήνεται το μίγμα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τοποθετείται η πλάκα στον μαγνήτη για 3 λεπτά ή μέχρι να καθαρίσει το διάλυμα. Προσεκτικά,

αφαιρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο χωρίς για διαταραχθούν τα σφαιρίδια, στα οποία είναι δεσμευμένα τα αμπλικόνια. Στη συνέχεια, σε κάθε πηγάδι που περιέχονται τα σφαιρίδια προστίθενται 150  $\mu\text{L}$  φρέσκα παρασκευασμένης αιθανόλης 70% και μετατοπίζεται η πλάκα από πλευρά σε πλευρά στις δύο θέσεις του μαγνήτη για να πλυθούν τα σφαιρίδια. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά το πλύσιμο με την αιθανόλη διατηρώντας τα σφαιρίδια. Εφόσον έχει απορριφθεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης από τα πηγάδια αφήνεται η πλάκα στον μαγνήτη για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν τα σφαιρίδια, χωρίς να υπερξηρανθούν.

#### 2.2.3.7 Έκλουση της βιβλιοθήκης

Αφαιρείται η πλάκα με τις καθαρισμένες βιβλιοθήκες από τον μαγνήτη και προστίθενται 50 $\mu\text{L}$  διάλυμα έκλουσης Low TE 1X, το οποίο αναμιγνύεται με τα σφαιρίδια. Η πλάκα σφραγίζεται με MicroAmp™ Clear Adhesive Film, αναδεύεται και φυγοκεντρείται σύντομα. Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και έπειτα τοποθετείται στον μαγνήτη για άλλα 2 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις βιβλιοθήκες, σε καθαρό σωληνάριο και απορρίπτονται τα σφαιρίδια.

#### 2.2.3.8 Ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών

Για την ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών πραγματοποιείται μία σειρά διαδοχικών αραιώσεων, δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσης που αναμένεται ότι έχει το τελικό απομονωμένο DNA. Αρχικά, προετοιμάζεται αραιώση 1:100 προσθέτοντας 2  $\mu\text{L}$  υπερκείμενου υγρού, που περιέχει τη βιβλιοθήκη, και στη συνέχεια 198  $\mu\text{L}$  νερού ελεύθερου νουκλεασών. Στην περίπτωση που έχει εκτελεσθεί το προαιρετικό στάδιο ενίσχυσης των βιβλιοθηκών προετοιμάζεται αραιώση 1:10.000, προσθέτοντας 2  $\mu\text{L}$  της αραιώσης 1:100 και στη συνέχεια, 198  $\mu\text{L}$  νερού ελεύθερου νουκλεασών. Έπειτα, προετοιμάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Οι όγκοι που αναφέρονται παρακάτω αντιστοιχούν ανά δείγμα (**Πίνακας 10**).

**Πίνακας 10. Μίγμα των αντιδραστηρίων για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.**

Αντιδραστήριο	Όγκος
Ion Library qPCR Master Mix	10 $\mu$ L
Ion Library TaqMan™ Quantitation Assay	1 $\mu$ L
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>11 <math>\mu</math>L</b>

Για τη διαδικασία της ποσοτικοποίησης προετοιμάζονται 3 πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και ένας αρνητικός μάρτυρας. Σε μία πλάκα MicroAmp™ Optical Reaction Plate τοποθετείται σε κάθε ένα πηγάδι το PCR Reaction Mix και τα δείγματα στους παρακάτω όγκους (**Πίνακας 11**).

**Πίνακας 11. Αντιδραστήρια για την ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών.**

Συστατικά	Όγκος
PCR Reaction Mix	11 $\mu$ L
Αραιωμένο δείγμα (1:100 ή 1:10.000)	9 $\mu$ L

Σφραγίζεται η πλάκα με MicroAmp™ Optical Adhesive Film, έπειτα αναδεύεται και φυγοκεντρείται σύντομα. Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το πρόγραμμα της ποσοτικής PCR (quantitative PCR, qPCR), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (**Πίνακας 12**).

**Πίνακας 12. Πρωτόκολλο ποσοτικής PCR για την ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών.**

Αντίδραση	Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
96-well Standard	Αναμονή (επώαση)	50°C	2 λεπτά
	Αναμονή (δράση πολυμεράσης)	95°C	2 λεπτά
	40 κύκλοι	95°C	15 δεύτερα
		60°C	1 λεπτό

Μετά την ολοκλήρωση της qPCR, υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος πολλαπλασιάζοντας την τιμή που αναγράφεται επί την αραιώση. Με βάση την τελική

συγκέντρωση κάθε βιβλιοθήκης, προσδιορίζεται η αραίωση που οδηγεί σε συγκέντρωση ~25 pM.

Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες συνδυάζονται, ενώ η προετοιμασία του προτύπου και η φόρτωση των βιβλιοθηκών στο chip πραγματοποιείται στο σύστημα Ion Chef™. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται το Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit-Chef και το Ion 530™ Chip Kit, ενώ ο προγραμματισμός του συστήματος Ion Chef™ γίνεται ηλεκτρονικά, μέσω του S5 Torrent Server VM. Η αλληλούχιση των βιβλιοθηκών πραγματοποιείται στο σύστημα GeneStudio™ S5 και η επακόλουθη ανάλυση του TCR ρεπερτορίου γίνεται χρησιμοποιώντας το λογισμικό Ion Reporter™ 5.16. Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με το λογισμικό Graphpad Prism 8.0.

## Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Βασικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν δώδεκα (12) ασθενείς με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου που υποβλήθηκαν σε κατάλληλη θεραπεία (χειρουργείο ή ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή συνδυασμός). Πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος από τους ασθενείς σε δύο χρονικά σημεία, το πρώτο κατά την αρχική διάγνωση της νόσου και το δεύτερο μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας τους. Τα συνολικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 13**.

**Πίνακας 13.** Σύνοψη κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών της θεραπείας του συνόλου των ασθενών της μελέτης.

Χαρακτηριστικό	Τιμή
<b>Διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση, χρόνια (εύρος)</b>	62.5 (34-86)
<b>Εντόπιση όγκου (n, αριθμός ασθενών)</b>	
Λάρυγγας	4
Στοματοφάρυγγας	2
Γλώσσα	1
Παρωτίδα	1
Υποφάρυγγας	1
Αμυγδαλές	1
N/A	2
<b>Σταδιοποίηση (T στάδιο) (n, αριθμός ασθενών)</b>	
T1	2
T2	4
N/A	6
<b>Είδος θεραπείας (n, αριθμός ασθενών)</b>	
Χειρουργείο	5
Σύγχρονη CRT	4
Χειρουργείο με σύγχρονη CRT	3

CRT, χημειο/ακτινο-θεραπεία; N/A, δεν αναφέρεται.

Ειδικότερα, η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση ήταν τα 62.5 έτη, με διακύμανση από τα 34 έως τα 86 έτη. Από το σύνολο των ασθενών, 4 διαγνώστηκαν με καρκίνο στον λάρυγγα, 2 στον στοματοφάρυγγα, και από 1 ασθενής με όγκο στη γλώσσα, την παρωτίδα, τον υποφάρυγγα ή τις αμυγδαλές. Για 2 ασθενείς δεν ήταν διαθέσιμη η ακριβής εντόπιση της κακοήθειας. Αναφορικά με την σταδιοποίηση κατά

T, 2 ασθενείς είχαν T1 όγκους, 4 είχαν T2 όγκους, ενώ για τους υπόλοιπους ασθενείς δεν ήταν διαθέσιμα τα στοιχεία της σταδιοποίησης. Τέλος, σχετικά με το είδος της θεραπείας, 5 ασθενείς υπεβλήθησαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου, 4 ασθενείς έλαβαν σύγχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία και 3 ασθενείς υπεβλήθησαν σε χειρουργείο και σύγχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία. Αναλυτικά, τα επιμέρους στοιχεία για κάθε ασθενή ξεχωριστά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14**.

**Πίνακας 14.** Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά θεραπείας ανά ασθενή της μελέτης.

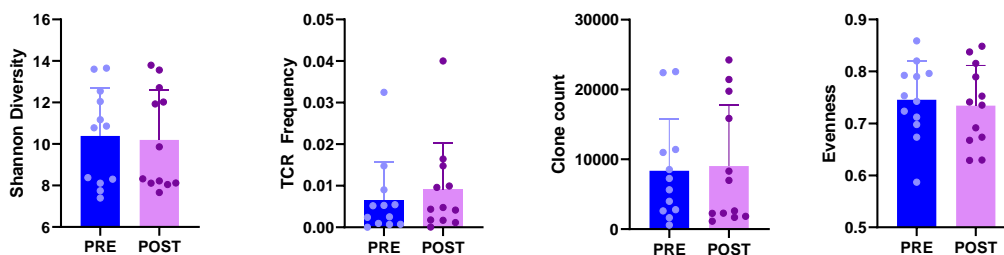
Κωδικός ασθενούς	Ηλικία (έτη)	Εντόπιση όγκου	Σταδιοποίηση (TNM)	Είδος Θεραπείας
BK 1	82	Λάρυγγας	N/A	Χειρουργείο
BK 5	62	Στοματοφάρυγγας	T2N0M0	Σύγχρονη CRT
BK 6	86	Λάρυγγας	N/A	Χειρουργείο
BK 12	N/A	N/A	N/A	Χειρουργείο
BK 18	63	Γλώσσα	T1N0M0	Χειρουργείο
BK 25	N/A	Παρωτίδα	N/A	Χειρουργείο και σύγχρονη CRT
BK 26	34	N/A	N/A	Χειρουργείο
BK 28	59	Υποφάρυγγας	T2N1M0	CRT
BK 33	86	Φωνητικές χορδές/ Λάρυγγας	T2N0M0	Χειρουργείο και σύγχρονη CRT
BK 38	57	Φωνητικές χορδές/ Λάρυγγας	N/A	N/A
BK 39	43	Αμυγδαλές	pT1N1Mx	Χειρουργείο και σύγχρονη CRT
BK 40	66	Στοματοφάρυγγας/ Υπερώα	T2N2aMx	CRT

TNM, Όγκος/ Λεμφαδένες/ Μεταστάσεις; CRT, χημειο/ακτινο- θεραπεία; N/A, δεν αναφέρεται.

### 3.2 Ανάλυση του ρεπερτορίου TCR Vβ για το σύνολο των ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία

Οι μεταβολές του ρεπερτορίου του TCR Vβ στο αίμα των 12 ασθενών της μελέτης μετά τη θεραπεία αναλύθηκαν με χρήση της μεθόδου NGS και των κατάλληλων αντιδραστηρίων και πρωτοκόλλων. Η επεξεργασία και η σύγκριση των αποτελεσμάτων πριν και μετά την χορήγηση θεραπείας έγινε με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 8. Στα γραφήματα που ακολουθούν (**Εικόνα 17**) αναλύονται οι ακόλουθοι παράμετροι: ποικιλομορφία κατά Shannon (Shannon Diversity), η συχνότητα των κλωνότυπων TCR (TCR Frequency), ο αριθμός των κλωνότυπων (Clone count) και η ομοιομορφία μεγέθους των κλωνότυπων (Evenness). Με τον όρο ποικιλομορφία κατά Shannon περιγράφεται η ποικιλομορφία των ταυτοποιημένων κλωνότυπων στο σύνολο των δειγμάτων. Από την άλλη, η ομοιομορφία μεγέθους των κλωνότυπων αποτελεί μέτρο της ομοιογένειας των ταυτοποιημένων κλωνότυπων TCR στο σύνολο των δειγμάτων. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των μεταβολών του TCR ρεπερτορίου στο σύνολο των ασθενών μεταξύ των δύο χρονικών σημείων χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Wilcoxon paired t-test με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI), από την οποία φάνηκε πως δεν υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές στο ρεπερτόριο του TCR πριν και μετά τη θεραπεία στους ασθενείς με ΚΚΤ της μελέτης.

Ειδικότερα, η ποικιλομορφία των κλωνότυπων παρέμεινε ουσιαστικά αμετάβλητη (Μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση πριν τη θεραπεία:  $10,38 \pm 2,314$  και μετά τη θεραπεία:  $10,20 \pm 2,414$ ), η συχνότητα εμφάνισης των κλωνότυπων αυξήθηκε ελαφρά (Μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση πριν τη θεραπεία:  $0,0066 \pm 0,0091$  και μετά τη θεραπεία:  $0,0090 \pm 0,011$ ), ο αριθμός των κλωνότυπων επίσης παρουσίασε μικρή αύξηση (Μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση πριν τη θεραπεία:  $8366 \pm 7464$  και μετά τη θεραπεία:  $9033 \pm 8805$ ) και τέλος, δεν παρατηρήθηκε ετερογένεια στο μέγεθος των κλωνότυπων (Μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση πριν τη θεραπεία:  $0,7456 \pm 0,073$  και μετά τη θεραπεία:  $0,7343 \pm 0,07730$ ).

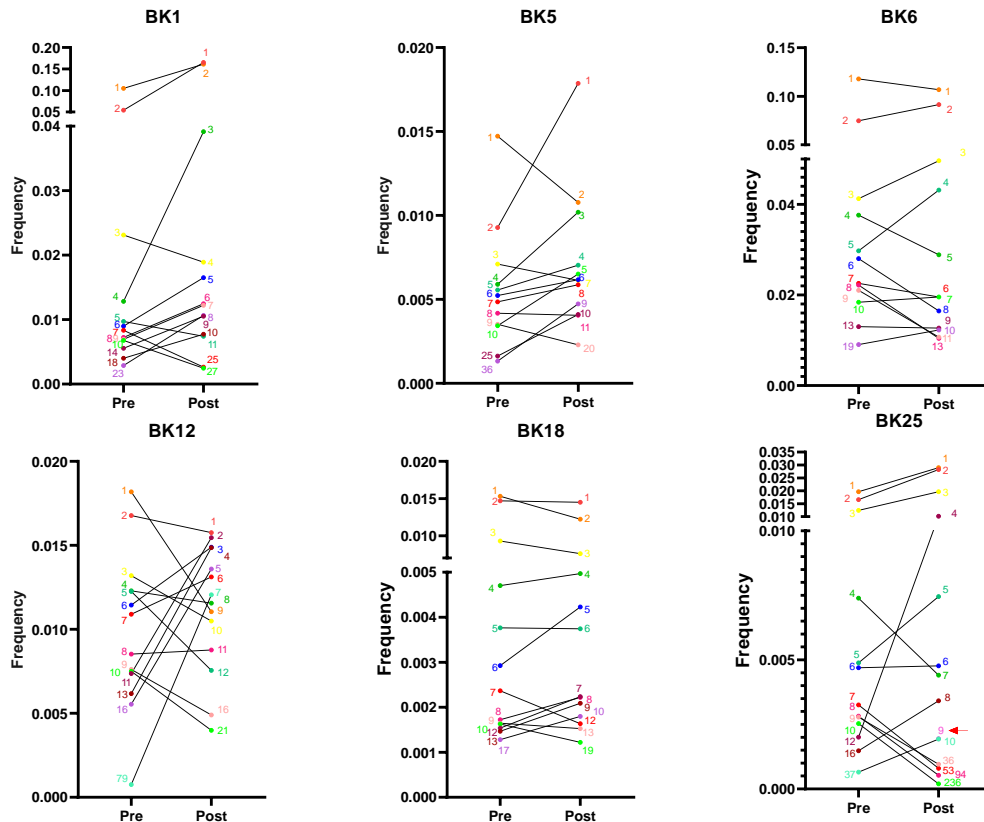


**Εικόνα 17. Στατιστική ανάλυση των μεταβολών του TCR ρεπερτορίου στο σύνολο των ασθενών πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας.** Σε όλα τα γραφήματα αναλύονται τα αποτελέσματα των ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία (οριζόντιος άξονας) ως προς τις αντίστοιχες παραμέτρους του TCR ρεπερτορίου (κάθετος άξονας). Η μπλε στήλη (PRE) αντιστοιχεί στα αποτελέσματα πριν τη θεραπεία και η μωβ (POST) στα αποτελέσματα μετά τη θεραπεία. Εξετάζονται οι ακόλουθες παράμετροι: στο πρώτο γράφημα, η ποικιλομορφία των κλωνότυπων (*Shannon Diversity*), η συχνότητα εμφάνισης των κλωνότυπων (*TCR Frequency*) στο δεύτερο γράφημα, ο αριθμός των κλωνότυπων (*Clone count*) στο τρίτο γράφημα και στο τέταρτο η ετερογένεια του μεγέθους των κλωνότυπων (*Evenness*). Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών (*Mean*) ± τυπική απόκλιση (*Standard Deviation, SD*) για το σύνολο των ασθενών στα δύο χρονικά σημεία της μελέτης. Το *Shannon Diversity* πριν τη θεραπεία ήταν  $10,38 \pm 2,314$  και μετά τη θεραπεία ήταν  $10,20 \pm 2,414$ , το *TCR frequency*  $0,0066 \pm 0,0091$  και  $0,0090 \pm 0,011$ , αντίστοιχα. Το *Clone count* πριν τη θεραπεία ήταν  $8366 \pm 7464$  και μετά τη θεραπεία ήταν  $9033 \pm 8805$  και το *Evenness* ήταν  $0,7456 \pm 0,073$  και  $0,7343 \pm 0,07730$ , αντίστοιχα. Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο χρονικών σημείων.

### 3.3 Ανάλυση των 10 πιο συχνών κλωνότυπων ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία

Στα δείγματα περιφερικού αίματος των 12 ασθενών με ΚΚΤ της μελέτης, αναλύθηκε επίσης η συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων TCR κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι 10 πιο συχνοί κλωνότυποι βάσει των συνδυασμών του V γονιδίου (TCR Beta V gene, TRBV) και του J γονιδίου (TCR Beta J gene, TRBVJ) και ειδικότερα, βάσει της αλληλουχίας της CDR3 περιοχής, σε κάθε ασθενή στα δύο χρονικά σημεία και εντοπίστηκαν σημαντικές μεταβολές στην κατάταξη αυτών, πριν και μετά τη θεραπεία (**Εικόνα 18** και **Εικόνα 19**).



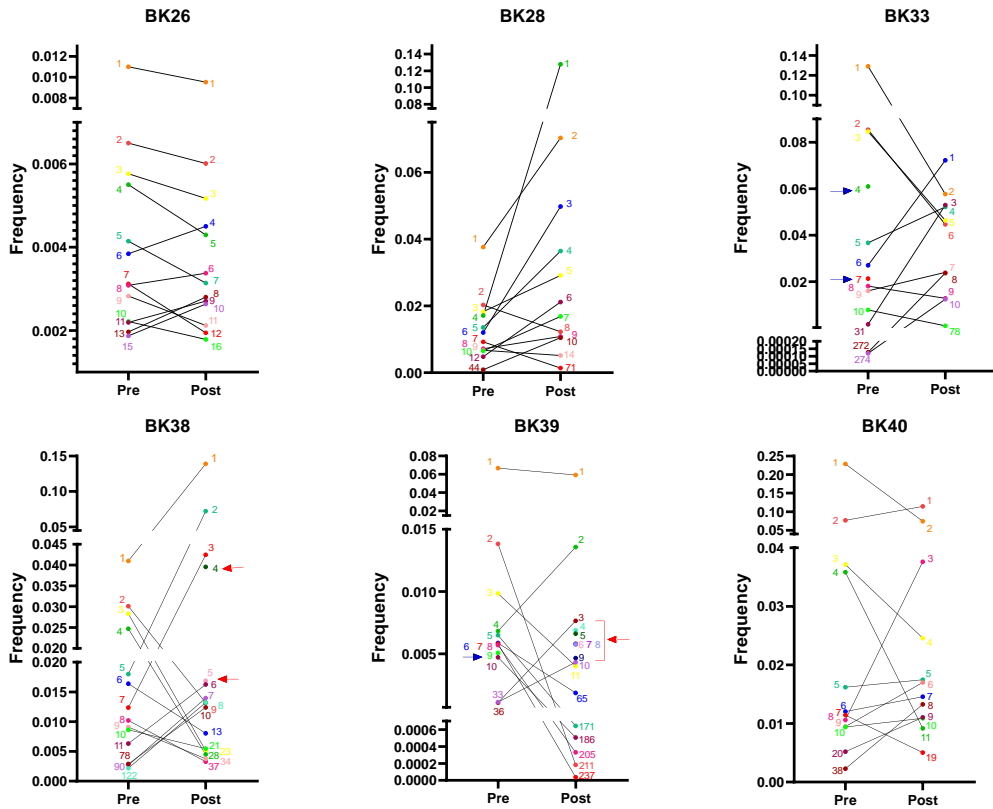


**Εικόνα 18.** Οι αλλαγές στην σειρά κατάταξης των TCR κλωνότυπων των 6 πρώτων ασθενών ως προς την συχνότητα. Τα παραπάνω γραφήματα έχουν δημιουργηθεί με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8. Παρουσιάζονται οι μεταβολές στην σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών TCR κλωνότυπων στους 6 από τους 12 ασθενείς (BK1, BK5, BK6, BK12, BK18 και BK25) με βάση την συχνότητα εμφάνισής τους (κάθετος άξονας) πριν και μετά την λήψη θεραπείας (PRE και POST, αντίστοιχα, οριζόντιος άξονας). Αριστερά σε κάθε διάγραμμα βρίσκονται σε σειρά κατάταξης οι κλωνότυποι βάσει των διαφορετικών CDR3 περιοχών πριν τη θεραπεία και στα δεξιά οι αντίστοιχοι κλωνότυποι μετά από αυτήν. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό κλωνότυπο με ξεχωριστό χρώμα, οι κοινοί κλωνότυποι πριν και μετά τη θεραπεία εμφανίζονται με το ίδιο χρώμα. Εκτός από τις μεταβολές στην σειρά κατάταξης των κλωνότυπων, εντοπίζονται και νέοι κλωνότυποι που εμφανίζονται μετά την χορήγηση θεραπείας. Αυτοί οι κλωνότυποι έχουν επισημανθεί με κόκκινο βέλος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σε αυτά τα γραφήματα αποτελεί ο ασθενής BK25, στον οποίο έχει εμφανιστεί ένας καινούργιος κλωνότυπος, που δεν υπήρχε πριν τη θεραπεία, και εντάσσεται εντός της πρώτης δεκάδας των πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία, και πιο συγκεκριμένα στην 9<sup>η</sup> θέση.

Το πιο εντυπωσιακό είναι πως ορισμένοι κλωνότυποι που εντάσσονταν στην πρώτη δεκάδα των πιο συχνών κλωνότυπων πριν την χορήγηση θεραπείας εξαφανίστηκαν μετά από αυτήν. Τέτοια παραδείγματα είναι ο ασθενής BK33, στον οποίο παρατηρήθηκε απώλεια των κλωνότυπων που βρίσκονταν στην 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> θέση

πριν από τη θεραπεία, και ο ασθενής BK39, με τον κλωνότυπο που βρισκόταν αρχικά στην 9<sup>η</sup> θέση κατάταξης με βάση τη συχνότητα να χάνεται μετά τη θεραπεία (**Εικόνα 19**).

