

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ÁGI ZAG

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ÁGI ZAG

**VREDNOTENJE RAZLIČNIH NAČINOV DOSTAVE
ANTIGENSKEGA PEPTIDA WILMSOVEGA TUMORJA 1 V
DENDRITIČNE CELICE, PRIPRAVLJENE IZ
POPKOVNIČNE KRVI**

**EVALUATION OF DIFFERENT METHODS USED FOR
INTRODUCING WILM'S TUMOR 1 ANTIGENIC PEPTIDE
INTO CORD BLOOD-DERIVED DENDRITIC CELLS**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom dr. Colin de Haara na Univerzitetnem medicinskem centru v Utrechtu, na Nizozemskem.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. za vso strokovno pomoč in usmerjanje tekom pisanja magistrske naloge.

Zahvaljujem se somentorju dr. Colin de Haaru in dr. Stefan Nierkensu, ki sta mi omogočila opravljanje praktičnega dela v laboratoriju na oddelku za imunologijo Univerzitetnega medicinskega centra v Utrechtu, na Nizozemskem. Zahvala gre tudi Ester Dunnebachu za usmerjanje, potrpljenje in vso pomoč tekom izvedbe magistrskega dela.

Najlepša hvala staršema in vsej svoji družini, ki mi je tekom študija stala ob strani, me podpirala in spodbujala. Zahvala gre tudi fantu Samu za spodbudne besede ter prijateljem in sošolcem, ki so poskrbeli za nepozabna študijska leta, katerih se bom z veseljem spominjala.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom dr. Colin de Haara.

Ljubljana, 2017

Ági Zag

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

VSEBI NA

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
POVZETEK	1
ABSTRACT	3
SEZNAM OKRAJŠAV	4
1. UVOD.....	6
1.1 AKUTNA MIELOBLASTNA LEVKEMIJA	6
1.2 VLOGA DENRITIČNIH CELIC V IMUNSKEM SISTEMU	7
1.2.1 Dendritične celice	7
1.2.2 DC in predstavljanje antigenov	8
1.2.3 Interakcije DC z limfociti T.....	12
1.2.4 Citotoksičnost CD8 ⁺ celic T (CLT).....	13
1.3 PROTITUMORSKO CEPIVO IZ DC	14
1.3.1 Izdelava cepiva iz DC.....	15
1.3.1.1 Izbor antigenov za pripravo celičnih cepiv.....	15
1.3.1.2 Antigen WT1	17
1.3.1.3 Ojačanje odziva CLT preko stimulacije CD4 ⁺ limfocitov T.....	17
1.3.2 Aplikacija cepiv iz DC	18
1.3.3 Spremljanje učinkov po aplikaciji cepiv iz DC	18
1.4 CEPIVO IZ DC IZDELANO V UMC V UTRECHTU.....	19
2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	21
3. MATERIALI IN METODEDE	23
3.1 MATERIALI	23
3.1.1 Reagenti.....	23
3.1.2 Gojišča.....	24
3.1.3 Kompleti	24
3.1.4 Laboratorijska oprema.....	24
3.1.5 Biološki materiali	25
3.1.6 Celične linije.....	26

3.2 METODE.....	27
3.2.1 Izolacija in gojenje CD34 ⁺ KMC iz PK	27
3.2.1.1 Izolacija mononuklearnih celic iz PK.....	27
3.2.1.2 Izolacija CD34 ⁺ KMC z imunomagnetnim ločevanjem.....	28
3.2.1.3 Ekspanzija in diferenciacija CD34 ⁺ celic	29
3.2.3 Določanje prisotnosti molekul HLA-A2 na in izražanja proteina WT1 v izbranih tumorskih celičnih linijah, s pretočno citometrijo	30
3.2.3.1 Označevanje in določanje membransko izraženih molekul	30
3.2.3.2 Označevanje in določanje znotrajceličnih molekul	31
3.2.4 Optimizacija testa celične citotoksičnosti z uporabo s CellTrace Violet (CTV) označenih tarčnih celic	32
3.2.5 Vrednotenje različnih načinov dostave antigenov v tumorske celice s citotoksičnim in aktivacijskim testom limfocitov T	35
3.2.5.1 Elektroporacija celic U266 z mRNA GFP	36
3.2.5.2 Testa T-celične citotoksičnosti in aktivacije z uporabo limfocitov T, ki izražajo specifične rekombinantne TCR.....	36
3.2.6 Test ELISA za določanje količine IFN- γ	38
3.2.7 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in optimizacija protokola PCR	39
3.2.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	39
3.2.7.2 Plazmidni vektor.....	41
3.2.7.3 Načrtovani konstrukti	41
3.2.7.4 Pomnoževanje s PCR	43
3.2.7.5 Agarozna gelska elektroforeza	44
3.2.8 Molekulska kloniranje s PCR pridobljenih fragmentov DNA v E.coli.....	44
3.2.8.1 Priprava vektorja in fragmentov DNA za kloniranje.....	44
3.2.8.2 Ligacija fragmentov DNA	45
3.2.8.3 Transformacija plazmidne DNA v E.coli	46
3.2.8.4 Izolacija plazmidne DNA	46
4. NAČRT EKSPERIMENTALNEGA DELA	48
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	49
5.1 IZOLACIJA CD34 ⁺ KMC IZ POPKOVNIČNE KRVI (PK)	49