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παρατήρηση ότι εκτός από την απώλεια κλωνότυπων μετά την λήψη θεραπείας εντοπίστηκε και η εμφάνιση νέων κλωνότυπων σε αυξημένη συχνότητα, οι οποίοι εισήλθαν εντός της πρώτης δεκάδας των συχνότερων κλωνότυπων (**Εικόνα 18 και Εικόνα 19**). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ασθενείς BK25, BK38 και BK39. Πιο αναλυτικά, στον ασθενή BK25 στην 9<sup>η</sup> θέση εμφανίζεται ένας νέος κλωνότυπος που δεν προϋπήρχε, στον ασθενή BK38 στην 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> θέση εντάσσονται οι καινούριοι κλωνότυποι, εξίσου και στον ασθενή BK39 την 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 8<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> θέση καταλαμβάνουν νέοι κλωνότυποι. Επιπλέον, στα διαγράμματα που παρουσιάζονται φαίνονται και οι μεταβολές στην κατάταξη της συχνότητας που εμφανίζονται οι κλωνότυποι στα δύο χρονικά σημεία. Φαίνεται πως σε αρκετές περιπτώσεις, κλωνότυποι που είχαν θέση εντός της πρώτης δεκάδας πριν τη θεραπεία, μετά από αυτήν εμφανίζονταν με μειωμένη συχνότητα, επομένως χαμηλά στην κατάταξη. Ωστόσο συμβαίνει και το αντίθετο, κλωνότυποι μετά τη θεραπεία να παρουσιάζονται σε αυξημένη συχνότητα και να εντάσσονται στους 10 πιο συχνούς κλωνότυπους, ενώ αρχικά βρίσκονταν αρκετά χαμηλότερα σε συχνότητα. Αναλυτικά, οι μεταβολές στους 10 πιο συχνούς κλωνότυπους πριν και μετά τη θεραπεία για κάθε ασθενή παρουσιάζονται στο Παράρτημα της παρούσας εργασίας.

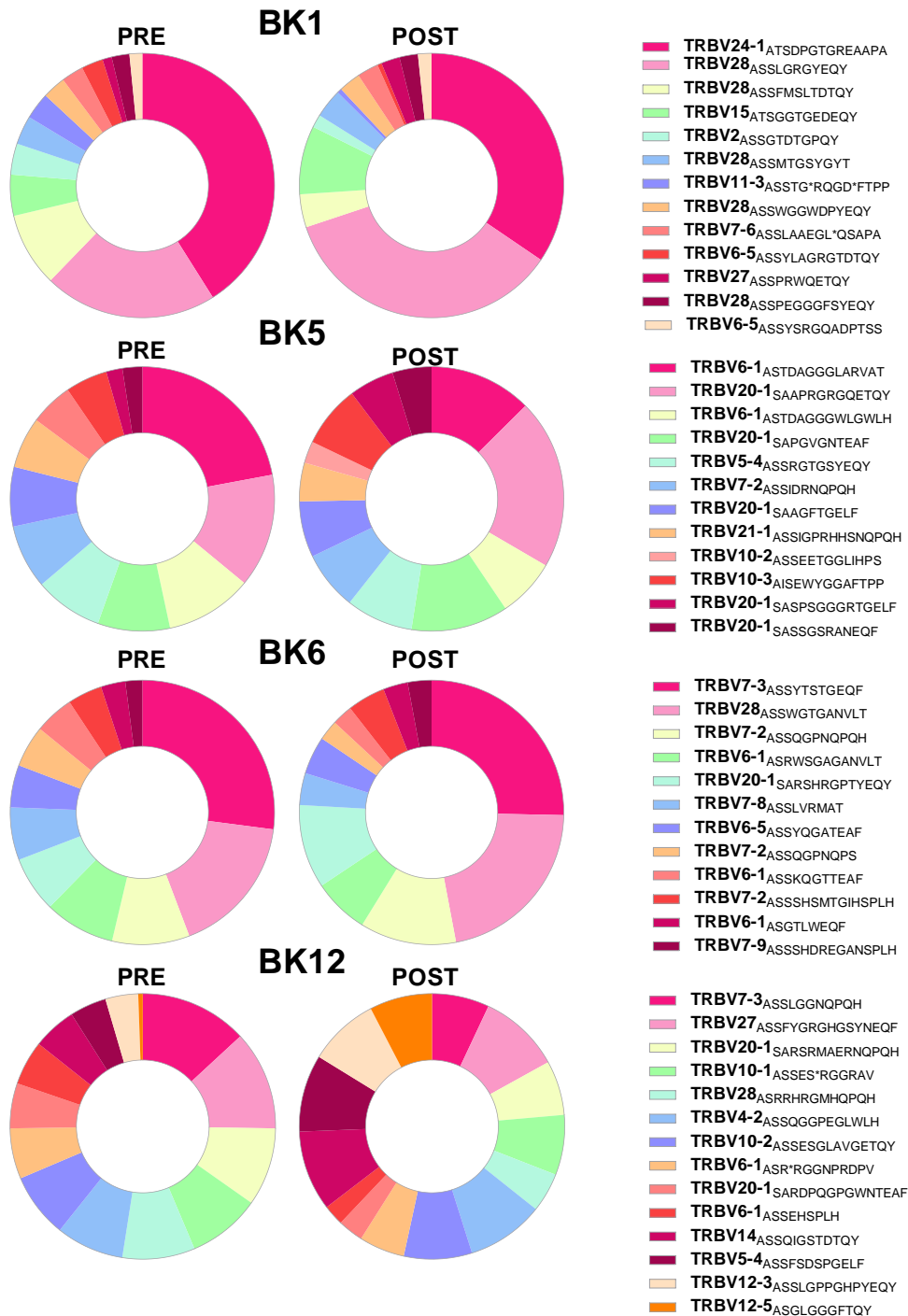


**Εικόνα 19.** Οι αλλαγές στην σειρά κατάταξης των TCR κλωνότυπων των 6 υπόλοιπων ασθενών ως προς την συχνότητα. Τα παραπάνω γραφήματα έχουν δημιουργηθεί με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8. Παρουσιάζονται οι μεταβολές στην σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών TCR κλωνότυπων στους 6 από τους 12 ασθενείς (BK26, BK28, BK33, BK38, BK39 και BK40) με βάση την συχνότητα εμφάνισής τους (κάθετος άξονας) πριν και μετά την λήψη θεραπείας (PRE και POST, αντίστοιχα, οριζόντιος άξονας). Αριστερά σε κάθε διάγραμμα βρίσκονται σε σειρά κατάταξης οι κλωνότυποι βάσει των διαφορετικών CDR3 περιοχών πριν τη θεραπεία και στα δεξιά οι αντίστοιχοι κλωνότυποι μετά από αυτήν. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό κλωνότυπο με ξεχωριστό χρώμα, οι κοινοί κλωνότυποι πριν και μετά τη θεραπεία εμφανίζονται με το ίδιο χρώμα. Εκτός από τις μεταβολές στην σειρά κατάταξης των κλωνότυπων, υπάρχουν και κλωνότυποι που εξαφανίζονται μετά τη θεραπεία, ενώ εντοπίζονται και νέοι κλωνότυποι. Αυτοί οι κλωνότυποι έχουν επισημανθεί με κόκκινο βέλος, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τους ασθενείς BK38 και BK39. Πιο αναλυτικά, στον ασθενή BK38, στην 4η και 5η θέση εμφανίζονται νέοι κλωνότυποι που δεν προϋπήρχαν, εξίσου και στον ασθενή BK39 στην 4η, 5η, 6η, 7η, 8η και 9η θέση. Από την άλλη, οι κλωνότυποι που χάθηκαν μετά την χορήγηση θεραπείας συμβολίζονται με μπλε βέλος. Τέτοια παραδείγματα είναι ο ασθενής BK33, όπου υπάρχει απώλεια των κλωνότυπων που βρισκόταν στην 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> θέση, και ο ασθενής BK39, με τον κλωνότυπο που βρισκόταν αρχικά στην 9<sup>η</sup> θέση να χάνεται μετά τη θεραπεία.

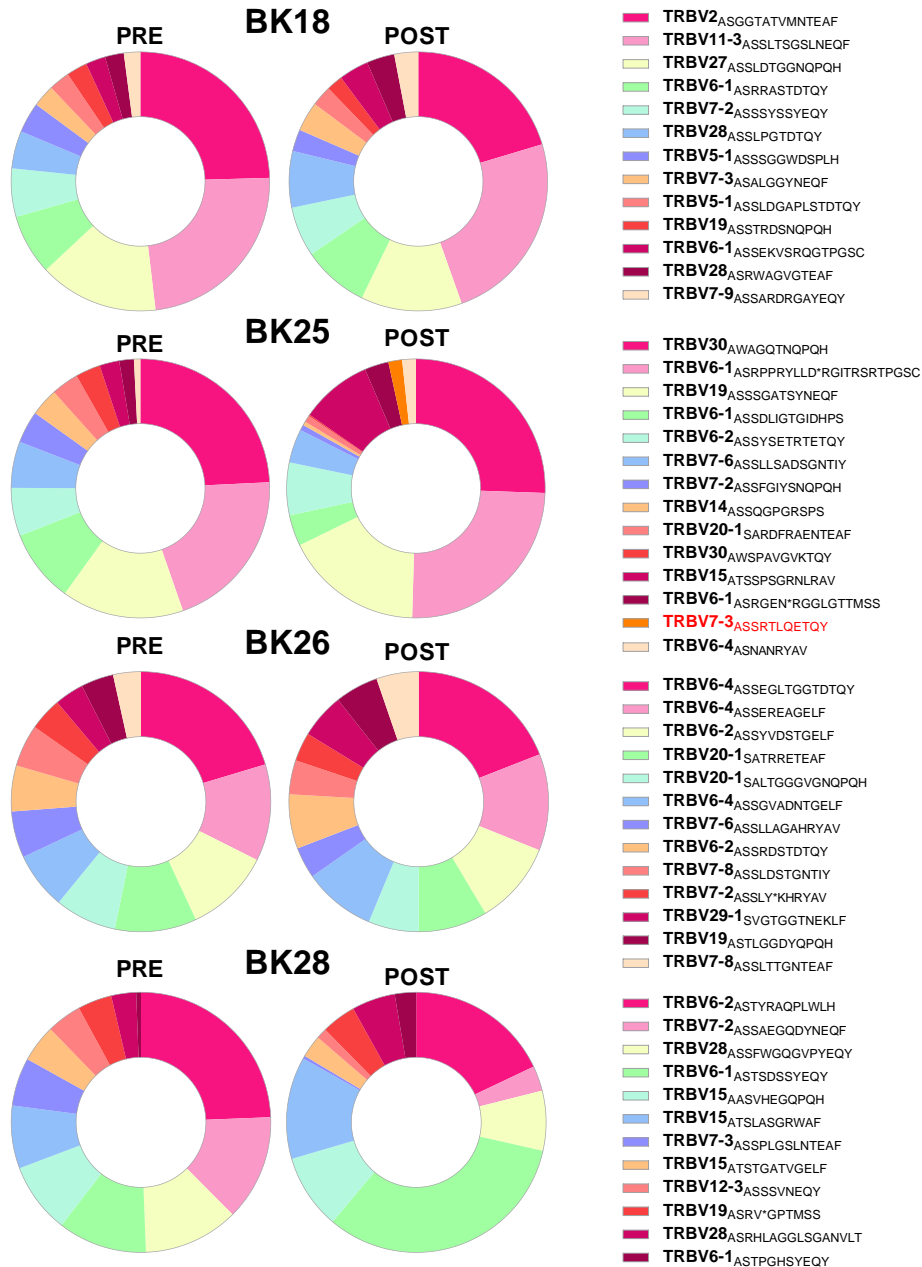
### 3.4 Μεταβολές των συχνοτήτων των 10 πιο συχνών κλωνότυπων ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία βάσει της CDR3 αλληλουχίας

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν οι μεταβολές της συχνότητας των 10 πιο συχνών κλωνότυπων ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία βάσει της αλληλουχίας της CDR3 περιοχής του γονιδίου της β αλυσίδας του TCR. Στις **Εικόνες 20, 21 και 22**, για κάθε ασθενή αντιστοιχούν δύο πίτες, που η κάθε μία απεικονίζει την συχνότητα εμφάνισης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων της οικογένειας TRBV πριν και μετά τη θεραπεία. Σε όλους τους ασθενείς κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο κλωνότυπο, ώστε να γίνεται διακριτή η μεταβολή της συχνότητας τους. Τα ίδια χρώματα υποδηλώνουν το κοινό κλωνότυπο στα δύο χρονικά σημεία, όχι όμως και μεταξύ των διαφορετικών ασθενών. Σε όλα τα παρακάτω γραφήματα (**Εικόνες 20, 21 και 22**) οι πίτες που βρίσκονται στα αριστερά απεικονίζουν την κατανομή των κλωνότυπων πριν τη θεραπεία, με βάση την συχνότητα εμφάνισής τους, και οι πίτες στα δεξιά τους αντιστοιχούν κλωνότυπους μετά από αυτήν. Δίπλα σε κάθε πίτα αναγράφονται οι κλωνότυποι που αναπαριστώνται σε κάθε γράφημα μαζί με την αμινοξική αλληλουχία της CDR3 περιοχής, που είναι μοναδική για κάθε κλωνότυπο. Όπως και στα παραπάνω γραφήματα (**Εικόνα 18 και Εικόνα 19**), παρόμοια και εδώ έχουν χρωματιστεί με μπλε χρώμα οι κλωνότυποι που εξαφανίστηκαν μετά τη θεραπεία και με κόκκινο οι νέοι κλωνότυποι που δημιουργήθηκαν.

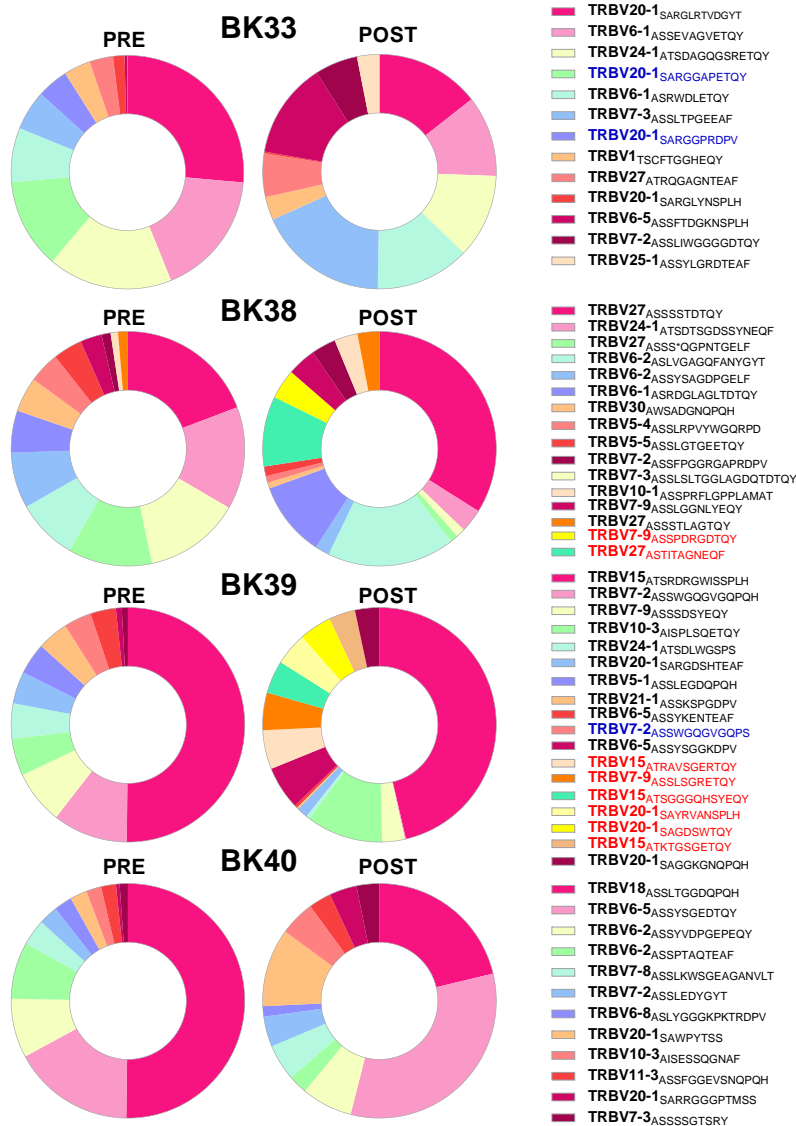
Εξετάζοντας πιο ειδικά, παρατηρείται απώλεια του κλωνότυπου TRBV20-1<sub>SARGGPRDPV</sub> και του TRBV20-1<sub>SARGGAPETQY</sub> από τον ασθενή BK33 και του TRBV7-2<sub>ASSWGQGVGQPS</sub> από τον ασθενή BK39 (μπλε). Από την άλλη, οι νέοι κλωνότυποι που εμφανίζονται είναι ο TRBV7-3<sub>ASSRTLQETQ</sub> στον ασθενή BK25, οι TRBV7-9<sub>ASSPDRGTQY</sub> και TRBV27<sub>ASTITAGNEQF</sub> στον ασθενή BK38 και οι TRBV15<sub>ATRAVSGERTQY</sub>, TRBV7-9<sub>ASSLSGRETQY</sub>, TRBV15<sub>ATSGGGQHSYEQY</sub>, TRBV20-1<sub>SAYRVANSPLH</sub>, TRBV20-1<sub>SAGDSWTQY</sub> και TRBV15<sub>ATKTGSGETQY</sub> στον ασθενή BK39 (κόκκινο). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο ασθενής BK39 εμφάνισε 6 νέους κλωνότυπους σε αυξημένες συχνότητες και 1 κλωνότυπος υψηλής συχνότητας εξαφανίστηκε μετά τη θεραπεία, ενώ άλλοι ασθενείς, όπως οι BK1 και BK5, δεν εμφάνισαν κανένα από τα δύο φαινόμενα. Ενδιαφέρον θα είχε να γίνει συσχέτιση αυτών των δεδομένων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και με την εξέλιξη της νόσου και την επιβίωση σε αυτούς τους ασθενείς.



**Εικόνα 20.** Η κατανομή των επικρατέστερων TCR κλωνότυπων βάσει των TRBV γονιδίων των 4 πρώτων ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία. Τα γραφήματα έχουν δημιουργηθεί με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8. Στις συγκεκριμένες πίτες αναπαρίσταται η κατανομή των κλωνότυπων των ασθενών BK1, BK5, BK6 και BK12 στα δύο χρονικά σημεία. Αριστερά εντοπίζονται οι κλωνότυποι πριν τη θεραπεία (PRE) και στα δεξιά οι αντίστοιχοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία (POST). Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε έναν μοναδικό κλωνότυπο και οι κοινói κλωνότυποι στα δύο χρονικά σημεία απεικονίζονται με το ίδιο χρώμα. Δίπλα στις πίτες κάθε ασθενή αναγράφονται οι επικρατέστεροι κλωνότυποι, με το αντίστοιχο χρώμα τους και την αμινοξική αλληλουχία της CDR3 περιοχής, που είναι μοναδική για κάθε κλωνότυπο.



**Εικόνα 21.** Η κατανομή των επικρατέστερων TCR κλωνότυπων βάσει των TRBV γονιδίων των 4 επόμενων ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία. Τα γραφήματα έχουν δημιουργηθεί με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8. Στις συγκεκριμένες πίτες αναπαρίσταται η κατανομή των κλωνότυπων των ασθενών BK18, BK25, BK26 και BK28 στα δύο χρονικά σημεία. Αριστερά εντοπίζονται οι κλωνότυποι πριν τη θεραπεία (PRE) και στα δεξιά οι αντίστοιχοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία (POST). Δίπλα στις πίτες κάθε ασθενή αναγράφονται οι επικρατέστεροι κλωνότυποι, με το αντίστοιχο χρώμα τους και την αμινοξική αλληλουχία της CDR3 περιοχής, που είναι μοναδική για κάθε κλωνότυπο. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε έναν μοναδικό κλωνότυπο και οι κοινοί κλωνότυποι στα δύο χρονικά σημεία απεικονίζονται με το ίδιο χρώμα. Στην περίπτωση εμφάνισης νέων κλωνότυπων της οικογένειας TRBV γονιδίων μετά την χορήγηση θεραπεία, αυτοί και η αμινοξική τους αλληλουχία επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο ασθενής BK25, στον οποίο εμφανίζεται καινούργιος κλωνότυπος TRBV7-3<sub>ASSRTLQETQ</sub> μετά την λήψη θεραπείας.



**Εικόνα 22.** Η κατανομή των επικρατέστερων TCR κλωνότυπων βάσει των TRBV γονιδίων των 4 τελευταίων ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία. Τα γραφήματα έχουν δημιουργηθεί με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8. Στις συγκεκριμένες πίτες αναπαρίσταται η κατανομή των κλωνότυπων των ασθενών BK33, BK38, BK39 και BK40 στα δύο χρονικά σημεία. Αριστερά εντοπίζονται οι κλωνότυποι πριν τη θεραπεία (PRE) και στα δεξιά οι αντίστοιχοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία (POST). Δίπλα στις πίτες κάθε ασθενή αναγράφονται οι επικρατέστεροι κλωνότυποι, με το αντίστοιχο χρώμα τους και την αμινοξική αλληλουχία της CDR3 περιοχής, που είναι μοναδική για κάθε κλωνότυπο. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε έναν μοναδικό κλωνότυπο και οι κοινόι κλωνότυποι στα δύο χρονικά σημεία απεικονίζονται με το ίδιο χρώμα. Οι νέοι κλωνότυποι και η αμινοξική τους αλληλουχία επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο ασθενής BK38, στον οποίο εμφανίζονται οι νέοι κλωνότυποι TRBV7-9<sub>ASSPDRGTQY</sub> και TRBV27<sub>ASTITAGNEQF</sub> και ο ασθενής BK39, με τους νεοεμφανιζόμενους κλωνότυπους οι TRBV15<sub>ATRAVSGERTQY</sub>, TRBV7-9<sub>ASSLSGRETQY</sub>, TRBV15<sub>ATSGGGQHSYEQY</sub>, TRBV20-1<sub>SAYRVANSPLH</sub>, TRBV20-1<sub>SAGDSWTQY</sub> και TRBV15<sub>ATKTGSGETQY</sub>. Με μπλε χρώμα έχουν επισημανθεί οι κλωνότυποι που εξαφανίστηκαν μετά την χορήγηση θεραπείας. Παρατηρείται απώλεια των κλωνότυπων TRBV20-1<sub>SARGGPRDPV</sub> και TRBV20-1<sub>SARGGAPETQY</sub> στον ασθενή BK33 και του TRBV7-2<sub>ASSWGQGVGQPS</sub> στον ασθενή BK39.

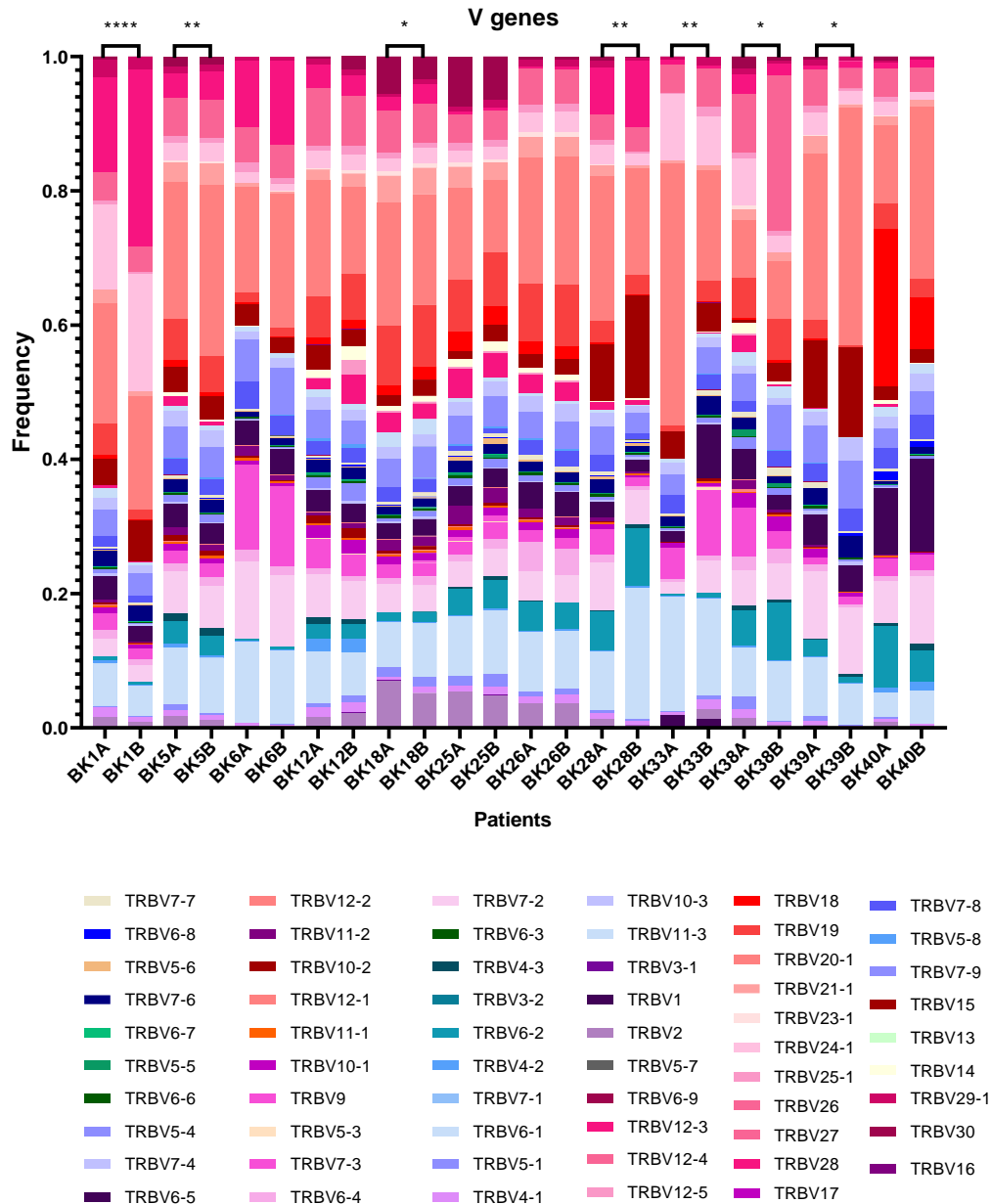
### 3.5 Ανάλυση των μεταβολών των συχνοτήτων των TRBV και TRBJ γονιδίων στους ασθενείς μετά τη θεραπεία

Από την ανάλυση του ρεπερτορίου των TRBV γονιδίων στο σύνολο των 12 ασθενών, πριν και μετά τη θεραπεία, προκύπτει το γράφημα της **Εικόνας 23**. Εδώ απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης των TRBV γονιδίων στα δύο χρονικά σημεία της μελέτης. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη μη παραμετρική δοκιμασία t-test του προγράμματος GraphPad Prism 8.

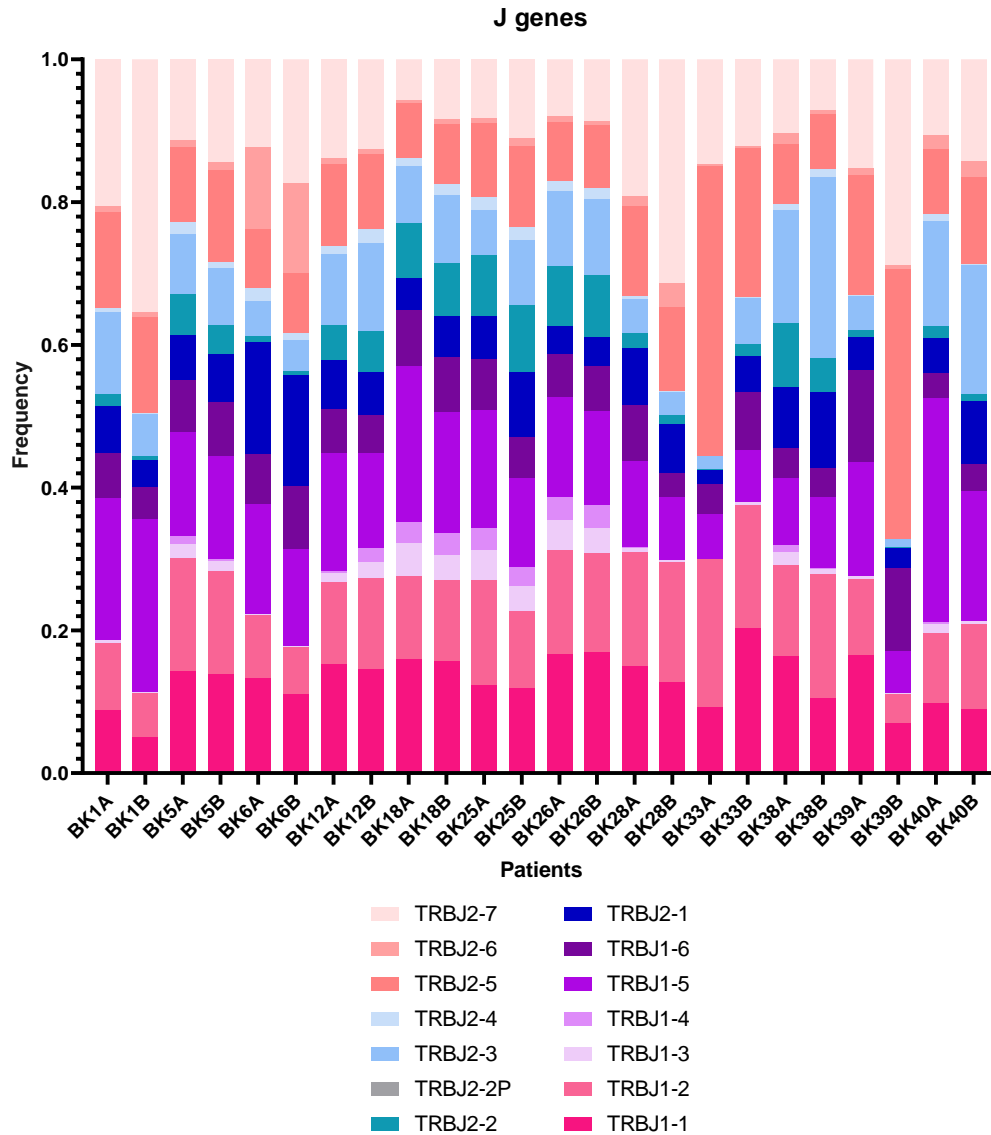
Βάσει των αποτελεσμάτων, ορισμένοι από τους ασθενείς είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών TRBV γονιδίων, πριν και μετά τη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, αξιοσημείωτη στατιστική διαφορά εμφανίζεται στον ασθενή BK1 ( $p < 0.0001$ ) στα δύο χρονικά σημεία A και B. Επίσης, σημαντική στατιστική διαφορά στην συχνότητα των TRBV γονιδίων ( $p < 0.01$ ) εμφανίζεται στους ασθενείς BK5, BK28 και BK33. Τέλος, οι ασθενείς BK18, BK38 και BK39, κατά την στατιστική ανάλυση εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης των οικογενειών TRBV, με  $p < 0.05$ .

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ρεπερτορίου των TRBJ γονιδίων των 12 ασθενών, προκειμένου να προσδιοριστεί η συχνότητα εμφάνισής τους πριν και μετά την χορήγηση θεραπείας (**Εικόνα 24**). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη μη παραμετρική δοκιμασία t-test του προγράμματος GraphPad Prism 8. Σε αντίθεση με την οικογένεια των TRBV γονιδίων, οι κλωνότυποι της οικογένειας των TRBJ γονιδίων δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο χρονικά σημεία, σε κανέναν από τους ασθενείς. Επομένως, η συχνότητα εμφάνισης των TRBJ γονιδίων πριν και μετά τη θεραπεία δεν επηρεάστηκε ουσιαστικά, ώστε να δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, οι επικρατέστεροι συνδυασμοί γονιδίων TRBV και TRBJ πριν και μετά τη θεραπεία για κάθε ασθενή παρουσιάζονται στο Παράρτημα της παρούσας εργασίας.





**Εικόνα 23. Ανάλυση του ρεπερτορίου των TRBV γονιδίων ως προς την συχνότητα εμφάνισής τους ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία.** Ο κάθετος άξονας παρουσιάζει την συχνότητα εμφάνισης των V γονιδίων και ο οριζόντιος τους ασθενείς στα δύο χρονικά σημεία. Οι ασθενείς συμβολίζονται με τα αρχικά BK, τον αριθμό καταχώρησής τους και «A» για το χρονικό σημείο πριν τη θεραπεία και «B» για το χρονικό σημείο μετά τη θεραπεία. Επομένως, κάθε ασθενής έχει δύο στήλες στο γράφημα. Τα ίδια χρώματα υποδηλώνουν το κοινό V γονίδιο στα δύο χρονικά σημεία. Κάτω από το γράφημα καταγράφονται αναλυτικά όλα τα TRBV γονίδια που ανιχνεύθηκαν με τα αντίστοιχα χρώματά τους. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία t-test του προγράμματος GraphPad Prism 8. Στατιστικά σημαντικά θεωρούνται τα αποτελέσματα με p-value  $\leq 0.05$ . Αξιοσημείωτες στατιστικές μεταβολές στην συχνότητα εμφάνισης των κλωνότυπων χαρακτηρίζουν τους ασθενείς BK1, BK5, BK18, BK28, BK33, BK38 και BK39, οι οποίοι επισημαίνονται σε αστερίσκους στις κορυφές των στηλών ανάλογα με το p-value. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .



**Εικόνα 24. Ανάλυση του ρεπερτορίου των TRBJ γονιδίων ως προς την συχνότητα εμφάνισής τους ανά ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία.** Ο κάθετος άξονας παρουσιάζει την συχνότητα εμφάνισης των TRBJ γονιδίων και ο οριζόντιος τους ασθενείς στα δύο χρονικά σημεία. Οι ασθενείς συμβολίζονται με τα αρχικά BK, τον αριθμό καταχώρησής τους και «A» για το χρονικό σημείο πριν τη θεραπεία και «B» για το χρονικό σημείο μετά τη θεραπεία. Επομένως, σε κάθε ασθενή αντιστοιχούν δύο στήλες στο γράφημα. Τα ίδια χρώματα υποδηλώνουν το κοινό J γονίδιο στα δύο χρονικά σημεία. Κάτω από το γράφημα καταγράφονται αναλυτικά όλα τα TRBJ γονίδια που ανιχνεύθηκαν με τα αντίστοιχα χρώματά τους. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία t-test του προγράμματος GraphPad Prism 8, από την οποία δεν προκύπτει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

## Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου (ΚΚΤ) είναι ο έβδομος συχνότερος τύπος καρκίνου παγκοσμίως (5,6), και θεωρείται ως ένας από τους πιο επιθετικούς τύπους καρκίνου, με σοβαρές επιπτώσεις για την ποιότητα ζωής των ασθενών, κυρίως λόγω της προχωρημένης τοπικής νόσου και της χαμηλής ανταπόκρισης στις καθιερωμένες θεραπείες (62). Ο ΚΚΤ περιλαμβάνει μια εξαιρετικά ετερογενή ομάδα επιθηλιακών όγκων που εντοπίζονται μεταξύ της στοματικής κοιλότητας και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, και ειδικότερα στον λάρυγγα, τον ρινοφάρυγγα, τον στοματοφάρυγγα και τον υποφάρυγγα (64). Οι πιο συνηθισμένοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΚΚΤ σχετίζονται με το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ, ενώ η μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων αποτελεί έναν κύριο αιτιολογικό παράγοντα, ειδικά για όγκους που εντοπίζονται στον στοματοφάρυγγα (6).

Τα βασικά θεραπευτικά σχήματα περιλαμβάνουν χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ακτινοθεραπεία (RT) και χημειοθεραπεία (CT), καθώς και συνδυασμούς αυτών, ενώ έχουν εισαχθεί δυναμικά στην κλινική πράξη και νέες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοθεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας. Ωστόσο, οι υπάρχουσες θεραπευτικές μέθοδοι είναι συχνά ανεπιτυχείς, συνοδευόμενες από υψηλό ποσοστό υποτροπής και χωρίς εμφανή βελτίωση στα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης (6,139). Ως εκ τούτου, η πλειοψηφία των ασθενών με ΚΚΤ εξακολουθούν να έχουν κακή πρόγνωση και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης, αφού έως και το 25% των προσβεβλημένων ατόμων αναπτύσσουν τοπική υποτροπή ή απομακρυσμένες μεταστάσεις (140,141).

Η μη φυσιολογική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και η συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι οι βασικές αιτίες της ανάπτυξης και εξέλιξης του ΚΚΤ (55,142). Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να επικοινωνούν με τα εξωτερικά μικροπεριβάλλοντα και να αποφεύγουν την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Λαμβάνοντας υπόψιν την πολυπλοκότητα του ΚΚΤ και την επείγουσα ανάγκη για ταχεία διάγνωση και πρόγνωση της νόσου, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην εύρεση νέων, κλινικά σημαντικών βιοδεικτών.

Η αναζήτηση προβλεπτικών δεικτών στοχεύει κυρίως στη μεταβαλλόμενη λόγω της θεραπείας έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και γονιδιακών υπογραφών. Προς αυτή την κατεύθυνση, ο Zhong και οι συνεργάτες του ανέλυσαν γονιδιακές

υπογραφές σε βιοπτικά δείγματα 29 ασθενών με προχωρημένο (σταδίου III ή IV) καρκίνο του υποφάρυγγα πριν από τη χημειοθεραπεία. Έξι γονίδια (*GATS*, *ARID3B*, *ASNS*, *FBN2*, *SLC27A5* και *STC2*) βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (ελάττωση του όγκου κατά περίπου 70% μετά τη χημειοθεραπεία), ενώ τέσσερα γονίδια (*PRIC285*, *CXCRI*, *INMT* και *MYOM3*) βρέθηκαν να υποεκφράζονται στους μη ανταποκρινόμενους (143). Σε μία άλλη μελέτη σε 64 ασθενείς με καρκίνο του στοματοφάρυγγα και του υποφάρυγγα, σταδίων II, III και IV, που έλαβαν χημειοθεραπεία με 5-φθοροουρακίλη και σισπλατίνη, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *XPA*, *p53*, *Bcl-2*, *VEGF*, *MDR1* και *DPD* συσχετίστηκαν σημαντικά με την αυξημένη ευαισθησία στη χημειοθεραπεία, με την υπερέκφραση του *ERCC1* να ταυτοποιείται ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας ευνοϊκής απόκρισης στη θεραπεία (144). Ακόμα, τα μικρά μη κωδικοποιούμενα RNA, και ειδικά τα miRNAs, έχουν αναδειχθεί ως χρήσιμοι βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόγνωση και πρόβλεψη της απόκρισης στη θεραπεία σε ασθενείς με ΚΚΤ (145).

Επί του παρόντος, δεν υπάρχει κανένας επικυρωμένος προβλεπτικός δείκτης για τον ΚΚΤ σε κλινική χρήση, με εξαίρεση την κατάσταση του PD-L1 και τη συνδυασμένη θετική βαθμολογία (Combined Positive Score, CPS) πριν από τη χορήγηση ανοσοθεραπείας (146). Αναφορικά με το PD-L1, έχει δειχθεί ότι όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με ICI, οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση PD-L1 έχουν υψηλότερο συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης και αυξημένη επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή έκφραση PD-L1 (147). Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα αναφορικά με την υιοθέτηση της έκφρασης του PD-L1 ως παράγοντα πρόβλεψης της απόκρισης ασθενών με ΚΚΤ στην ανοσοθεραπεία. Αρχικά, η έκφραση του PD-L2 δεν καλύπτεται, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αν ληφθεί υπόψιν ότι έχει παρόμοια λειτουργία με το PD-L1, και η υψηλή έκφρασή του έχει συσχετιστεί με την προώθηση της μετάστασης και την κακή πρόγνωση σε διάφορους συμπαγείς όγκους (148,149). Επιπλέον, οι ασθενείς με υπερέκφραση του PD-L1 δεν ανταποκρίνονται απαραίτητα στην ανοσοθεραπεία, ενώ αντίθετα ασθενείς με περιορισμένη ή ακόμα και απουσία έκφρασης PD-L1 έχουν ανταποκριθεί στην ICI (150). Τέλος, η αξιολόγηση της έκφρασης του PD-L1 είναι τεχνικά δύσκολη, λόγω της εφαρμογής διαφορετικών δοκιμασιών ή ακόμα και της υιοθέτησης διαφορετικών τύπων πλατφορμών για την ανοσοϊστοχημική χρώση, με την καθεμία να έχει δικό της όριο και τιμή αποκοπής για τον καθορισμό της θετικότητας του PD-L1 (151).

Το ρεπερτόριο των υποδοχέων των T κυττάρων (TCR) έχει αναδειχθεί σε υποσχόμενο βιοδείκτη πρόγνωσης ή/και πρόβλεψης σε διάφορους τύπους καρκίνου (152–155), με την αλληλούχιση του TCR να χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των αποκρίσεων των T κυττάρων εντός του όγκου. Αλλαγές στο ρεπερτόριο του TCR μετά τη θεραπεία έχουν συσχετιστεί με καλύτερες κλινικές εκβάσεις σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (156). Επιπλέον, η ποικιλομορφία του TCR έχει αποδειχθεί ότι δρα ως προγνωστικός δείκτης για τη συνολική επιβίωση απουσία οποιασδήποτε θεραπείας σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους, ενώ η αυξημένη κλωνικότητα του TCR πριν από τη θεραπεία δείχνει αυξημένη ανταπόκριση σε anti-PD-1 παράγοντες (155).

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την ερμηνεία των μεταβολών του ρεπερτορίου των T κυττάρων μετά την εφαρμογή διαφόρων αντικαρκινικών θεραπειών. Σε αυτό το πλαίσιο, η υψηλή έκφραση καρκινικών αντιγόνων μαζί με την έκφραση MHC τάξης I είναι προ-απαιτούμενο για την παρουσίαση των TAAs στα T κύτταρα, ανεξαρτήτου του τύπου της θεραπείας. Έχει αποδειχθεί ότι η ακτινοβολία αυξάνει την έκφραση MHC τάξης I σε κύτταρα μελανώματος, αυξάνοντας έτσι την παρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων, με αποτέλεσμα την ενισχυμένη αναγνώριση από τα T κύτταρα και την πιο υψηλή αποτελεσματικότητα της συνδυαζόμενης ανοσοθεραπείας (157). Καθώς η εμφάνιση νέων κλώνων T κυττάρων που αναγνωρίζουν τα TAAs που έχουν απελευθερωθεί από τα καρκινικά κύτταρα που πεθαίνουν επάγεται λόγω της αντικαρκινικής θεραπείας, π.χ. της ακτινοβολίας, οι αλλαγές στο ρεπερτόριο των TCR μετά τη θεραπεία θα μπορούσαν να αντανακλούν την επαγόμενη από τη θεραπεία συστημική ενεργοποίηση των T κυττάρων (131).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μεταβολές του TCR ρεπερτορίου, μέσω της ανάλυσης της μεταβλητής περιοχής της αλυσίδας β του υποδοχέα TCR (TCR Vβ), σε δείγματα ολικού περιφερικού αίματος 12 ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου πριν και μετά το κατά περίπτωση θεραπευτικό σχήμα (χειρουργείο ή ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή συνδυασμός). Η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση ήταν τα 62.5 έτη, και η εντόπιση του όγκου συμπεριλάμβανε ένα εκ των ακόλουθων: λάρυγγα, στοματοφάρυγγα, γλώσσα, παρωτίδα, υποφάρυγγα ή αμυγδαλές. Αναφορικά με την σταδιοποίηση, για όσους ασθενείς υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία, αυτοί είχαν T1 ή T2 όγκους.