5.2 OPTIMIZACIJA CITOTOKSIČNEGA TESTA Z NERADIOAKTIVNIM OZNAČEVANJEM TARČNIH CELIC S CTV	50
5.3 VREDNOTENJE RAZLIČNIH NAČINOV DOSTAVE ANTIGENSKIH PEPTIDOV WT1 V CELICE ČLOVEŠKEGA MULTIPLEGA MIELOMA U266	55
5.3.1 Elektroporacija celic U266 z mRNA za GFP	56
5.3.2 Testa aktivacije in citotoksičnega delovanja limfocitov T z uporabo celic U266, opremljenih z antigeni proteina WT1	57
5.4 NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN OPTIMIZACIJA PROTOKOLA PCR.....	61
5.5 KLONIRANJE PRODUKTOV PCR V E.COLI	63
6. SKLEP	65
7. LITERATURA	67
8. PRILOGE	71

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz kostimulacije limfocitov T z APC	9
Slika 2: Strukturi molekul HLA razreda I in II ter oblika vezavnih mest za antigenske peptide	10
Slika 3: Shematski prikaz klasičnih in navzkrižnih poti predstavljanja antigenov, vezanih na molekule MHC razredov I in II.	12
Slika 4: Postopek priprave DC iz monocitov, opremljenih s TAA za aktivacijo protitumorskih CLT.	15
Slika 5: Časovni trak poteka presaditve KMC iz PK in nadaljnje imunske terapije pediatričnih bolnikov z AML.....	24
Slika 6: Prikaz plasti porazdeljenih krvnih celic pred in po centrifugiranju z raztopino fikola.....	28
Slika 7: Shematski prikaz detekcije proteina WT1 v testu sendvič ELISA.....	39
Slika 8: Struktura plazmidnega vektorja pcDNA 3.1	41
Slika 9: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela.	48
Slika 10: Primer točkovnega diagrama za HLA-A2 tipizacijo darovalca št.1	49
Slika 11: Točkovna diagrama preverjanja čistosti CD34 ⁺ in CD34 ⁻ celičnih frakcij darovalca št. 1.....	50
Slika 12: Referenčni histogram za vrednosti MFI izražanja proteina WT1 celičnih linij BV173, NB4, THP1, in ML1.	51
Slika 13: Točkovni diagram celic THP1 označenih z naraščajočimi koncentracijami barvila CTV	52
Slika 14: Grafični prikaz deležev mrtvih tarčnih celic BV173, THP1, ML1 in NB4 po citotoksičnem testu	53

Slika 15: Referenčni histogram, ki prikazuje vrednosti MFI izražanja proteina WT1 celičnih linij U266, MML.S in BV173 in točkovna diagrama določanja molekul HLA-A2 na celicah U266 in MML.S.	56
Slika 16: Grafični prikaz deležev mrtvih antigensko opremljenih celic U266 po citotoksičnem testu	58
Slika 17: Grafični prikaz deležev CD137 ⁺ aktiviranih efektorskih limfocitov T po aktivacijskem testu.	58
Slika 18: Grafični prikaz vsebnosti IFN- γ po aktivacijskem testu s testom sendvič ELISA.	59
Slika 19: Slika 1% agaroznega gela z ločenimi produkti reakcij PCR, ki smo jih izvedli s prvim in drugim preskušanim sklopom ZO.....	62
Slika 20: Slika 1% agaroznega gela z ločenimi produkti reakcij PCR, ki smo jih izvedli s tretjim sklopom testiranj ZO.....	63
Slika 21: Slike petrijevk s kolonijami bakterij E.coli z vstavljenim plazmidom.....	63
Slika 22: Slika 1% agaroznega gela produktov kloniranja in vektorja pcDNA 3.1 po njihovi obdelavi z restriktazama SacI in SpeI ter pričakovani položaji lis v primeru uspešnega kloniranja.....	64

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Seznam in izvor uporabljenih reagentov.	23
Preglednica II: Seznam in izvor uporabljenih gojišč.	24
Preglednica III: Seznam in izvor uporabljenih reagenčnih/testnih kompletov.	24
Preglednica IV: Seznam in izvor uporabljene laboratorijske opreme.	24
Preglednica V: Seznam in izvor uporabljenih bioloških materialov.....	25
Preglednica VI: Seznam in izvor uporabljenih specifičnih protiteles za pretočno citometrijo.....	26
Preglednica VII: Seznam in izvor uporabljenih človeških rekombinantnih citokinov.....	26
Preglednica VIII: Seznam in izvor uporabljenih tumorskih celičnih linij.....	26
Preglednica IX: Kombinacije in koncentracije citokinov, ki smo jih dodajali za ekspanzijo in diferenciacijo CD34 ⁺ KMC v DC.	29
Preglednica X: Shema mikrotitrne plošče za izvedbo citotoksičnega testa z uporabo 4 različnih celičnih linij AML ter limfocitov T, ki izražajo specifične rekombinantne TCR	35
Preglednica XI: Shema mikrotitrne plošče za izvedbo testa T-celične citotoksičnosti in aktivacije z uporabo kombinacij različno obdelanih tarčnih celic U266 in limfocitov T, ki izražajo specifične rekombinantne TCR.....	37
Preglednica XII: Sestave načrtovanih smernih in protismernih ZO ter vrednosti njihovih T _m	42
Preglednica XIII: Seznam in lastnosti testiranih človeških celičnih linij AML.....	50
Preglednica XIV: Vrste testiranih celičnih linij multiplega mieloma in izražanje molekul HLA-A2 in proteina WT1.	55