Ειδικότερα, αναλύθηκαν 4 βασικές παράμετροι που σχετίζονται με το ρεπερτόριο του TCR: η ποικιλομορφία κατά Shannon (Shannon Diversity), η συχνότητα των κλωνότυπων TCR (TCR Frequency), ο αριθμός των κλωνότυπων

(Clone count) και η ομοιομορφία μεγέθους των κλωνότυπων (Evenness). Ειδικά όσον αφορά την αφθονία των TCR κλωνότυπων (richness), έχει δειχθεί ότι η αύξηση του αριθμού των TCR κλωνότυπων στην περιφέρεια σχετίζεται με βελτιωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με cetuximab σε ασθενείς με ΚΚΤ (158). Στην παρούσα μελέτη, η συχνότητα εμφάνισης και ο αριθμός των TCR κλωνότυπων παρουσίασαν μικρή αύξηση μετά τη θεραπεία στο σύνολο των ασθενών, η οποία όμως σε καμία εκ των δύο περιπτώσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Ωστόσο, η λεπτομερής ανάλυση των 10 πιο συχνών κλωνότυπων βάσει της αλληλουχίας της CDR3 περιοχής, σε κάθε ασθενή πριν και μετά την εκάστοτε θεραπεία ανέδειξε σημαντικές μεταβολές στην κατάταξή τους με βάση τη συχνότητα εμφάνισης. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ήταν επίσης η παρατήρηση ότι σε δύο ασθενείς, κλωνότυποι που πριν τη θεραπεία ήταν στους 10 πιο συχνούς, εξαφανίστηκαν εντελώς μετά από τη θεραπεία. Από την άλλη μεριά, τρεις ασθενείς εμφάνισαν νέους κλωνότυπους σε αυξημένες συχνότητες, μετά από τη θεραπεία. Τέτοιες αλλαγές στο ρεπερτόριο του TCR θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως δείκτες εξέλιξης της νόσου και/ή ανταπόκρισης στη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι οι διαφορετικοί κλωνότυποι χαρακτηρίζονται από διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία και το μήκος της υπερμεταβλητής CDR3 περιοχής, οι αλλαγές στις κλωνοτυπικές συχνότητες των TCR θα μπορούσαν να υποδηλώνουν τροποποιήσεις στις ιδιότητες στόχευσης και αναγνώρισης των TAAs και των νεοαντιγόνων του όγκου. Έτσι, η επέκταση συγκεκριμένων κλωνότυπων μετά τη θεραπεία είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος δεδομένου ότι αυτοί μπορεί να δρουν ως δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Η επέκταση των TCR κλωνότυπων που καταγράφηκε είναι ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα, καθώς υποδηλώνει ότι η θεραπεία μπορεί να επάγει ανοσολογικές τροποποιήσεις, που επηρεάζουν διαφορικά την επέκταση διαφόρων κλώνων T κυττάρων, είτε τοπικά είτε στην κυκλοφορία του αίματος ως αποτέλεσμα συστημικής ανοσοενεργοποίησης. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα που θανατώνονται μέσω της θεραπείας μπορούν να επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-18 (159) και ιντερφερονών τύπου I και II (160,161), οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις σηματοδοτικές οδούς επεξεργασίας και παρουσίασης των καρκινικών αντιγόνων, με αποτέλεσμα την επαγωγή της αντικαρκινικής προσαρμοστικής ανοσίας (162,163). Ειδικά όσον αφορά την IFN- $\gamma$  που παράγεται, έχει αναφερθεί ότι επάγει την παραγωγή των

προφλεγμονωδών χημειοκινών CXCL10 και CXCL16, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά CD8<sup>+</sup> T κύτταρα (164,165). Έτσι, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η επαγόμενη από τη θεραπεία απελευθέρωση καρκινικών αντιγόνων από τα κατεστραμμένα καρκινικά κύτταρα παρουσία προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών ευνοεί την κλωνική επέκταση των ειδικών T κυττάρων που αναγνωρίζουν αυτά τα πεπτίδια μέσω των συγγενών τους TCR, οι οποίοι θα εμφανιστούν σε αυξημένες συχνότητες μετά τη θεραπεία. Από αυτή την άποψη, οι επεκτεινόμενοι κλώνοι των T κυττάρων θα διεγερθούν περαιτέρω προς πολλαπλασιασμό κατά τη διάρκεια της συνεχούς απελευθέρωσης και διέγερσης από τα καρκινικά αντιγόνα στην περιφέρεια και ως εκ τούτου, η επικράτησή τους θα καταστείλει την επέκταση άλλων κλώνων T κυττάρων με TCR που έχουν χαμηλή συγγένεια για την παρουσιαζόμενα καρκινικά αντιγόνα (132,165).

Παρά τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα, πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς. Πρώτον, ο αριθμός των ασθενών που εξετάστηκαν είναι μικρός και επομένως μια μελλοντική μελέτη με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος και κλινική παρακολούθηση των ασθενών είναι απαραίτητη, προκειμένου αφενός να επιβεβαιώσει τις παρατηρούμενες μεταβολές στο ρεπερτόριο TCR Vβ μετά τη θεραπεία και αφετέρου να διαλευκάνει κατά πόσον αυτές οι μεταβολές έχουν κάποια προγνωστική ή προβλεπτική αξία. Δεύτερον, η παρούσα μελέτη δεν ανέλυσε σε ποιους υποπληθυσμούς των T κυττάρων παρατηρείται η κλωνική επέκταση των TCR (CD8<sup>+</sup> ή CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, ή ακόμη και CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> ρυθμιστικά T κύτταρα) και αν οι συγκεκριμένοι κλωνότυποι αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα. Τέλος, καθώς η μόλυνση από HPV έχει δειχθεί ως σημαντικός παράγοντας πρόγνωσης και ακόμα και πρόβλεψης στον ΚΚΤ, θα πρέπει τα αποτελέσματα της ανάλυσης του TCR ρεπερτορίου να συσχετιστούν με τη θετικότητα του HPV, σε συνδυασμό με την κλινική έκβαση των ασθενών της μελέτης.

## Συμπεράσματα

Συνολικά, στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν μεταβολές στο ρεπερτόριο του TCR στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου μετά από την εφαρμογή διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων. Η κλωνική επέκταση ορισμένων TCR κλωνότυπων και η συστολή άλλων ως απόκριση στη θεραπεία, υποδηλώνει μία επαγόμενη από τη θεραπεία, συστημική ανοσοενεργοποίηση στον ΚΚΤ. Οι

συγκεκριμένες παρατηρήσεις -εφόσον επιβεβαιωθούν- πιθανά προσφέρουν έναν νέο προβλεπτικό βιοδείκτη, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλους γενετικούς ή/ και μοριακούς δείκτες για την επιλογή ασθενών με ΚΚΤ που είναι πιθανότερο να ωφεληθούν από τη θεραπεία.



## Βιβλιογραφία

1. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016/03/06. 2016;91(3):386–96.
2. Ugarte A, J. Duran Moreno Ch. Avgerinou, E. Voulgaris, A. Karadimou, E. Karamitrousis, A. Korogiannos, M. Lontos, P. Baxevanos, I. Binas, M. Nikolaou, K. Rapti, K. Tsapakidis, K. Tsigaridas and N. Tsoukalas. EA. Head and Neck Cancer: Guide for Patients [Internet]. 2015. Available from: <https://www.esmo.org/content/download/200036/3589604/file/EL-Head-and-Neck-Cancer-Guide-for-Patients-Greek.pdf>
3. Anniko M, Bernal-Sprekelsen M, Bonkowsky V, Bradley PJ, Iurato S. *Otorhinolaryngology, head and neck surgery.* Springer; 2010.
4. Σισμάνης-Αθανασιάδης Α. *Ωτορινολαρυγγολογία, Χειρουργική Κεφαλής και Τραχήλου.* Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα; 2010.
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
6. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim.* 2020/11/28. 2020;6(1):92.
7. Rezende TM, de Souza Freire M, Franco OL. Head and neck cancer: proteomic advances and biomarker achievements. *Cancer.* 2010/07/29. 2010;116(21):4914–25.
8. Kawakita D, Hosono S, Ito H, Oze I, Watanabe M, Hanai N, et al. Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. *Oral Oncol.* 2012 Feb;48(2):186–91.
9. Rettig EM, D’Souza G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015/05/17. 2015;24(3):379–96.
10. Nooshinfar E, Bashash D, Abbasalizadeh M, Safaroghli-Azar A, Sadreazami P, Esmaeil Akbari M. The Molecular Mechanisms of Tobacco in Cancer Pathogenesis. *Iran J Cancer Prev.* 2017;10(1):e7902.
11. Hays LE, Zodrow DM, Yates JE, Deffebach ME, Jacoby DB, Olson SB, et al. Cigarette smoke induces genetic instability in airway epithelial cells by suppressing FANCD2 expression. *Br J Cancer.* 2008 May;98(10):1653–61.
12. Zheng H-C, Takano Y. NNK-Induced Lung Tumors: A Review of Animal Model. *J Oncol.* 2011;2011:635379.
13. Doukas SG, Vageli DP, Lazopoulos G, Spandidos DA, Sasaki CT, Tsatsakis A. The Effect of NNK, A Tobacco Smoke Carcinogen, on the miRNA and Mismatch DNA Repair Expression Profiles in Lung and Head and Neck Squamous Cancer Cells. *Cells.* 2020/04/25. 2020;9(4).
14. Irimie-Aghiorghiesei AI, Pop-Bica C, Pintea S, Braicu C, Cojocneanu R, Zimța AA, et al. Prognostic value of mir-21: An updated meta-analysis in head and neck squamous cell carcinoma (hnscc). *J Clin Med.* 2019/11/27. 2019;8(12).
15. Shaikh I, Ansari A, Ayachit G, Gandhi M, Sharma P, Bhairappanavar S, et al. Differential gene expression analysis of HNSCC tumors deciphered tobacco dependent and independent molecular signatures. *Oncotarget.* 2019/11/07. 2019;10(58):6168–83.
16. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2008 Oct;27(50):6407–18.
17. Cui C, Merritt R, Fu L, Pan Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2017 Jan;7(1):3–17.
18. Zhang H, Liu J, Fu X, Yang A. Identification of Key Genes and Pathways in Tongue Squamous Cell Carcinoma Using Bioinformatics Analysis. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2017 Dec;23:5924–32.
19. Di Credico G, Polesel J, Dal Maso L, Pauli F, Torelli N, Luce D, et al. Alcohol drinking

- and head and neck cancer risk: the joint effect of intensity and duration. *Br J Cancer*. 2020;123(9):1456–63.
20. Ferraguti G, Terracina S, Petrella C, Greco A, Minni A, Lucarelli M, et al. Alcohol and Head and Neck Cancer: Updates on the Role of Oxidative Stress, Genetic, Epigenetics, Oral Microbiota, Antioxidants, and Alkylating Agents. *Antioxidants*. 2022/01/22. 2022;11(1).
  21. Cancer IA for R on. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Vol. 53. IARC Lyon,, France; 1991.
  22. Kokkinakis M, Tsakiris I, Tzatzarakis M, Vakonaki E, Alegakis A, Papachristou S, et al. Carcinogenic, ethanol, acetaldehyde and noncarcinogenic higher alcohols, esters, and methanol compounds found in traditional alcoholic beverages. A risk assessment approach. *Toxicol reports*. 2020;7:1057–65.
  23. Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017/08/18. 2017;36(3):425–34.
  24. Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Christie BR. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Res Rev*. 2011 Jun;67(1–2):209–25.
  25. Miller-Pinsler L, Wells PG. Deficient DNA repair exacerbates ethanol-initiated DNA oxidation and embryopathies in ogg1 knockout mice: gender risk and protection by a free radical spin trapping agent. *Arch Toxicol*. 2016 Feb;90(2):415–25.
  26. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015 Jan;517(7536):576–82.
  27. Fan X, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, Purdue MP, Freedman ND, et al. Drinking alcohol is associated with variation in the human oral microbiome in a large study of American adults. *Microbiome*. 2018 Apr;6(1):59.
  28. Healy CM, Moran GP. The microbiome and oral cancer: More questions than answers. *Oral Oncol*. 2019;89:30–3.
  29. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med*. 2005;3(1):1–8.
  30. Banerjee S, Tian T, Wei Z, Peck KN, Shih N, Chalian AA, et al. Microbial signatures associated with oropharyngeal and oral squamous cell carcinomas. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–20.
  31. Marttila E, Uittamo J, Rusanen P, Lindqvist C, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production and microbial colonization in oral squamous cell carcinoma and oral lichenoid disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Jul;116(1):61–8.
  32. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*. 2007 Feb;43(2):181–6.
  33. Zhu W, Phan QT, Boonthueung P, Solis N V, Loo JA, Filler SG. EGFR and HER2 receptor kinase signaling mediate epithelial cell invasion by *Candida albicans* during oropharyngeal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug;109(35):14194–9.
  34. Boonanantanasarn K, Gill AL, Yap Y, Jayaprakash V, Sullivan MA, Gill SR. *Enterococcus faecalis* enhances cell proliferation through hydrogen peroxide-mediated epidermal growth factor receptor activation. *Infect Immun*. 2012 Oct;80(10):3545–58.
  35. Ryu W-S. Chapter 7 - Papillomaviruses. In: Ryu W-S, editor. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Boston: Academic Press; 2017. p. 97–109.
  36. Tulay P, Serakinci N. The role of human papillomaviruses in cancer progression. *J Cancer Metastasis Treat*. 2016;2:201–13.
  37. Palefsky JM. Human papillomavirus infections: Epidemiology and disease associations. [Internet]. UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. [cited 2022 Dec 28]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/human-papillomavirus-infections-epidemiology-and-disease-associations>
  38. Forcier M, Musacchio N. An overview of human papillomavirus infection for the

- dermatologist: disease, diagnosis, management, and prevention. *Dermatol Ther.* 2010;23(5):458–76.
39. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Nov;29(32):4294–301.
  40. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009 May;199(9):1263–9.
  41. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med.* 2018 Aug;7(9).
  42. Alshafiq E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis.* 2019/07/17. 2019;10(8):540.
  43. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Jun;108(6):djv403.
  44. Perri F, Longo F, Caponigro F, Sandomenico F, Guida A, Della Vittoria Scarpati G, et al. Management of HPV-Related Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Pitfalls and Caveat. *Cancers (Basel).* 2020 Apr;12(4).
  45. Partlová S, Bouček J, Kloudová K, Lukešová E, Zábrodský M, Grega M, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 2015 Jan;4(1):e965570.
  46. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI insight.* 2016 Oct;1(17):e89829.
  47. Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J cancer.* 2004 Mar;109(2):157–62.
  48. Müller M, Prescott EL, Wasson CW, Macdonald A. Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol.* 2015;10(1):27–39.
  49. Yan L, Zhan C, Wu J, Wang S. Expression profile analysis of head and neck squamous cell carcinomas using data from The Cancer Genome Atlas. *Mol Med Rep.* 2016 May;13(5):4259–65.
  50. Hayes DN, Van Waes C, Seiwert TY. Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015 Oct;33(29):3227–34.
  51. Pfisterer K, Fusi A, Klinghammer K, Knödler M, Nonnenmacher A, Keilholz U. PI3K/PTEN/AKT/mTOR polymorphisms: association with clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cetuximab-docetaxel. *Head Neck.* 2015 Apr;37(4):471–8.
  52. Henderson S, Fenton T. APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer drivers. *Trends Mol Med.* 2015 May;21(5):274–84.
  53. Faden DL, Thomas S, Cantalupo PG, Agrawal N, Myers J, DeRisi J. Multi-modality analysis supports APOBEC as a major source of mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017 Nov;74:8–14.
  54. De Cecco L, Nicolau M, Giannoccaro M, Daidone MG, Bossi P, Locati L, et al. Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data. *Oncotarget.* 2015 Apr;6(11):9627–42.
  55. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018/03/03. 2018;18(5):269–82.
  56. Martin LM, Marples B, Coffey M, Lawler M, Lynch TH, Hollywood D, et al. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat Rev.* 2010 Nov;36(7):518–27.

57. Tonella L, Giannoccaro M, Alfieri S, Canevari S, De Cecco L. Gene Expression Signatures for Head and Neck Cancer Patient Stratification: Are Results Ready for Clinical Application? *Curr Treat Options Oncol*. 2017 May;18(5):32.
58. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011 Aug;333(6046):1157–60.
59. Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, et al. Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2019/04/27. 2019;7(APR):52.
60. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010 Dec;70(23):9969–78.
61. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014;4:62.
62. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*. 2019 Mar;18(1):63.
63. Amit M, Takahashi H, Dragomir MP, Lindemann A, Gleber-Netto FO, Pickering CR, et al. Loss of p53 drives neuron reprogramming in head and neck cancer. *Nature*. 2020 Feb;578(7795):449–54.
64. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2020/01/02. 2020;382(1):60–72.
65. Guo K, Xiao W, Chen X, Zhao Z, Lin Y, Chen G. Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer: A Population-Based Study. *Biomed Res Int*. 2021/08/03. 2021;2021:1738932.
66. Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*. 2022;233(9):780–6.
67. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7–34.
68. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancer. [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 30]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>
69. Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Zhao L, Boakye EA, Olomukoro SI, Deshields T, et al. Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer*. 2018 Oct;124(20):4072–9.
70. World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2022 Dec 30]. Available from: <https://gco.iarc.fr>
71. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb;354(6):567–78.
72. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2008/09/12. 2008;359(11):1116–27.
73. Kitamura N, Sento S, Yoshizawa Y, Sasabe E, Kudo Y, Yamamoto T. Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021/01/02. 2020;22(1).
74. Kofler B, Laban S, Busch CJ, Lörincz B, Knecht R. New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2014;271(7):1861–7.
75. Cohen MA, Weinstein GS, O'Malley Jr BW, Feldman M, Quon H. Transoral robotic surgery and human papillomavirus status: oncologic results. *Head Neck*. 2011;33(4):573–80.
76. Baur M, Kienzer H, Schweiger J, DeSantis M, Gerber E, Pont J, et al. Docetaxel/cisplatin as first-line chemotherapy in patients with head and neck carcinoma:

- A Phase II trial. *Cancer Interdiscip Int J Am Cancer Soc.* 2002;94(11):2953–8.
77. Glisson BS, Murphy BA, Frenette G, Khuri FR, Forastiere AA. Phase II trial of docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1593–9.
  78. Caponigro F, Massa E, Manzione L, Rosati G, Biglietto M, De Lucia L, et al. Docetaxel and cisplatin in locally advanced or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase II study of the Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG). *Ann Oncol.* 2001;12(2):199–202.
  79. Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK, Weber RS, Rosenthal DI, Soulieres D, et al. Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *J Clin Oncol.* 2014;32(34):3858.
  80. Langendijk JA, Doornaert P, Verdonck-de Leeuw IM, Leemans CR, Aaronson NK, Slotman BJ. Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2008;26(22):3770–6.
  81. Kaidar-Person O, Gil Z, Billan S. Precision medicine in head and neck cancer. *Drug Resist Updat.* 2018;40:13–6.
  82. Douglas JG, Laramore GE, Austin-Seymour M, Koh W, Stelzer K, Griffin TW. Treatment of locally advanced adenoid cystic carcinoma of the head and neck with neutron radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;46(3):551–7.
  83. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013 Jan;73(1):128–38.
  84. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2013 Mar;73(6):1733–41.
  85. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):956–65.
  86. Ferris RL, Blumenschein Jr G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2016;375:1856–67.
  87. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006/08/01. 2006;169(2):338–46.
  88. Actor JK. Chapter 4 - T Lymphocytes: Ringleaders of Adaptive Immune Function. In: Actor JK, editor. *Introductory Immunology (Second Edition)*. Second Edi. Academic Press; 2019. p. 45–62.
  89. Puglielli MT, Ahmed R. PERSISTENT VIRAL INFECTION. In: Granoff A, Webster RG, editors. *Encyclopedia of Virology (Second Edition)*. Second Edi. Oxford: Elsevier; 1999. p. 1200–5.
  90. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018 Jul;19(7):665–73.
  91. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
  92. Janeway CA Jr, Walport M, et al. TP. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. 5th, editor. New York: Garland Science; 2001.
  93. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol.* 2006;24(1):419–66.
  94. Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol.* 2013;4:302.
  95. i Repertoire. B cell and T cell structure and function [Internet]. [cited 2022 Dec 30]. Available from: <https://irepertoire.com/t-cell-and-b-cell-overview/>

96. Gorer PA. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol.* 1937;44(3):691–7.
97. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.* 1948;49(2):87–108.
98. Spurgin LG, Richardson DS. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proceedings Biol Sci.* 2010 Apr;277(1684):979–88.
99. La Gruta NL, Gras S, Daley SR, Thomas PG, Rossjohn J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(7):467–78.
100. Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology.* 2003 Oct;110(2):163–9.
101. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1993;364(6432):33–9.
102. Li Y, Yin Y, Mariuzza RA. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Front Immunol.* 2013;4:206.
103. Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B.  $\gamma\delta$  T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(4):221–32.
104. Ott JA, Ohta Y, Flajnik MF, Criscitiello MF. Lost structural and functional inter-relationships between Ig and TCR loci in mammals revealed in sharks. *Immunogenetics.* 2021 Feb;73(1):17–33.
105. Ryu CJ, Haines BB, Lee HR, Kang YH, Draganov DD, Lee M, et al. The T-cell receptor beta variable gene promoter is required for efficient V beta rearrangement but not allelic exclusion. *Mol Cell Biol.* 2004 Aug;24(16):7015–23.
106. Shih H-Y, Hao B, Krangel MS. Orchestrating T-cell receptor  $\alpha$  gene assembly through changes in chromatin structure and organization. *Immunol Res.* 2011 Apr;49(1–3):192–201.
107. Li F, Zhang H, Wang W, Yang P, Huang Y, Zhang J, et al. T cell receptor  $\beta$ -chain-targeting chimeric antigen receptor T cells against T cell malignancies. *Nat Commun.* 2022;13(1):4334.
108. Mak TW, Saunders ME, Jett BD, editors. Chapter 8 - The T Cell Receptor: Proteins and Genes. In: *Primer to the Immune Response (Second Edition)*. Second Edi. Boston: Academic Cell; 2014. p. 181–96.
109. Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell.* 2004 Jan;116(2):299–311.
110. Aran A, Garrigós L, Curigliano G, Cortés J, Martí M. Evaluation of the TCR Repertoire as a Predictive and Prognostic Biomarker in Cancer: Diversity or Clonality? *Cancers (Basel).* 2022/04/13. 2022;14(7).
111. Rosati E, Dowds CM, Liaskou E, Henriksen EKK, Karlsen TH, Franke A. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):61.
112. Robins HS, Srivastava SK, Campregher P V, Turtle CJ, Andriesen J, Riddell SR, et al. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med.* 2010 Sep;2(47):47ra64.
113. Pai JA, Satpathy AT. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies. *Nat Methods.* 2021 Aug;18(8):881–92.
114. Arunkumar M, Zielinski CE. T-Cell Receptor Repertoire Analysis with Computational Tools-An Immunologist's Perspective. *Cells.* 2021 Dec;10(12).
115. Chiffelle J, Genolet R, Perez MA, Coukos G, Zoete V, Harari A. T-cell repertoire analysis and metrics of diversity and clonality. *Curr Opin Biotechnol.* 2020/09/06. 2020;65:284–95.
116. Attaf M, Huseby E, Sewell AK.  $\alpha\beta$  T cell receptors as predictors of health and disease. *Cell Mol Immunol.* 2015 Jul;12(4):391–9.
117. Shugay M, Britanova O V, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods.* 2014;11(6):653–5.

118. Rapid amplification of 5' complementary DNA ends (5' RACE). *Nat Methods*. 2005 Aug;2(8):629–30.
119. Okino ST, Kong M, Sarras H, Wang Y. Evaluation of bias associated with high-multiplex, target-specific pre-amplification. *Biomol Detect Quantif*. 2016 Jan;6:13–21.
120. Verdaguer H, Saurí T, Macarulla T. Predictive and prognostic biomarkers in personalized gastrointestinal cancer treatment. *J Gastrointest Oncol Vol 8, No 3 (June 23, 2017) J Gastrointest Oncol (Novel Biol Era Precis Med*. 2016;
121. Pezo RC, Bedard PL. Definition: Translational and personalised medicine, biomarkers, pharmacodynamics. *ESMO Handb Transl Res*. 2015;
122. Liu Z, Zhao Q, Zheng Z, Liu S, Meng L, Dong L, et al. Vascular normalization in immunotherapy: A promising mechanisms combined with radiotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2021/05/10. 2021;139:111607.
123. Tian L, Goldstein A, Wang H, Lo HC, Kim IS, Welte T, et al. Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming. *Nature*. 2017/04/04. 2017;544(7649):250–4.
124. Kidman J, Principe N, Watson M, Lassmann T, Holt RA, Nowak AK, et al. Characteristics of TCR Repertoire Associated With Successful Immune Checkpoint Therapy Responses. *Front Immunol*. 2020/11/10. 2020;11:587014.
125. Rudqvist NP, Pilonis KA, Lhuillier C, Wennerberg E, Sidhom JW, Emerson RO, et al. Radiotherapy and CTLA-4 blockade shape the tcr repertoire of tumor-infiltrating t cells. *Cancer Immunol Res*. 2017/11/29. 2018;6(2):139–50.
126. Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci Transl Med*. 2014/09/19. 2014;6(254):254ra128.
127. Joshi K, Milighetti M, Chain BM. Application of T cell receptor (TCR) repertoire analysis for the advancement of cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2021/08/29. 2022;74:1–8.
128. Patrinely JRJ, Dewan AK, Johnson DB. The Role of Anti-PD-1/PD-L1 in the Treatment of Skin Cancer. *BioDrugs*. 2020 Aug;34(4):495–503.
129. Willsmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, Reci S, Gupta A, Harris RJ, et al. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action. *Eur J Immunol*. 2021;51(3):544–56.
130. Wang X, Muzaffar J, Kirtane K, Song F, Johnson M, Schell MJ, et al. T cell repertoire in peripheral blood as a potential biomarker for predicting response to concurrent cetuximab and nivolumab in head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother cancer*. 2022 Jun;10(6).
131. Baxevanis CN, Gritzapis AD, Voutsas IF, Batsaki P, Goulielmaki M, Adamaki M, et al. T-Cell Repertoire in Tumor Radiation: The Emerging Frontier as a Radiotherapy Biomarker. *Cancers (Basel)*. 2022 May;14(11).
132. Chow J, Hoffend NC, Abrams SI, Schwaab T, Singh AK, Muhitch JB. Radiation induces dynamic changes to the T cell repertoire in renal cell carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020/09/10. 2020;117(38):23721–9.
133. Goulielmaki M, Davanos N, Kogionou P, Batsaki P, Stokidis S, Adamaki M, et al. The impact of radiation therapy on the TCR V $\beta$  chain repertoire in patients with prostate cancer. *Int J Oncol*. 2022 Jun;60(6).
134. Wu L, Zhu J, Rudqvist N-P, Welsh J, Lee P, Liao Z, et al. T-Cell Receptor Profiling and Prognosis After Stereotactic Body Radiation Therapy For Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2021;12:719285.
135. Naimi A, Mohammed RN, Raji A, Chupradit S, Yumashev AV, Suksatan W, et al. Tumor immunotherapies by immune checkpoint inhibitors (ICIs); the pros and cons. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):44.
136. Carretero R, Sektioglu IM, Garbi N, Salgado OC, Beckhove P, Hämmerling GJ. Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2015;16(6):609–17.
137. Formenti SC, Rudqvist N-P, Golden E, Cooper B, Wennerberg E, Lhuillier C, et al.

- Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade. *Nat Med.* 2018;24(12):1845–51.
138. Invitrogen. PureLink® Genomic DNA Kits [Internet]. Available from: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fpurelink\\_genomic\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fpurelink_genomic_man.pdf)
  139. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium . Vol. 9, *Frontiers in Pharmacology* . 2018.
  140. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Woolgar JA, Triantafyllou A, et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol.* 2012;48(9):775–9.
  141. Kulasinghe A, Schmidt H, Perry C, Whitfield B, Kenny L, Nelson C, et al. A Collective Route to Head and Neck Cancer Metastasis. *Sci Rep.* 2018;8(1):746.
  142. Piotrowski I, Zhu X, Saccon TD, Ashiqueali S, Schneider A, de Carvalho Nunes AD, et al. miRNAs as Biomarkers for Diagnosing and Predicting Survival of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancers (Basel).* 2021 Aug;13(16).
  143. Zhong Q, Fang J, Huang Z, Yang Y, Lian M, Liu H, et al. A response prediction model for taxane, cisplatin, and 5-fluorouracil chemotherapy in hypopharyngeal carcinoma. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–8.
  144. Hasegawa Y, Goto M, Hanai N, Ozawa T, Hirakawa H. Predictive biomarkers for combined chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in oro-and hypopharyngeal cancers. *Mol Clin Oncol.* 2018;8(2):378–86.
  145. Thomaidou AC, Batsaki P, Adamaki M, Goulielmaki M, Baxevanis CN, Zoumpourlis V, et al. Promising Biomarkers in Head and Neck Cancer: The Most Clinically Important miRNAs. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul;23(15).
  146. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020 Jul;18(7):873–98.
  147. Chen S-W, Li S-H, Shi D-B, Jiang W-M, Song M, Yang A-K, et al. Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Int J Biol Markers.* 2019;34(4):398–405.
  148. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261–8.
  149. Yang H, Zhou X, Sun L, Mao Y. Correlation between PD-L2 expression and clinical outcome in solid cancer patients: a meta-analysis. *Front Oncol.* 2019;9:47.
  150. Vareki SM, Garrigós C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;116:116–24.
  151. De Keukeleire SJ, Vermassen T, Hilgert E, Creytens D, Ferdinande L, Rottey S. Immuno-Oncological Biomarkers for Squamous Cell Cancer of the Head and Neck: Current State of the Art and Future Perspectives. *Cancers (Basel).* 2021 Apr;13(7).
  152. Ojlert AK, Nebdal D, Snapkov I, Olsen V, Kidman J, Greiff V, et al. Dynamic changes in the T cell receptor repertoire during treatment with radiotherapy combined with an immune checkpoint inhibitor. *Mol Oncol.* 2021/08/18. 2021;15(11):2958–68.
  153. Wang M, Gao P, Ren L, Duan J, Yang S, Wang H, et al. Profiling the peripheral blood T cell receptor repertoires of gastric cancer patients. *Front Immunol.* 2022;13:848113.
  154. Cui J-H, Lin K-R, Yuan S-H, Jin Y-B, Chen X-P, Su X-K, et al. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:2729.
  155. Valpione S, Mundra PA, Galvani E, Campana LG, Lorigan P, De Rosa F, et al. The T cell receptor repertoire of tumor infiltrating T cells is predictive and prognostic for cancer survival. *Nat Commun.* 2021;12(1):4098.
  156. Dovedi SJ, Cheadle EJ, Popple AL, Poon E, Morrow M, Stewart R, et al. Fractionated Radiation Therapy Stimulates Antitumor Immunity Mediated by Both Resident and Infiltrating Polyclonal T-cell Populations when Combined with PD-1 Blockade. *Clin*



- cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res. 2017 Sep;23(18):5514–26.
157. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med*. 2006 May;203(5):1259–71.
  158. Kansy BA, Shayan G, Jie H-B, Gibson SP, Lei YL, Brandau S, et al. T cell receptor richness in peripheral blood increases after cetuximab therapy and correlates with therapeutic response. *Oncoimmunology*. 2018;7(11):e1494112.
  159. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229–65.
  160. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity*. 2014 Nov;41(5):843–52.
  161. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res*. 2011 Apr;71(7):2488–96.
  162. Rodríguez-Ruiz ME, Vanpouille-Box C, Melero I, Formenti SC, Demaria S. Immunological Mechanisms Responsible for Radiation-Induced Abscopal Effect. *Trends Immunol*. 2018 Aug;39(8):644–55.
  163. Meysman P, De Neuter N, Gielis S, Bui Thi D, Ogunjimi B, Laukens K. On the viability of unsupervised T-cell receptor sequence clustering for epitope preference. *Bioinformatics*. 2019 May;35(9):1461–8.
  164. Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, et al. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *J Immunol*. 2008 Sep;181(5):3099–107.
  165. Lim JYH, Gerber SA, Murphy SP, Lord EM. Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Mar;63(3):259–71.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Ασθενής ΒΚ1

Πίνακας Π25. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

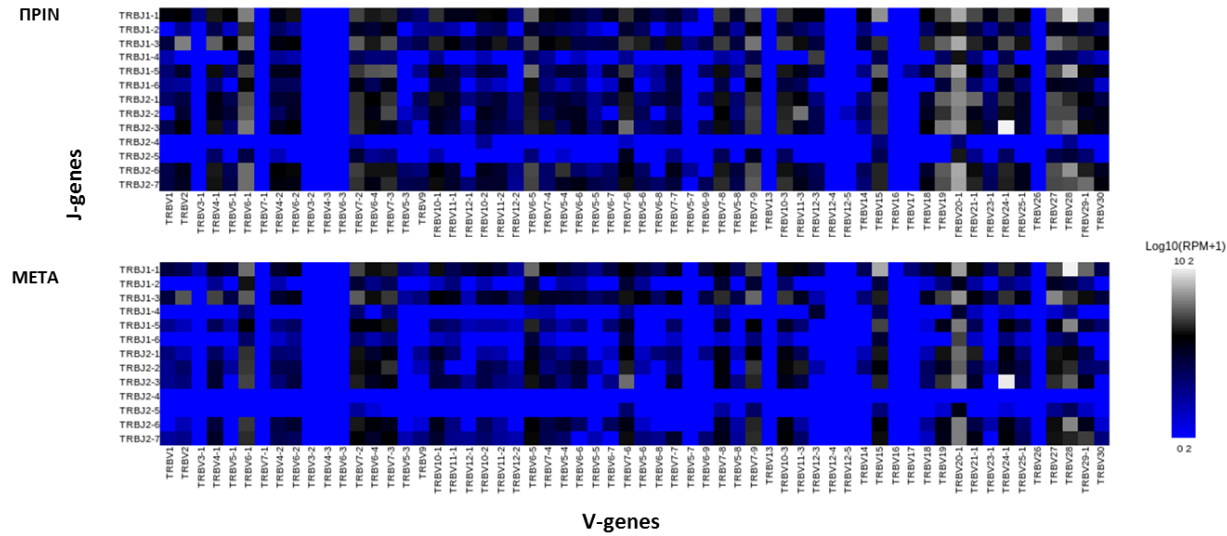
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV24-1	TRBJ1-5	ATSDPGTGREAAPA	GCCACCAGTGACCCCGGGACAGGGCGTGAGGCAGCCCCAGCAT	TRBD1	78172	0,104817429	1	2
TRBV28	TRBJ2-7	ASSLGRGYEQY	GCCAGCAGTTTGGGCAGGGGTACGAGCAGTAC	TRBD1	40365	0,05412367	2	1
TRBV28	TRBJ2-3	ASSFMSLTDQY	GCCAGCAGTTTATGTCCCTCACAGATACGCAGTAT		17250	0,023129773	3	4
TRBV15	TRBJ2-7	ATSGGTGEDEQY	GCCACCAGCGGTGGGACAGGGGAGGATGAGCAGTAC	TRBD1	9566	0,012826633	4	3
TRBV2	TRBJ2-5	ASSGTDTPQY	GCCAGCAGTGGAAACCGATACCGGGCCCCAGTAC		7243	0,009711823	5	11
TRBV28	TRBJ1-2	ASSMTGSYGYT	GCCAGCAGTATGACAGGAAGCTATGGCTACACC	TRBD1	6698	0,008981056	6	5
TRBV11-3	TRBJ1-6	ASSTG*RQGD*FTPP	GCCAGCAGCACGGGATAGCGACAGGGGATTAATTCACCCCTCCAC	TRBD1	6224	0,00834549	7	25
TRBV28	TRBJ2-7	ASSWGGWDPYEYQ	GCCAGCAGTTGGGGTGGGTGGGACCCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	5406	0,00724867	8	6
TRBV7-6	TRBJ1-5	ASSLAAEGL*QSAPA	GCCAGCAGCTTAGCGGCGGAGGGTCTATAGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD2	5180	0,006945636	9	7
TRBV6-5	TRBJ2-3	ASSYLARGTDTQY	GCCAGCAGTTACTTGGCGGGGCGCGGAACAGATACGCAGTAT	TRBD2	5054	0,006776688	10	27

Πίνακας 26. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

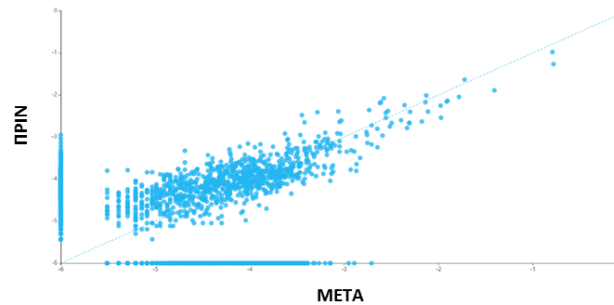
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV28	TRBJ2-7	ASSLGRGYEQY	GCCAGCAGTTTGGGCAGGGGTACGAGCAGTAC	TRBD1	159893	0,165323035	1	2
TRBV24-1	TRBJ1-5	ATSDPGTGREAAPA	GCCACCAGTGACCCCGGGACAGGGCGTGAGGCAGCCCCAGCAT	TRBD1	155925	0,16122028	2	1
TRBV15	TRBJ2-7	ATSGGTGEDEQY	GCCACCAGCGGTGGGACAGGGGAGGATGAGCAGTAC	TRBD1	37859	0,039144708	3	4
TRBV28	TRBJ2-3	ASSFMSLTDQY	GCCAGCAGTTTATGTCCCTCACAGATACGCAGTAT		18277	0,018897695	4	3
TRBV28	TRBJ1-2	ASSMTGSYGYT	GCCAGCAGTATGACAGGAAGCTATGGCTACACC	TRBD1	15970	0,016512348	5	6
TRBV28	TRBJ2-7	ASSWGGWDPYEYQ	GCCAGCAGTTGGGGTGGGTGGGACCCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	12064	0,012473699	6	8
TRBV7-6	TRBJ1-5	ASSLAAEGL*QSAPA	GCCAGCAGCTTAGCGGCGGAGGGTCTATAGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD2	11821	0,012222446	7	9
TRBV27	TRBJ2-5	ASSPRWQETQY	GCCAGCAGTCTCGTTGGCAAGAGACCCAGTAC		10289	0,010638419	8	23
TRBV28	TRBJ2-7	ASSPEGGGFSYEYQ	GCCAGCAGTCCCGAGGGCGGGGTTTTCTACGAGCAGTAC	TRBD2	10188	0,010533989	9	14
TRBV6-5	TRBJ2-7	ASSYSRQADPTSS	GCCAGCAGTTACTCCAGGGGACAGGCCGACCCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	7488	0,007742296	10	18

BK1

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π1. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

### Ασθενής BK5

Πίνακας Π3. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

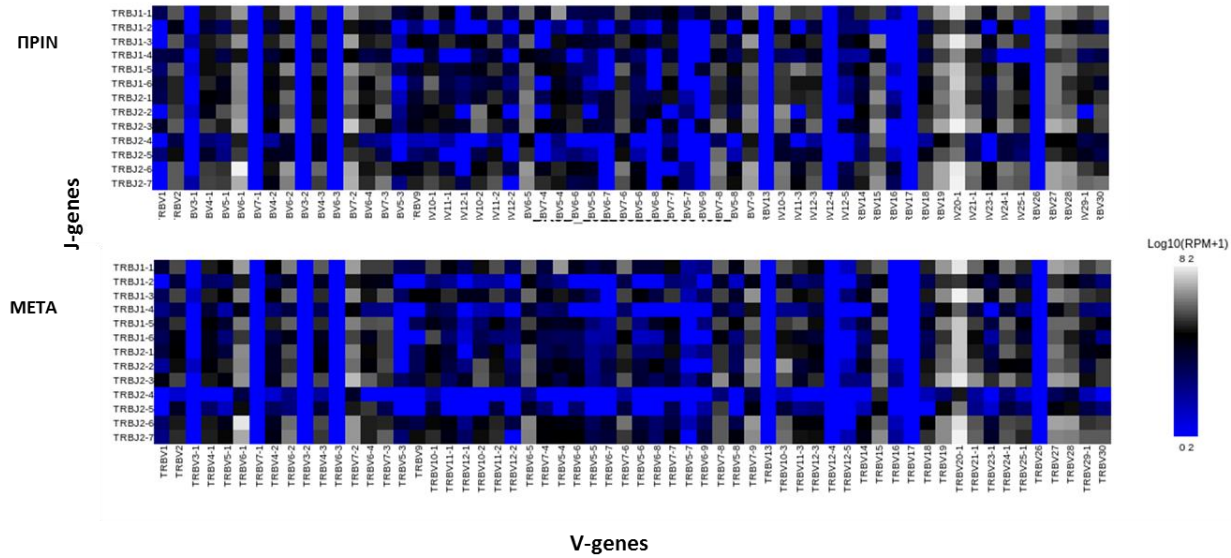
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV6-1	TRBJ1-2	ASTDAGGLARVAT	GCCAGCACCGATGCGGGGGGGGGCTGGCTAGGGTGGCTACACC	TRBD2	19293	0,014724345	1	2
TRBV20-1	TRBJ2-5	SAAPRGRGQETQY	AGTGCCGCTCCCGGGGCGAGGGGCAAGAGACCCAGTAC	TRBD1	12164	0,009283519	2	1
TRBV6-1	TRBJ1-2	ASTDAGGGWLGWLH	GCCAGCACCGATGCGGGGGGGGGCTGGCTAGGGTGGCTACACC	TRBD2	9315	0,007109173	3	7
TRBV20-1	TRBJ1-1	SAPGVGNTEAF	AGTGCTCCGGGGGTGGGGAACACTGAAGCTTTC	TRBD2	7728	0,005897981	4	3
TRBV5-4	TRBJ2-7	ASSRGTGSYEYQY	GCCAGCAGCCGAGGGACAGGGTCATACGAGCAGTAC	TRBD1	7282	0,005557595	5	4
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSIDRNQPQH	GCCAGCAGTATCGACAGAAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	6854	0,005230947	6	6
TRBV20-1	TRBJ2-2	SAAGFTGELF	AGTGCGGCCGGGTTACCCGGGGAGCTGTTT		6361	0,004854691	7	8
TRBV21-1	TRBJ1-5	ASSIGPRHHSNQPQH	GCCAGCAGCATAGGGCCGAGACACCATAGCAATCAGCCCCAGCAT		5474	0,004177736	8	11
TRBV10-2	TRBJ1-6	ASSEETGLIHPS	GCCAGCAGTGAGGAGACAGGGGGCTTAATTCACCCCTCCAC	TRBD1	4609	0,003517571	9	20
TRBV10-3	TRBJ1-6	AISEWYGGAFTPP	GCCATCAGTGAGTGGTATGGGGGCGCGTTACCCCTCCAC	TRBD1	4499	0,00343362	10	5

Πίνακας Π4. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

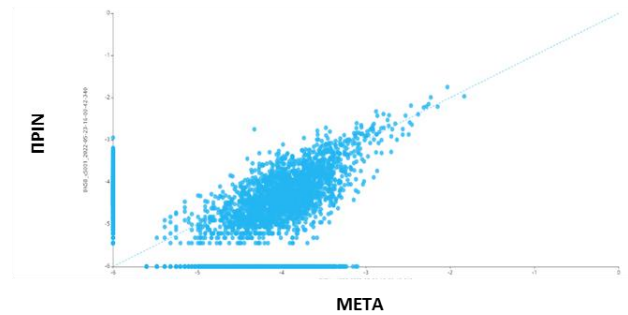
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV20-1	TRBJ2-5	SAAPRGRGQETQY	AGTGCCGCTCCCGGGGCGAGGGGCAAGAGACCCAGTAC	TRBD1	14011	0,017864543	1	2
TRBV6-1	TRBJ1-2	ASTDAGGLARVAT	GCCAGCACCGATGCGGGGGGGGGCTGGCTAGGGTGGCTACACC	TRBD2	8453	0,010777887	2	1
TRBV20-1	TRBJ1-1	SAPGVGNTEAF	AGTGCTCCGGGGGTGGGGAACACTGAAGCTTTC	TRBD2	7996	0,010195195	3	4
TRBV5-4	TRBJ2-7	ASSRGTGSYEYQY	GCCAGCAGCCGAGGGACAGGGTCATACGAGCAGTAC	TRBD1	5522	0,007040754	4	5
TRBV10-3	TRBJ1-6	AISEWYGGAFTPP	GCCATCAGTGAGTGGTATGGGGGCGCGTTACCCCTCCAC	TRBD1	5105	0,006509064	5	10
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSIDRNQPQH	GCCAGCAGTATCGACAGAAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	4843	0,006175004	6	6
TRBV6-1	TRBJ1-2	ASTDAGGGWLGWLH	GCCAGCACCGATGCGGGGGGGGGCTGGCTAGGGTGGCTACACC	TRBD2	4811	0,006134203	7	3
TRBV20-1	TRBJ2-2	SAAGFTGELF	AGTGCGGCCGGGTTACCCGGGGAGCTGTTT		4608	0,00587537	8	7
TRBV20-1	TRBJ2-2	SASPSGGRTGELF	AGTGCTAGCCCTCCGGGGGGGGCCGACCGGGGAGCTGTTT	TRBD2	3713	0,004734212	9	36
TRBV20-1	TRBJ2-1	SASSGRANEQF	AGTGCTAGTAGCGGGAGTCGGGCAATGAGCAGTTC	TRBD2	3218	0,004103069	10	25

BK5

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π2. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

## Ασθενής BK6

Πίνακας Π5. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

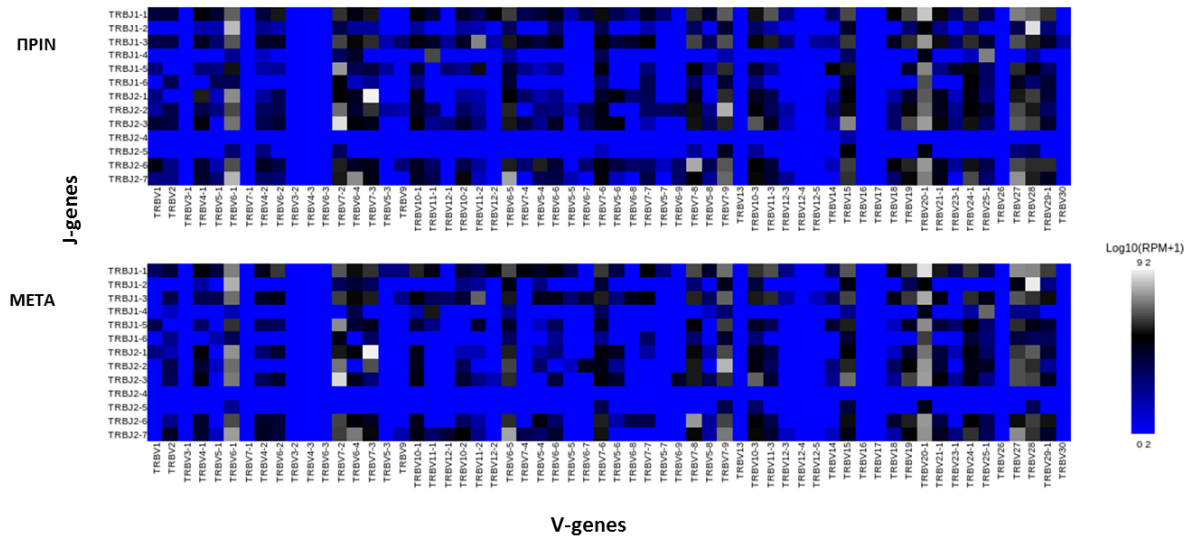
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV7-3	TRBJ2-1	ASSYTSTGEQF	GCCAGCAGCTACACCTCGACAGGGGAGCAGTTC	TRBD1	47521	0,117823096	1	1
TRBV28	TRBJ2-6	ASSWGTGANVLT	GCCAGCAGTTGGGGGACTGGGGCCAACGTCCTGACT	TRBD2	30145	0,074741214	2	2
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSQGNPQPH	GCCAGCAGCCAGGGCCCAAATCAGCCCAGCAT	TRBD1	16639	0,041254571	3	3
TRBV6-1	TRBJ2-6	ASRWGAGANVLT	GCCAGCAGATGGTCGGGGCCGGGGCCAACGTCCTGACT	TRBD1	15179	0,037634662	4	5
TRBV20-1	TRBJ2-7	SARSHRGPTYEQY	AGTGCTAGAAGTCACAGGGGCCACCTACGAGCAGTAC	TRBD1	11996	0,029742763	5	4
TRBV7-8	TRBJ1-2	ASSLVRMAT	GCCAGCAGCTTAGTCAGGATGGCTACACC		11306	0,028031984	6	8
TRBV6-5	TRBJ1-1	ASSYQGATEAF	GCCAGCAGTTACCAGGGAGCCACTGAAGCTTTC	TRBD1	9105	0,022574847	7	6
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSQGNPQPS	GCCAGCAGCCAGGGCCCAAATCAGCCCAGCAT	TRBD1	8949	0,022188062	8	13
TRBV6-1	TRBJ1-1	ASSKQGTTEAF	GCCAGCAGTAAACAGGGAACCACTGAAGCTTTC	TRBD1	8475	0,021012831	9	11
TRBV7-9	TRBJ1-6	ASSSHSMTGIHSPLH	GCCAGCAGCTCTCACAGCATGACAGGGATACATTACCCCTCCAC	TRBD1	7420	0,018397074	10	7

Πίνακας Π6. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

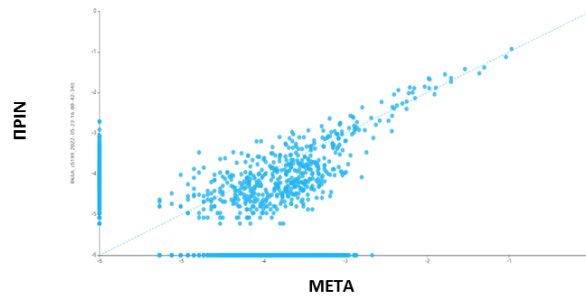
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV7-3	TRBJ2-1	ASSYTSTGEQF	GCCAGCAGCTACACCTCGACAGGGGAGCAGTTC	TRBD1	48381	0,106779167	1	1
TRBV28	TRBJ2-6	ASSWGTGANVLT	GCCAGCAGTTGGGGGACTGGGGCCAACGTCCTGACT	TRBD2	41435	0,091449015	2	2
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSQGNPQPH	GCCAGCAGCCAGGGCCCAAATCAGCCCAGCAT	TRBD1	22481	0,049616636	3	3
TRBV20-1	TRBJ2-7	SARSHRGPTYEQY	AGTGCTAGAAGTCACAGGGGCCACCTACGAGCAGTAC	TRBD1	19556	0,043161022	4	5
TRBV6-1	TRBJ2-6	ASRWGAGANVLT	GCCAGCAGATGGTCGGGGCCGGGGCCAACGTCCTGACT	TRBD1	13081	0,028870389	5	4
TRBV6-5	TRBJ1-1	ASSYQGATEAF	GCCAGCAGTTACCAGGGAGCCACTGAAGCTTTC	TRBD1	8854	0,019541199	6	7
TRBV7-9	TRBJ1-6	ASSSHSMTGIHSPLH	GCCAGCAGCTCTCACAGCATGACAGGGATACATTACCCCTCCAC	TRBD1	8853	0,019538992	7	10
TRBV7-8	TRBJ1-2	ASSLVRMAT	GCCAGCAGCTTAGTCAGGATGGCTACACC		7460	0,016464575	8	6
TRBV6-1	TRBJ2-1	ASGTLWEQF	GCCAGCGGAACCTTGTGGGAGCAGTTC		5756	0,012703766	9	13
TRBV7-9	TRBJ1-6	ASSSHDREGANSPLH	GCCAGCAGCTCGCACGACAGGGAAGGTGCGAATTCACCCCTCCAC	TRBD1	5561	0,012273391	10	19

BK6

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π3. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνοί συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαριστάται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.



## Ασθενής BK12

Πίνακας Π7. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

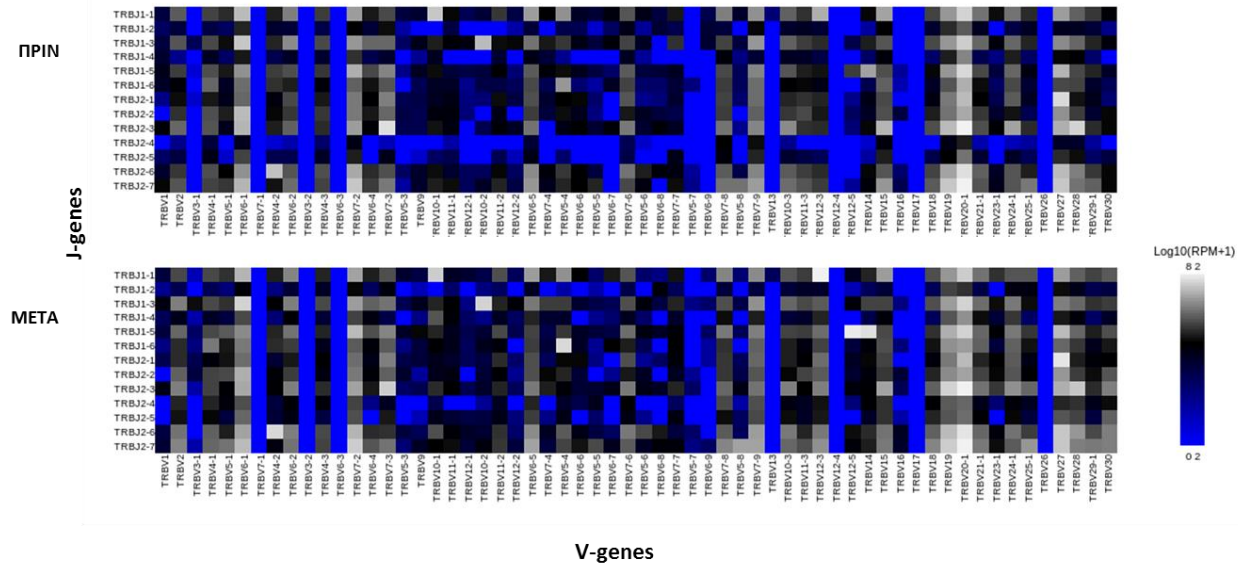
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV7-3	TRBJ1-5	ASSLGGNQPH	GCCAGCAGCTTAGGGGTAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	19631	0,018187984	1	9
TRBV27	TRBJ2-1	ASSFYGRGHGSYNEQF	GCCAGCAGTTTCTATGGCAGGGGGCACGGTTCATACAATGAGCAGTTC	TRBD1	18102	0,016771376	2	1
TRBV20-1	TRBJ1-5	SARSMAERNQPH	AGTGCTAGATCCAGGATGGCCGAAAGAAATCAGCCCCAGCAT		14247	0,013199745	3	10
TRBV10-1	TRBJ2-7	ASSES*RGGRAV	GCCAGCAGTGAGTCCTAGCGGGGAGGTCGAGCAGTAC	TRBD2	13265	0,012289929	4	8
TRBV28	TRBJ1-5	ASRRHRGMHQPH	GCCAGCAGAAGACACAGGGGGATGCATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	13225	0,01225287	5	12
TRBV4-2	TRBJ1-2	ASSQGGPEGLWLH	GCCAGCAGCCAAGGGGGCCCCGAAGGACTATGGCTACACC	TRBD1	12356	0,011447747	6	3
TRBV10-2	TRBJ2-5	ASSEGLAVGETQY	GCCAGCAGTGAGTCGGGACTAGCGGTGGGAGAGACCCAGTAC	TRBD2	11765	0,01090019	7	6
TRBV6-1	TRBJ2-5	ASR*RGGNPRDPV	GCCAGCCGATAGCGGGGGAAATCCAAGAGACCCAGTAC	TRBD2	9204	0,008527441	8	11
TRBV20-1	TRBJ1-1	SARDPQGPWNTEAF	AGTGCTAGAGATCCCCAGGGGCCAGGATGGAACACTGAAGCTTTC	TRBD1	8216	0,007612066	9	16
TRBV6-1	TRBJ1-6	ASSEHSPLH	GCCAGCAGTGAACATTCACCCCTCCAC		8094	0,007499034	10	21

Πίνακας Π8. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

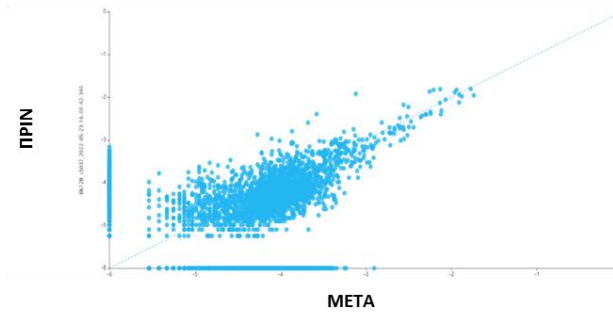
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV27	TRBJ2-1	ASSFYGRGHGSYNEQF	GCCAGCAGTTTCTATGGCAGGGGGCACGGTTCATACAATGAGCAGTTC	TRBD1	6768	0,015758518	1	2
TRBV14	TRBJ2-3	ASSQIGSTDTQY	GCCAGCAGCCAAATCGGTAGCACAGATACGCAGTAT		6637	0,0154535	2	11
TRBV4-2	TRBJ1-2	ASSQGGPEGLWLH	GCCAGCAGCCAAGGGGGCCCCGAAGGACTATGGCTACACC	TRBD1	6395	0,01489003	3	6
TRBV5-4	TRBJ2-2	ASSFSDSPGELF	GCCAGCAGCTTCTCGGACAGTCCCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	6382	0,014859761	4	13
TRBV12-3	TRBJ2-7	ASSLPPPYPYEQY	GCCAGCAGTTTAGGTCCCCGGGACACCCTTACGAGCAGTAC	TRBD1	5836	0,013588462	5	16
TRBV10-2	TRBJ2-5	ASSEGLAVGETQY	GCCAGCAGTGAGTCGGGACTAGCGGTGGGAGAGACCCAGTAC	TRBD2	5634	0,013118128	6	7
TRBV12-5	TRBJ2-3	ASGLGGFTQY	GCTAGTGGTTTGGGGGGGGTTTACGCAGTAT	TRBD2	5178	0,012056384	7	79
TRBV10-1	TRBJ2-7	ASSES*RGGRAV	GCCAGCAGTGAGTCCTAGCGGGGAGGTCGAGCAGTAC	TRBD2	4965	0,011560438	8	4
TRBV7-3	TRBJ1-5	ASSLGGNQPH	GCCAGCAGCTTAGGGGTAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	4746	0,011050521	9	1
TRBV20-1	TRBJ1-5	SARSMAERNQPH	AGTGCTAGATCCAGGATGGCCGAAAGAAATCAGCCCCAGCAT		4509	0,010498694	10	3

BK12

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π4. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

## Ασθενής BK18

Πίνακας Π9. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

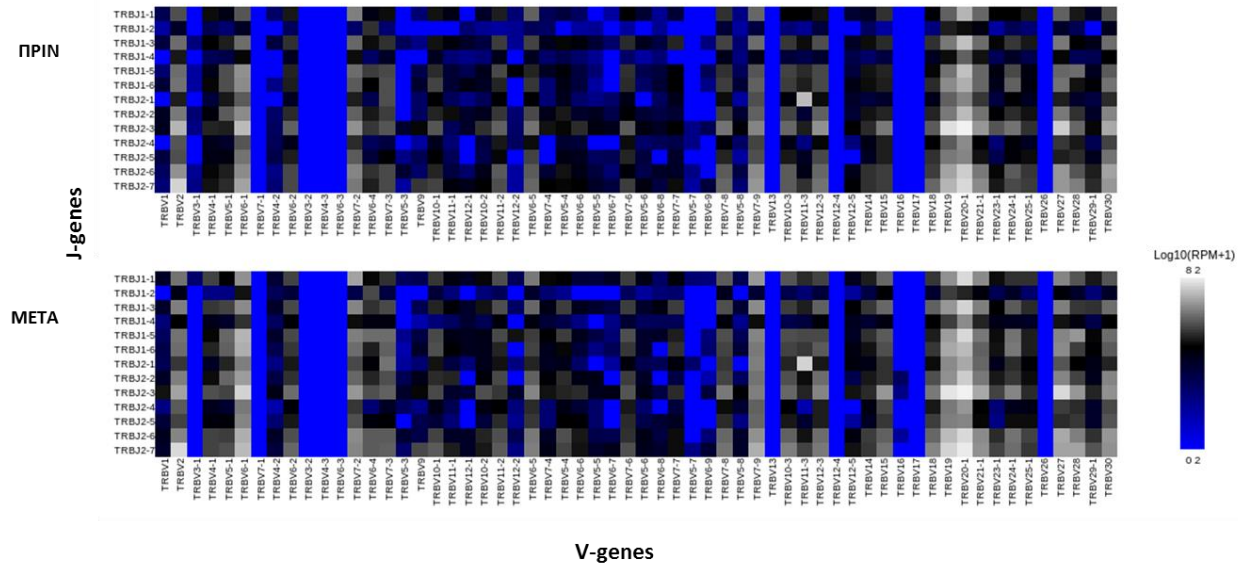
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV2	TRBJ1-1	ASGGTATVMNTEAF	GCCAGCGGGGGACAGCTACCGTTATGAACACTGAAGCTTTC	TRBD2	3119	0,015314891	1	2
TRBV11-3	TRBJ2-1	ASLTSGLNEQF	GCCAGCAGCTTAACGAGCGGGAGCTTGAATGAGCAGTTC	TRBD2	2991	0,014686386	2	1
TRBV27	TRBJ1-5	ASLDTGGNQPQH	GCCAGCAGTTTAGACACAGGGGGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	1893	0,009294995	3	3
TRBV6-1	TRBJ2-3	ASRRASTDTQY	GCCAGCAGGAGGGCTAGCACAGATACGCAGTAT	TRBD2	958	0,004703964	4	4
TRBV7-2	TRBJ2-7	ASSYSSYEYQY	GCCAGCAGCTCTTACAGCTCCTACGAGCAGTAC		767	0,003766118	5	6
TRBV28	TRBJ2-3	ASSLPGTDTQY	GCCAGCAGCTTGCCGGGCACAGATACGCAGTAT		596	0,002926475	6	2
TRBV5-1	TRBJ1-6	ASSSGWDSPLH	GCCAGCAGCTCAGGGGGCTGGGATTCACCCCTCCAC	TRBD1	482	0,002366713	7	12
TRBV7-3	TRBJ2-1	ASALGGYNEQF	GCCAGCGCTTTAGGGGGTTACAATGAGCAGTTC	TRBD1	351	0,001723478	8	8
TRBV5-1	TRBJ2-3	ASSLDGAPLSTDTQY	GCCAGCAGCTTGGACGGGGCACCCCTTAGCACAGATACGCAGTAT	TRBD1	335	0,001644915	9	13
TRBV19	TRBJ1-5	ASSTRDSNQPQH	GCCAGTAGTACACGGGACGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	332	0,001630184	10	19

Πίνακας Π10. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

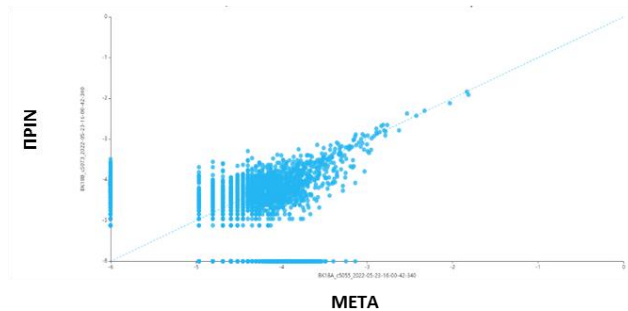
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV11-3	TRBJ2-1	ASLTSGLNEQF	GCCAGCAGCTTAACGAGCGGGAGCTTGAATGAGCAGTTC	TRBD2	4366	0,014502333	1	2
TRBV2	TRBJ1-1	ASGGTATVMNTEAF	GCCAGCGGGGGACAGCTACCGTTATGAACACTGAAGCTTTC	TRBD2	3679	0,012220358	2	1
TRBV27	TRBJ1-5	ASLDTGGNQPQH	GCCAGCAGTTTAGACACAGGGGGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	2285	0,007589975	3	3
TRBV6-1	TRBJ2-3	ASRRASTDTQY	GCCAGCAGGAGGGCTAGCACAGATACGCAGTAT	TRBD2	1496	0,004969192	4	4
TRBV28	TRBJ2-3	ASSLPGTDTQY	GCCAGCAGCTTGCCGGGCACAGATACGCAGTAT		1273	0,004228463	5	6
TRBV7-2	TRBJ2-7	ASSYSSYEYQY	GCCAGCAGCTCTTACAGCTCCTACGAGCAGTAC		1127	0,003743502	6	5
TRBV6-1	TRBJ2-2	ASSEKVSRRQGTGSC	GCCAGCAGTGAAAAAGTTTCAAGGCAGGGAACCCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	673	0,002235472	7	12
TRBV7-3	TRBJ2-1	ASALGGYNEQF	GCCAGCGCTTTAGGGGGTTACAATGAGCAGTTC	TRBD1	668	0,002218864	8	8
TRBV28	TRBJ1-1	ASRWAGVGTEAF	GCCAGCAGGTGGGCAGGGTGGGCACTGAAGCTTTC	TRBD1	629	0,002089319	9	13
TRBV7-9	TRBJ2-7	ASSARDRGAYEQY	GCCAGCAGCGCCGGGACAGGGGAGCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	541	0,001797014	10	17

BK18

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π5. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

## Ασθενής BK25

Πίνακας Π11. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

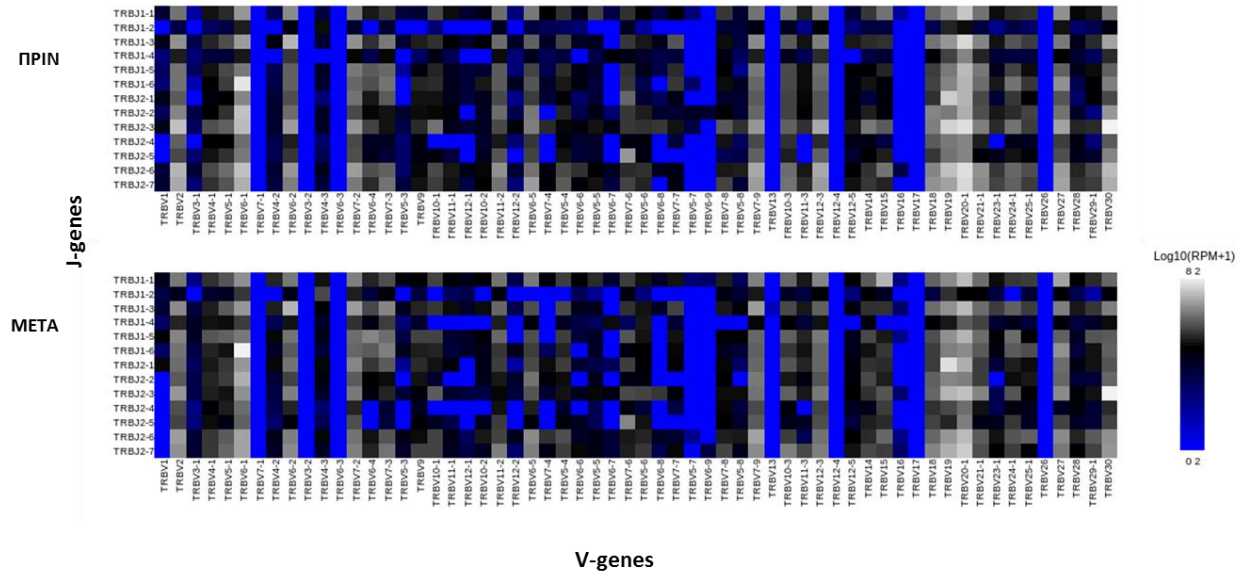
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV30	TRBJ1-5	AWAGQTNQPQH	GCCTGGGCTGGACAGACCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	6707	0,019667411	1	1
TRBV6-1	TRBJ2-2	ASRPPRYLLD*RGITRSRTPGSC	CCAAGATACCTCCTAGACTAGCGGGGGATCACCAGGTCCCGAACACC	TRBD2	5650	0,016567895	2	2
TRBV19	TRBJ2-1	ASSSGATSYNEQF	GCCAGTAGTTCTGGCGCGACGTCCTACAATGAGCAGTTC		4229	0,012400996	3	3
TRBV6-1	TRBJ1-6	ASSDLIGTGIDHPS	GCCAGCAGTGATCTAATTGGGACAGGGATAGATCACCCCTCCAC	TRBD1	2520	0,007389574	4	7
TRBV6-2	TRBJ2-5	ASSYSETRTETQY	GCCAGCAGTTACTCGGAAACGCGAACAGAGACCCAGTAC		1666	0,00488533	5	5
TRBV7-6	TRBJ1-3	ASSLLSADSGNTIY	GCCAGCAGCTTATTGTCTGCGGACTCTGGAACACCATATAT	TRBD2	1601	0,004694726	6	6
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSFGIYSNQPQH	GCCAGCAGCTTTGGTATCTATAGCAATCAGCCCCAGCAT		1111	0,003257864	7	53
TRBV14	TRBJ1-5	ASSQGPGRSPS	GCCAGCAGCCAAGGGCCCGGGCGCAGCCCCAGCAT		962	0,002820941	8	94
TRBV20-1	TRBJ1-1	SARDFRAENTEAF	AGTGCTAGAGATTTTCGGGCGGGAACACTGAAGCTTTC		949	0,00278282	9	36
TRBV30	TRBJ2-5	AWSPAVGVKTQY	GCCTGGAGTCCGGCCGTCGGGGTAAAGACCCAGTAC	TRBD2	863	0,002530636	10	236

Πίνακας Π12. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν. Ο κλωνότυπος στην 9<sup>η</sup> θέση είναι καινούργιος κλώνος που εμφανίστηκε μετά τη θεραπεία.

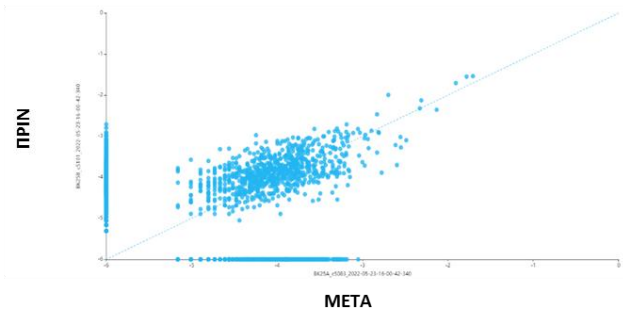
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV30	TRBJ1-5	AWAGQTNQPQH	GCCTGGGCTGGACAGACCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	14702	0,028990823	1	1
TRBV6-1	TRBJ2-2	ASRPPRYLLD*RGITRSRTPGSC	CCAAGATACCTCCTAGACTAGCGGGGGATCACCAGGTCCCGAACACC	TRBD2	14322	0,028241502	2	2
TRBV19	TRBJ2-1	ASSSGATSYNEQF	GCCAGTAGTTCTGGCGCGACGTCCTACAATGAGCAGTTC		9962	0,019644033	3	3
TRBV15	TRBJ2-7	ATSSPSGRNLRAV	GCCACCAGCAGCCCTAGCGGACGTAACCTACGAGCAGTAC	TRBD2	5139	0,010133576	4	12
TRBV6-2	TRBJ2-5	ASSYSETRTETQY	GCCAGCAGTTACTCGGAAACGCGAACAGAGACCCAGTAC		3779	0,007451797	5	5
TRBV7-6	TRBJ1-3	ASSLLSADSGNTIY	GCCAGCAGCTTATTGTCTGCGGACTCTGGAACACCATATAT	TRBD2	2418	0,004768046	6	6
TRBV6-1	TRBJ1-6	ASSDLIGTGIDHPS	GCCAGCAGTGATCTAATTGGGACAGGGATAGATCACCCCTCCAC	TRBD1	2235	0,004407189	7	4
TRBV6-1	TRBJ2-1	ASRGEN*RGGLGTTMSS	AGCAGGGGGGAAAAGTACGCGGGGGGCTGGGGACTACAATGAGCAG	TRBD2	1731	0,003413353	8	16
TRBV7-3	TRBJ2-5	ASSRTLQETQY	GCCAGCAGCAGGACGCTCCAAGAGACCCAGTAC		988	0,001948234	9	
TRBV6-4	TRBJ2-3	ASNANRYAV	GCCAGCAATGCGAACAGATACGCAGTAT		982	0,001936402	10	37

BK25

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π6. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

## Ασθενής BK26

Πίνακας Π13. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

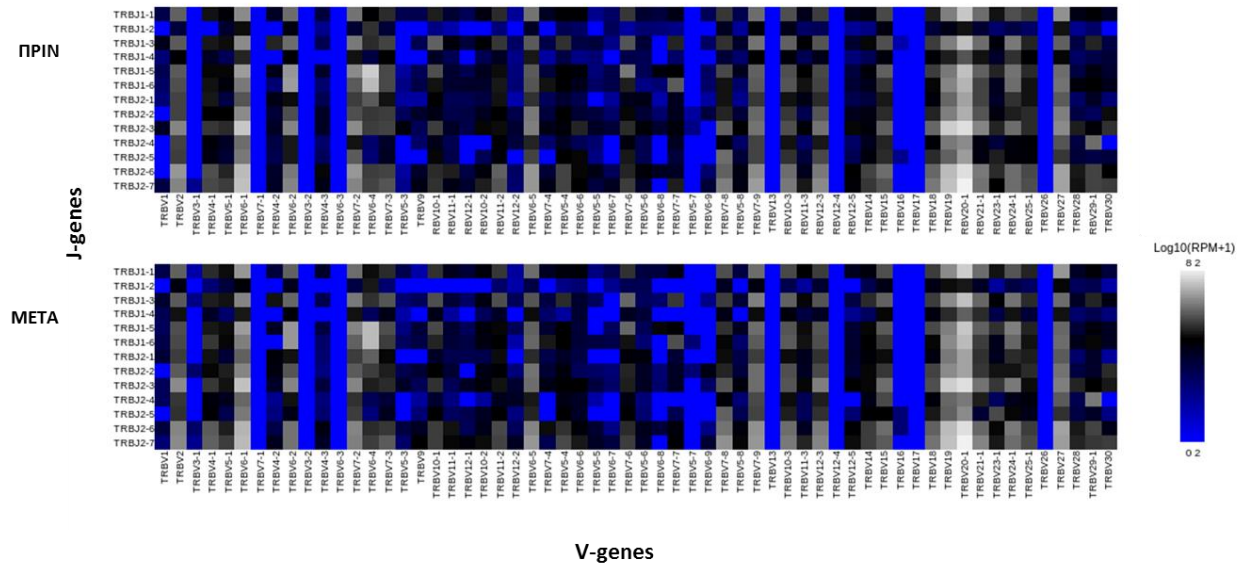
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV6-4	TRBJ2-3	ASSEGLTGGTDTQY	GCCAGCAGTGAGGGGTTGACAGGGGGCACAGATACGCAGTAT	TRBD1	3430	0,011010211	1	1
TRBV6-4	TRBJ2-2	ASSEREAGELF	GCCAGCAGTGAGCGGGAGGCCGGGGAGCTGTTT	TRBD2	2026	0,006503407	2	2
TRBV6-2	TRBJ2-2	ASSYVDSTGELF	GCCAGCAGTTACGTCGACAGCACCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	1796	0,005765113	3	3
TRBV20-1	TRBJ1-1	SATRRETEAF	AGTGCTACCCGCAGGGAAACTGAAGCTTTC	TRBD1	1715	0,005505105	4	5
TRBV20-1	TRBJ1-5	SALTGGGVGNQPQH	AGTGCATTGACAGGGGGCGGGGTAGGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	1292	0,004147286	5	7
TRBV6-4	TRBJ2-2	ASSGVADNTGELF	GCCAGCAGTGGAGTAGCGGATAACACCGGGGAGCTGTTT	TRBD2	1197	0,003842339	6	4
TRBV7-6	TRBJ2-3	ASSLLAGAHRYAV	GCCAGCAGCTTACTAGCGGGGCCACAGATACGCAGTAT	TRBD2	972	0,003120095	7	12
TRBV6-2	TRBJ2-3	ASSRDSTDTQY	GCCAGCAGTCGCGACTCAACAGATACGCAGTAT		961	0,003084785	8	6
TRBV7-8	TRBJ1-3	ASSLDSTGNIIY	GCCAGCAGCTTAGACAGTACTGAAAAACCATATAT	TRBD1	881	0,002827987	9	11
TRBV7-2	TRBJ2-3	ASSLY*KHRYAV	GCCAGCAGCTTACTAGAAAACACAGATACGCAGTAT	TRBD2	691	0,002218092	10	16

Πίνακας Π14. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

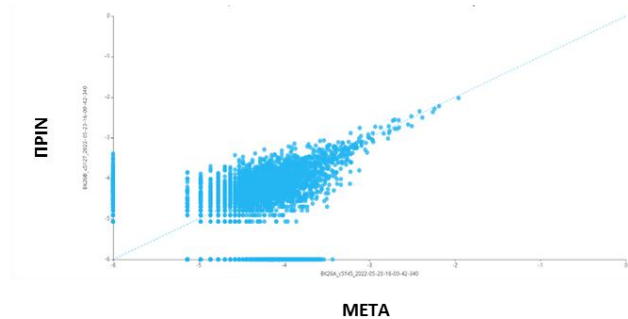
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV6-4	TRBJ2-3	ASSEGLTGGTDTQY	GCCAGCAGTGAGGGGTTGACAGGGGGCACAGATACGCAGTAT	TRBD1	2514	0,009538227	1	1
TRBV6-4	TRBJ2-2	ASSEREAGELF	GCCAGCAGTGAGCGGGAGGCCGGGGAGCTGTTT	TRBD2	1584	0,006009766	2	2
TRBV6-2	TRBJ2-2	ASSYVDSTGELF	GCCAGCAGTTACGTCGACAGCACCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	1363	0,005171282	3	3
TRBV6-4	TRBJ2-2	ASSGVADNTGELF	GCCAGCAGTGGAGTAGCGGATAACACCGGGGAGCTGTTT	TRBD2	1187	0,00450353	4	6
TRBV20-1	TRBJ1-1	SATRRETEAF	AGTGCTACCCGCAGGGAAACTGAAGCTTTC	TRBD1	1132	0,004294858	5	4
TRBV6-2	TRBJ2-3	ASSRDSTDTQY	GCCAGCAGTCGCGACTCAACAGATACGCAGTAT		890	0,003376699	6	8
TRBV20-1	TRBJ1-5	SALTGGGVGNQPQH	AGTGCATTGACAGGGGGCGGGGTAGGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	828	0,003141469	7	5
TRBV29-1	TRBJ1-4	SVGTGGTNEKLF	AGCGTTGGGACAGGGGGAATAATGAAAAACTGTTT	TRBD1	738	0,002800005	8	13
TRBV19	TRBJ1-5	ASTLGGDYQPQH	GCCAGTACCTTGGGGGGACTATCAGCCCCAGCAT	TRBD2	713	0,002705153	9	11
TRBV7-8	TRBJ1-1	ASSLTGNTEAF	GCCAGCAGCTTAAACCACCGGGAACACTGAAGCTTTC	TRBD2	695	0,002636861	10	15

BK26

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π7. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνοί συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.



## Ασθενής BK28

Πίνακας Π15. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

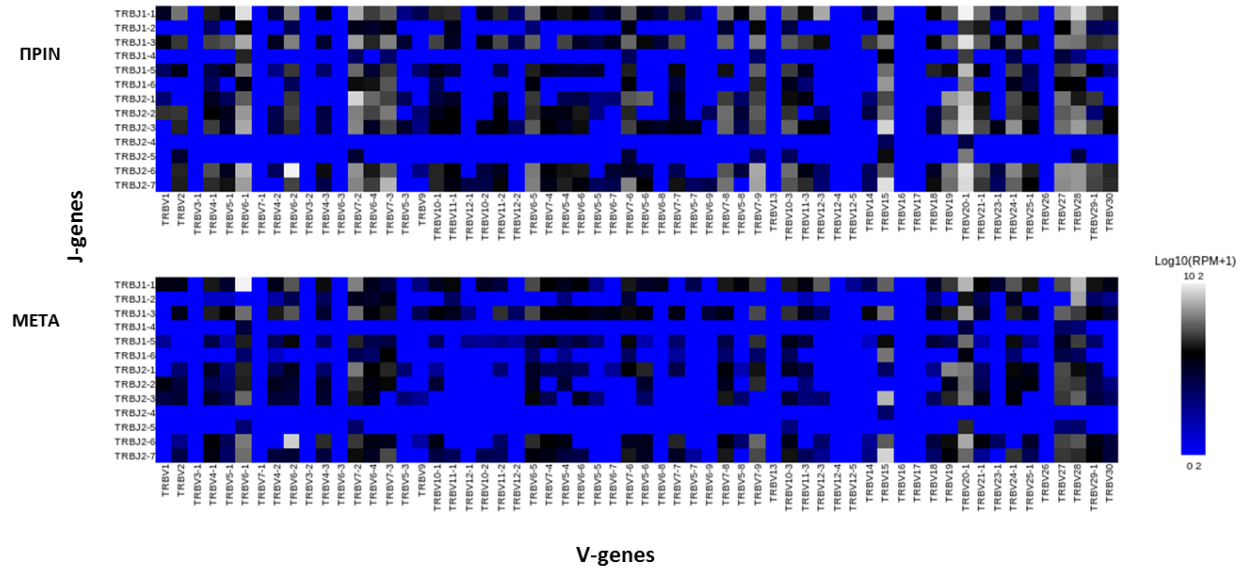
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV6-2	TRBJ1-2	ASTYRAQPLWLH	GCCAGCACCTACAGGGCCCAACCGCTATGGCTACACC	TRBD1	3701	0,03759536	1	2
TRBV7-2	TRBJ2-1	ASSAEGQDYNEQF	GCCAGCAGCGCCGAGGGACAGGACTACAATGAGCAGTTC	TRBD1	1999	0,020306167	2	8
TRBV28	TRBJ2-7	ASSFWGQGVPEYQY	GCCAGCAGTTTTGGGGGAGGGGGTTCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	1800	0,018284693	3	5
TRBV6-1	TRBJ2-7	ASTSDSSYEYQY	GCCAGCACCTCAGACAGTTCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	1684	0,017106346	4	1
TRBV15	TRBJ1-5	AASVHEGQPQH	GCCGCCTCGGTTACGAAGGGCAGCCCCAGCAT		1332	0,013530673	5	4
TRBV15	TRBJ1-1	ATSLASGRWAF	GCCACCAGCCTAGCCTCAGGGAGGTGGGCTTTC	TRBD2	1186	0,012047581	6	3
TRBV7-3	TRBJ1-1	ASSPLGSLNTEAF	GCCAGCAGCCACTAGGGAGTTTGAACACTGAAGCTTTC	TRBD2	910	0,009243928	7	71
TRBV15	TRBJ2-2	ATSTGATVGELF	GCCACCAGCACCGGGGCTACGGTCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	707	0,007181821	8	9
TRBV12-3	TRBJ2-7	ASSSVNEQY	GCCAGCAGTTCGTGAACGAGCAGTAC		660	0,006704387	9	14
TRBV19	TRBJ2-1	ASRV*GPTMSS	GCCAGTAGGGTATAGGGTCTACAATGAGCAGTTC		644	0,006541857	10	7

Πίνακας Π16. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

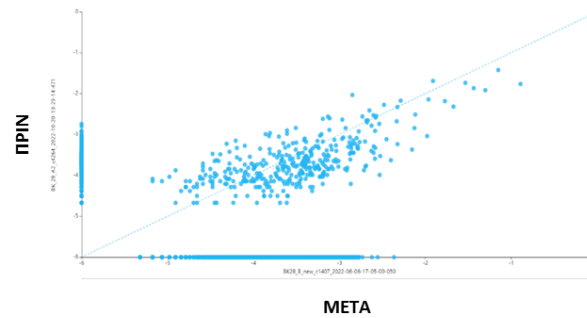
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV6-1	TRBJ2-7	ASTSDSSYEYQY	GCCAGCACCTCAGACAGTTCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	66940	0,127703493	1	4
TRBV6-2	TRBJ1-2	ASTYRAQPLWLH	GCCAGCACCTACAGGGCCCAACCGCTATGGCTACACC	TRBD1	36845	0,070290338	2	1
TRBV15	TRBJ1-1	ATSLASGRWAF	GCCACCAGCCTAGCCTCAGGGAGGTGGGCTTTC	TRBD2	26075	0,049744078	3	6
TRBV15	TRBJ1-5	AASVHEGQPQH	GCCGCCTCGGTTACGAAGGGCAGCCCCAGCAT		19100	0,036437656	4	5
TRBV28	TRBJ2-7	ASSFWGQGVPEYQY	GCCAGCAGTTTTGGGGGAGGGGGTTCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	15273	0,029136771	5	3
TRBV28	TRBJ2-6	ASRHLAAGGLSGANVLT	GCCAGCAGGCACTTAGCGGGGGGCTCTCTGGGGCAACGTCCTGACT	TRBD2	11093	0,021162457	6	12
TRBV19	TRBJ2-1	ASRV*GPTMSS	GCCAGTAGGGTATAGGGTCTACAATGAGCAGTTC		8823	0,016831908	7	10
TRBV7-2	TRBJ2-1	ASSAEGQDYNEQF	GCCAGCAGCGCCGAGGGACAGGACTACAATGAGCAGTTC	TRBD1	6417	0,012241908	8	2
TRBV15	TRBJ2-2	ATSTGATVGELF	GCCACCAGCACCGGGGCTACGGTCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	5694	0,010862619	9	8
TRBV6-1	TRBJ2-7	ASTPGHSYEYQY	GCCAGCACCCGGGACATTCCTACGAGCAGTAC	TRBD1	5483	0,010460087	10	44

BK28

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π8. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

### Ασθενής BK33

Πίνακας Π17. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν. Οι κλώνοι που βρισκόταν στην 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> θέση εξαφανίστηκαν μετά τη θεραπεία.

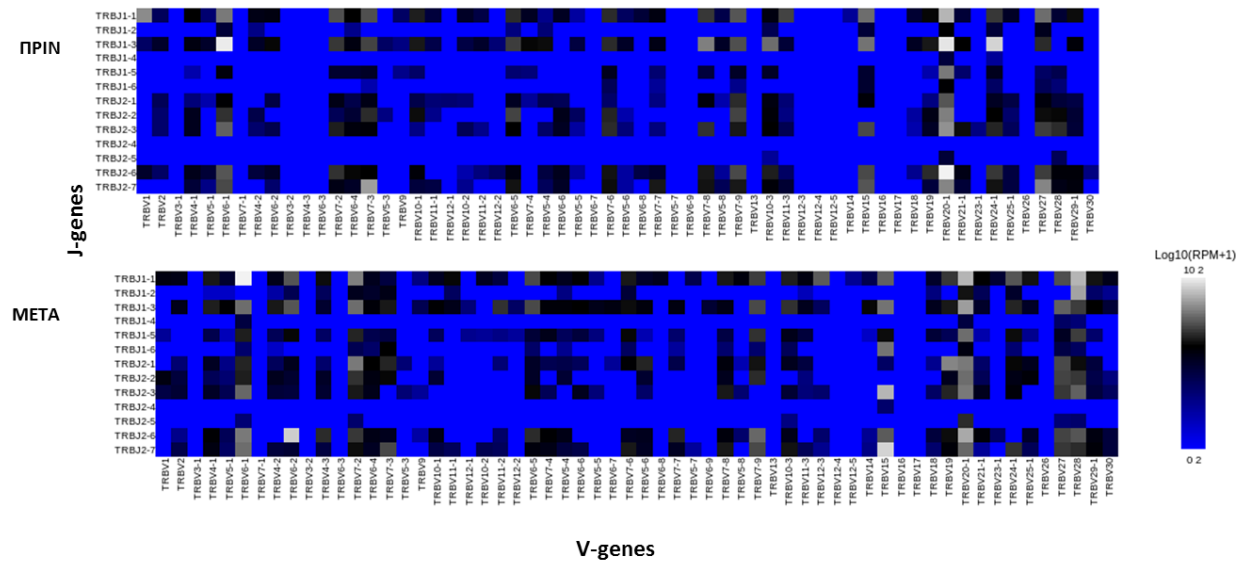
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV20-1	TRBJ1-2	SARGLRTVDGYT	AGTGCTAGAGGGCTTCGGACGGTGGATGGCTACACC		29382	0,129094336	1	2
TRBV6-1	TRBJ2-5	ASSEVAGVETQY	GCCAGCAGTGAGGTGGCGGGGTGGAGACCCAGTAC	TRBD2	19432	0,085377481	2	6
TRBV24-1	TRBJ2-5	ATSDAGQGSRETQY	GCCACCAGTGACGCGGGACAGGGTCCAGAGAGACCCAGTAC	TRBD1	19244	0,084551474	3	5
TRBV20-1	TRBJ2-5	SARGGAPETQY	AGTGCTAGAGGGGGGCCCCAGAGACCCAGTAC	TRBD2	13875	0,060961947	4	
TRBV6-1	TRBJ2-5	ASRWDLETQY	GCCAGCAGATGGGATCTGGAGACCCAGTAC		8350	0,036687009	5	4
TRBV7-3	TRBJ1-1	ASSLTPGEEAF	GCCAGCAGCTTAACTCCAGGAGAGGAAGCTTTC		6145	0,026999003	6	1
TRBV20-1	TRBJ2-5	SARGGPRDPV	AGTGCTAGAGGGGGCCCCAGAGACCCAGTAC	TRBD1	4846	0,021291646	7	
TRBV1	TRBJ2-7	TSCFTGGHEQY	ACCAGCTGCTTTACGGGTGGGCACGAGCAGTAC		4115	0,018079885	8	9
TRBV27	TRBJ1-1	ATRQGAGNTEAF	GCCACACGACAGGGGGCTGGGAACACTGAAGCTTTC	TRBD1	3651	0,01604123	9	7
TRBV20-1	TRBJ1-6	SARGLYNSPLH	AGTGCTAGAGGGCTCTATAATTCACCCCTCCAC		1778	0,007811916	10	78

Πίνακας Π18. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

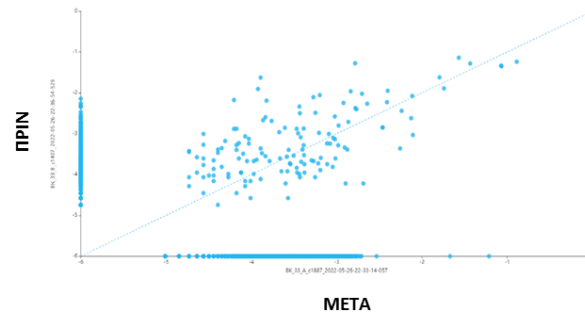
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV7-3	TRBJ1-1	ASSLTPGEEAF	GCCAGCAGCTTAACTCCAGGAGAGGAAGCTTTC		8507	0,072222977	1	6
TRBV20-1	TRBJ1-2	SARGLRTVDGYT	AGTGCTAGAGGGCTTCGGACGGTGGATGGCTACACC		6794	0,057679899	2	1
TRBV6-5	TRBJ1-6	ASSFTDGKNSPLH	GCCAGCAGTTTCACCGACGGGAAAAATTCACCCCTCCAC	TRBD2	6236	0,052942575	3	31
TRBV6-1	TRBJ2-5	ASRWDLETQY	GCCAGCAGATGGGATCTGGAGACCCAGTAC		6143	0,052153021	4	5
TRBV24-1	TRBJ2-5	ATSDAGQGSRETQY	GCCACCAGTGACGCGGGACAGGGTCCAGAGAGACCCAGTAC	TRBD1	5459	0,046345978	5	3
TRBV6-1	TRBJ2-5	ASSEVAGVETQY	GCCAGCAGTGAGGTGGCGGGGTGGAGACCCAGTAC	TRBD2	5259	0,044648012	6	2
TRBV27	TRBJ1-1	ATRQGAGNTEAF	GCCACACGACAGGGGGCTGGGAACACTGAAGCTTTC	TRBD1	2824	0,023975278	7	9
TRBV7-2	TRBJ2-3	ASSLIWGGGGDTQY	GCCAGCAGCTTAACTCTGGGGCGGGGAGGAGATACGAGTAT	TRBD2	2788	0,023669644	8	272
TRBV1	TRBJ2-7	TSCFTGGHEQY	ACCAGCTGCTTTACGGGTGGGCACGAGCAGTAC		1511	0,012828132	9	8
TRBV25-1	TRBJ1-1	ASSYLGRDTEAF	GCCAGCAGTTACTTGGGTAGAGACACTGAAGCTTTC		1462	0,01241213	10	274

BK33

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π9. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνοί συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

### Ασθενής ΒΚ38

Πίνακας Π19. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

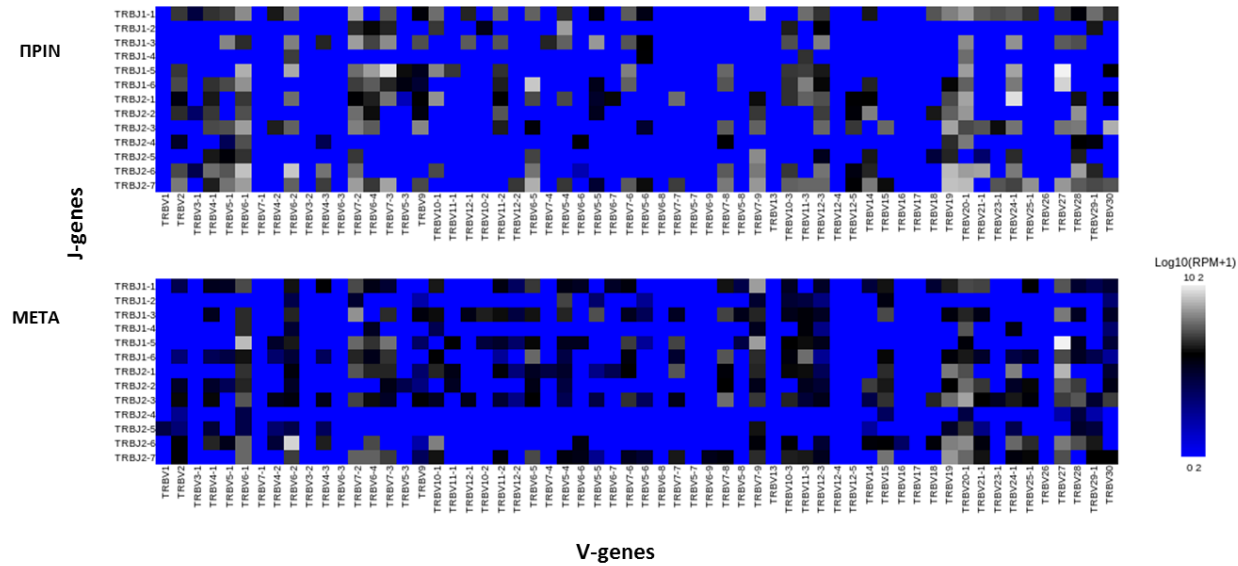
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV27	TRBJ2-3	ASSSSTDQY	GCCAGCAGTTC AAGCACAGATACGCAGTAT		25208	0,041005353	1	1
TRBV24-1	TRBJ2-1	ATSDTSGDSSYNEQF	GCCACCAGTGATACGAGCGGGGACAGCTCCTACAATGAGCAGTTC	TRBD1	18520	0,030126117	2	9
TRBV7-3	TRBJ2-3	ASSSLTGGLAGDQTDQY	CAGCTTAAGCCTGACGGGGGACTAGCGGGAGACCAACAGATACGC	TRBD2	17419	0,028335142	3	23
TRBV27	TRBJ2-2	ASSS*QGPNTGELF	GCCAGCAGTCTTAACAGGGCCCGAACCCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	15194	0,024715778	4	28
TRBV6-2	TRBJ1-2	ASLVGAGQFANYGYT	GCCAGCTTGGTCGGCGCGGGACAGTTCGCTAACTATGGCTACACC	TRBD1	11074	0,018013856	5	2
TRBV6-5	TRBJ2-2	ASSYSAGDPGELF	GCCAGCAGTTACTCCGAGGGGATCCCGGGGAGCTGTTT	TRBD1	10079	0,016395309	6	13
TRBV6-1	TRBJ2-3	ASRDGLAGLTDQY	GCCAGCAGGGACGGACTAGCGGGTCTCACAGATACGCAGTAT	TRBD2	7606	0,012372529	7	3
TRBV30	TRBJ1-5	AWSADGNQPQH	GCCTGGAGTGGGACGGGAATCAGCCCCAGCAT	TRBD2	6268	0,010196031	8	37
TRBV5-4	TRBJ2-6	ASSLRPVYWGQRPD	GCCAGCAGCTTACGACCGGTTTATTGGGGCCAACGTCTGACT		5588	0,009089889	9	34
TRBV5-5	TRBJ2-5	ASSLGTGEETQY	GCCAGCAGCTTGGGGACAGGGGAAGAGACCCAGTAC	TRBD1	5308	0,008634418	10	21

Πίνακας Π20. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από την αυτήν. Οι κλωνότυποι στην 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> θέση είναι καινούργιοι κλώνοι που εμφανίστηκαν μετά τη θεραπεία.

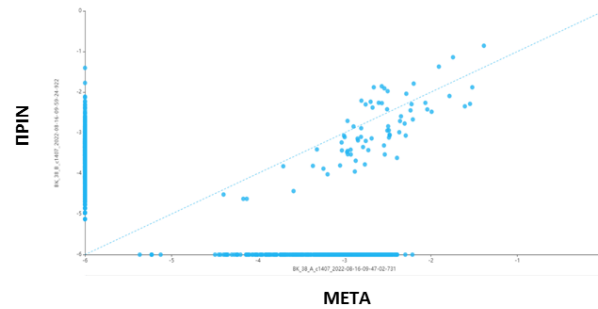
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV27	TRBJ2-3	ASSSSTDQY	GCCAGCAGTTC AAGCACAGATACGCAGTAT		42848	0,138885107	1	1
TRBV6-2	TRBJ1-2	ASLVGAGQFANYGYT	GCCAGCTTGGTCGGCGCGGGACAGTTCGCTAACTATGGCTACACC	TRBD1	22313	0,072324108	2	5
TRBV6-1	TRBJ2-3	ASRDGLAGLTDQY	GCCAGCAGGGACGGACTAGCGGGTCTCACAGATACGCAGTAT	TRBD2	13103	0,04247133	3	7
TRBV27	TRBJ2-1	ASTITAGNEQF	GCCAGCACGATAACAGCGGGGAATGAGCAGTTC	TRBD2	12211	0,039580051	4	
TRBV7-9	TRBJ2-3	ASSPDRGDTQY	GCCAGCAGCCCAGACAGGGGGGATACGCAGTAT	TRBD1	5206	0,016874437	5	
TRBV7-9	TRBJ2-7	ASSLGGNLYEQY	GCCAGCAGCTTAGGGGGTAATCTCTACGAGCAGTAC	TRBD1	5012	0,016245616	6	11
TRBV7-2	TRBJ2-5	ASSFPGGRGAPRPV	GCCAGCAGCTTCCCCGAGGACGGGGCGCACCAAGAGACCCAGTAC	TRBD1	4310	0,013970193	7	90
TRBV10-1	TRBJ1-2	ASSPRFLGPPLAMAT	GCCAGCAGTCCGAGATTCCTAGGACCACCTCTGGCGATGGCTACACC		4074	0,013205235	8	122
TRBV24-1	TRBJ2-1	ATSDTSGDSSYNEQF	GCCACCAGTGATACGAGCGGGGACAGCTCCTACAATGAGCAGTTC	TRBD1	4069	0,013189029	9	2
TRBV27	TRBJ2-5	ASSSTLAGTQY	GCCAGCAGTTCACCCCTAGCGGGGACCCAGTAC	TRBD2	3826	0,012401382	10	78

BK38

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π10. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνοί συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.

### Ασθενής BK39

Πίνακας Π21. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν. Ο κλώνος που βρισκόταν στην 9<sup>η</sup> θέση εξαφανίστηκε μετά τη θεραπεία.

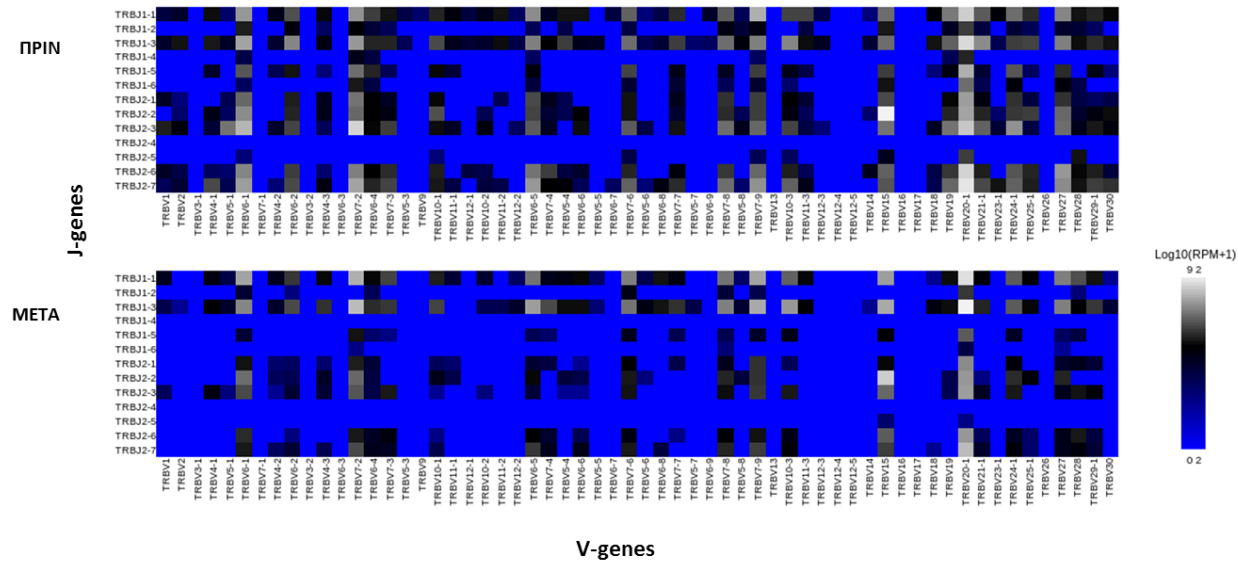
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV15	TRBJ1-6	ATSRDRGWISSPLH	GCCACCAGCAGAGATCGTGGCTGGATATCTTCACCCCTCCAC		4264	0,066765834	1	1
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSWQGVGQPQH	GCCAGCAGCTGGGGACAGGGGGTTGGGAGCCCCAGCAT	TRBD1	883	0,013826039	2	211
TRBV7-9	TRBJ2-7	ASSSDSYEQY	GCCAGCAGCTCCGACTCCTACGAGCAGTAC		629	0,0098489	3	11
TRBV10-3	TRBJ2-5	AISPLSQETQY	GCCATCAGTCCGCTATCCCAAGAGACCCAGTAC	TRBD2	436	0,0068269	4	2
TRBV24-1	TRBJ1-5	ATSDLWGSPS	GCCACCAGTGATTTGTGGGGCAGCCCCAGCAT	TRBD1	415	0,006498082	5	171
TRBV20-1	TRBJ1-1	SARGDSHTEAF	AGTGCTAGGGGGACAGTCACACTGAAGCTTTC	TRBD1	375	0,005871761	6	65
TRBV5-1	TRBJ1-5	ASSLEGDQPQH	GCCAGCAGCTTGAAGGGGATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	370	0,005793471	7	237
TRBV21-1	TRBJ2-5	ASSKSPGDPV	GCCAGCAGCAAAGCCCCAGGGGACCCAGTAC	TRBD1	364	0,005699522	8	205
TRBV7-2	TRBJ1-5	ASSWQGVGQPS	GCCAGCAGCTGGGGACAGGGGGTTGGGAGCCCCAGCAT	TRBD1	324	0,005073201	9	
TRBV6-5	TRBJ1-1	ASSYKENTEAF	GCCAGCAGTTACAAGGAGAACACTGAAGCTTTC		301	0,004713067	10	186

Πίνακας Π22. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν. Οι κλωνότυποι στην 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 8<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> θέση είναι καινούργιοι κλώνοι που εμφανίστηκαν μετά τη θεραπεία.

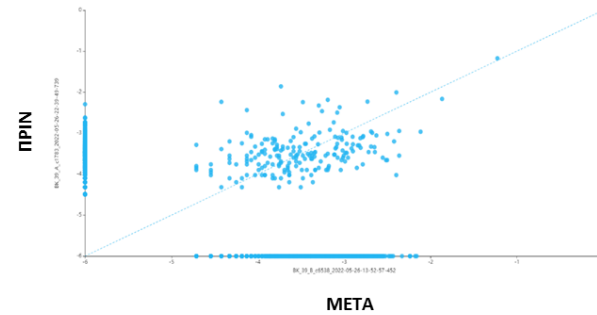
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Πριν
TRBV15	TRBJ1-6	ATSRDRGWISSPLH	GCCACCAGCAGAGATCGTGGCTGGATATCTTCACCCCTCCAC		6445	0,05931018	1	1
TRBV10-3	TRBJ2-5	AISPLSQETQY	GCCATCAGTCCGCTATCCCAAGAGACCCAGTAC	TRBD2	1475	0,013573703	2	4
TRBV6-5	TRBJ2-5	ASSYSGGKDPV	GCCAGCAGTTACTCGGGGGTAAAGACCCAGTAC	TRBD2	831	0,007647286	3	36
TRBV15	TRBJ2-5	ATRAVSGERTQY	GCCACCAGAGCCGTTAGCGGGGAGCGGACCCAGTAC	TRBD2	749	0,00689268	4	
TRBV7-9	TRBJ2-5	ASSLSGRETQY	GCCAGCAGCTTATCCGGCAGGGAGACCCAGTAC	TRBD1	719	0,006616605	5	
TRBV15	TRBJ2-7	ATSGGGQHSYEY	GCCACCAGTGGGGAGGGCAGCACTCCTACGAGCAGTAC	TRBD2	630	0,005797582	6	
TRBV20-1	TRBJ1-6	SAYRVANSPLH	AGTGCTACAGGGTGCCTAATTCACCCCCTCCAC	TRBD1	629	0,005788379	7	
TRBV20-1	TRBJ2-5	SAGDSWTQY	AGTGCTGGGGATTCTGGACCCAGTAC		624	0,005742367	8	
TRBV15	TRBJ2-5	ATKTGSGETQY	GCCACCAAGACAGGGTCCGGGGAGACCCAGTAC	TRBD1	506	0,00465647	9	
TRBV20-1	TRBJ1-5	SAGGKGNQPQH	AGTGCCGGAGGCAAGGGCAATCAGCCCCAGCAT	TRBD2	470	0,00432518	10	33

BK39

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π11. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνόι συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.



## Ασθενής ΒΚ40

Πίνακας Π23. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων πριν τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους μετά από αυτήν.

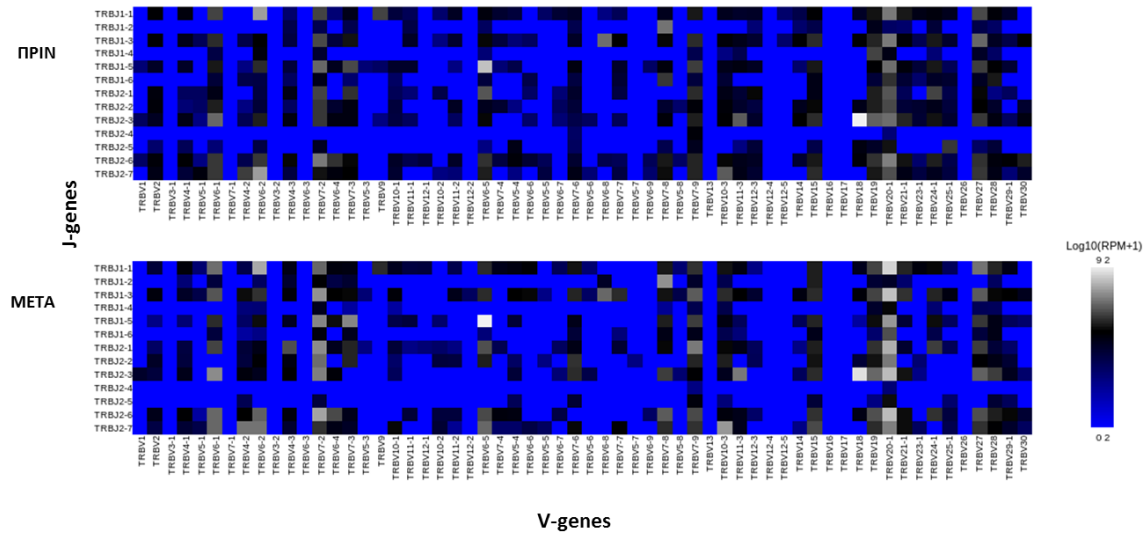
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Πριν	Θέση Μετά
TRBV18	TRBJ1-5	ASSLTGGDQPQH	GCCAGCTCACTTACAGGTGGGGATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	12787	0,228547427	1	2
TRBV6-5	TRBJ2-3	ASSYSGEDTQY	GCCAGCAGTTATAGCGGGGAAGATACGCAGTAT	TRBD2	4302	0,076891455	2	1
TRBV6-2	TRBJ2-7	ASSYVDPGEPEQY	GCCAGCAGTTACGTGGACCCAGGGGAGCCCGAGCAGTAC	TRBD1	2078	0,037140968	3	4
TRBV6-2	TRBJ1-1	ASSPTAQTEAF	GCCAGCAGTCCGACAGCACAGACTGAAGCTTTC	TRBD1	2005	0,035836208	4	11
TRBV7-8	TRBJ2-6	ASSLKWSGEAGANVLT	GCCAGCAGCTTAAAATGGAGTGGGGAGGCTGGGGCCAACGTCCTGACT	TRBD2	906	0,016193319	5	5
TRBV7-2	TRBJ1-2	ASSLEDYGYT	GCCAGCAGCTTAGAAGACTATGGCTACACC		674	0,012046685	6	7
TRBV6-8	TRBJ2-5	ASLYGGGKPKTRDPV	GCCAGCCTCTATGGGGGGGGCAAACCGAAAACAAGAGACCCAGTAC	TRBD2	640	0,011438989	7	19
TRBV20-1	TRBJ2-7	SAWPYTSS	AGTGCTTGGCCCTATACGAGCAGTAC		593	0,010598938	8	3
TRBV10-3	TRBJ1-1	AISESSQGNAF	GCCATCAGTGAGTCATCCAGGGGAACGCTTTC	TRBD1	530	0,009472913	9	6
TRBV11-3	TRBJ1-5	ASSFGGEVSNQPQH	GCCAGCAGCTTCGGTGGGGAAAGTCAGCAATCAGCCCCAGCAT		526	0,009401419	10	10

Πίνακας Π24. Η σειρά κατάταξης των 10 πιο συχνών κλωνότυπων μετά τη θεραπεία και οι μεταβολές στις θέσεις κατάταξής τους πριν από αυτήν.

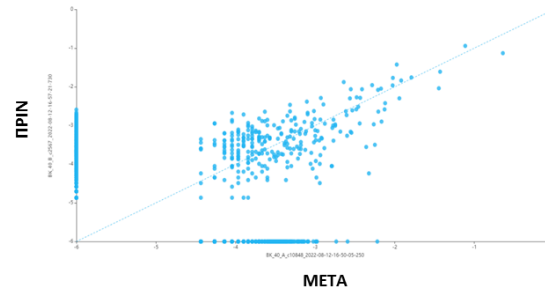
Variable	Joining	CDR3 AA	CDR3 NT	Diversity	Σύνολο Μετρήσεων	Συχνότητα	Θέση Μετά	Θέση Μετά
TRBV6-5	TRBJ2-3	ASSYSGEDTQY	GCCAGCAGTTATAGCGGGGAAGATACGCAGTAT	TRBD2	18101	0,11421126	1	2
TRBV18	TRBJ1-5	ASSLTGGDQPQH	GCCAGCTCACTTACAGGTGGGGATCAGCCCCAGCAT	TRBD1	11772	0,074277386	2	1
TRBV20-1	TRBJ2-7	SAWPYTSS	AGTGCTTGGCCCTATACGAGCAGTAC		5962	0,037618227	3	8
TRBV6-2	TRBJ2-7	ASSYVDPGEPEQY	GCCAGCAGTTACGTGGACCCAGGGGAGCCCGAGCAGTAC	TRBD1	3898	0,024595077	4	3
TRBV7-8	TRBJ2-6	ASSLKWSGEAGANVLT	GCCAGCAGCTTAAAATGGAGTGGGGAGGCTGGGGCCAACGTCCTGACT	TRBD2	2769	0,017471465	5	5
TRBV10-3	TRBJ1-1	AISESSQGNAF	GCCATCAGTGAGTCATCCAGGGGAACGCTTTC	TRBD1	2696	0,017010859	6	9
TRBV7-2	TRBJ1-2	ASSLEDYGYT	GCCAGCAGCTTAGAAGACTATGGCTACACC		2309	0,014569018	7	6
TRBV20-1	TRBJ2-1	SARRGGPTMSS	AGTGCTAGCGGGGGGGCGTCTACAATGAGCAGTTC	TRBD2	2103	0,013269227	8	38
TRBV7-3	TRBJ2-3	ASSSSGTSRY	GCCAGCAGCTCCTCCGGGACTAGTCGGTAT	TRBD2	1752	0,011054534	9	20
TRBV11-3	TRBJ1-5	ASSFGGEVSNQPQH	GCCAGCAGCTTCGGTGGGGAAAGTCAGCAATCAGCCCCAGCAT		1724	0,010877864	10	10

BK40

Θερμικά διαγράμματα (Heatmaps) συνδυασμών V-J γονιδίων για κάθε ασθενή πριν και μετά την θεραπεία



Συσχέτιση και αναλογία κοινών κλώνων (log10 scale with pseudocount added) πριν και μετά



Εικόνα Π12. Στα πρώτα γραφήματα απεικονίζονται οι συνδυασμοί των V-J genes για κάθε ασθενή πριν και μετά τη θεραπεία με θερμικά διαγράμματα (Heatmaps). Με άσπρο εντοπίζονται οι πιο συχνοί συνδυασμοί των γονιδίων και με μπλε οι πιο σπάνιοι. Και παρακάτω αναπαρίσταται η συσχέτιση και η αναλογία των κοινών κλωνότυπων πριν και μετά τη θεραπεία.