POVZETEK

Raziskovalna skupina oddelka za imunologijo Univerzitetnega medicinskega centra v Utrechtu, na Nizozemskem, je razvila predklinično cepivo na osnovi človeških dendritičnih celic (DC), pridobljenih iz CD34⁺ krvotvornih matičnih celic (KMC) izoliranih iz popkovnične krvi. Cepivo bodo uporabili v klinični študiji, v katero bodo vključili pediatrične bolnike z akutno mieloblastno levkemijo (AML), in sicer po kemoterapiji in presaditvi KMC iz popkovnične krvi. Glavna tarča imunske terapije bo znani onkoprotein Wilmsovega tumorja 1 (WT1), ki je prisoten pri več kot 90% pediatričnih bolnikov z AML. DC, ki jih opremimo z antigenom WT1 bodisi v obliki mRNA za celotno dolžino proteina ali z definiranimi peptidi, ki jih učinkovito vežejo in predstavljajo ustrezni aleli molekul HLA razreda I, izzovejo specifičen citotoksični T celični imunski odziv in posledično ubijanje preostalih levkemičnih blastov po presaditvi KMC. Izkoreninjenje vseh tumorskih celic je ključnega pomena za preprečitev ponovnega izbruha bolezni, ki je poglavitni vzrok visoke smrtnosti bolnikov z AML.

Cilj našega dela je bil določiti optimalen način opremljanja DC s specifičnimi antigeni onkoproteina WT1 za uspešno indukcijo protitumorskih klonov CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T. S tem smo želeli ojačati antigenski potencial celičnega cepiva za vzpostavitev dolgoročnega protitumorskega celičnega spomina. Poleg tega smo z uporabo človeških levkemičnih celičnih linij optimizirali 4-urni citotoksični test s CD4⁺ in CD8⁺ limfociti T, opremljenimi z rekombinantnimi T-celičnimi receptorji (TCR), specifičnimi za antigenski peptidni epitop (aminokislinsko zaporedje 126-134) WT1, vezan na molekulo HLA-A2, pri čemer smo tarčne celice označili s fluorescenčnim barvilom CellTrace Violet (CTV). Kot tarčne celice smo uporabili tumorske celice, ki izražajo molekule HLA-A2 in jih bodisi transficirali z mRNA z zapisom celotne dolžine proteina WT1 ali pa jih opremili s sintetiziranimi peptidi, sestavljenimi iz po 15 aminokislinskih ostankov, za katere smo v predhodnih raziskavah dokazali, da imajo največjo sposobnost aktivacije citotoksičnih limfocitov T. Izvajali smo tudi 24-urne T-celične aktivacijske teste in teste ELISA, s katerima smo potrjevali omenjene ugotovitve.

Določili smo štiri konstrukte zapisov DNA za naraščajoča aminokislinska zaporedja proteina WT1, pri čemer smo za osnovo vzeli dobro raziskani peptidni epitop RMFPNAPYL (aminokislinski ostanki 126-134) WT1, ki se veže na molekule HLA-A2.

Uspešno smo izbrali začetne oligonukleotide za njihovo pomnoževanje z metodo PCR in tako pridobili zelene fragmente DNA. Te smo nato vstavili v plazmidni vektor pcDNA 3.1 in jih klonirali v bakterijah Escherichia coli. Kljub večkratnim poskusom pa nam iz bakterijskih kolonij žal ni uspelo izolirati ustreznih klonov plazmidne DNA.

Ključne besede:

dendritične celice, celično cepivo, Wilmsov tumor 1, akutna mieloblastna levkemija

ABSTRACT

Research group at immunology department in University Medical Centre (UMC) Utrecht, Netherlands, developed a pre-clinical dendritic cell vaccine derived from cord blood CD34⁺ hematopoietic stem cells. The vaccine will be used in an upcoming clinical trial to prevent relapses in acute myeloid leukemia pediatric patients after receiving chemotherapy and cord blood stem cell transplantation. Since the oncoprotein Wilms' tumor 1 (WT1) is overexpressed in more than 90% of pediatric leukemia cases, it will be the target of our vaccine strategy. Dendritic cells, loaded with WT1 antigen, either in the form of full length mRNA or HLA class I restricted Wilms' tumor 1 peptides, cause induction of WT1 specific cellular immunity which enables CD8⁺ T lymphocyte mediated cytotoxic killing of leukemia blasts remaining in the patient after transplantation. Eradication of last leukemic cells is the key step to prevent relapses and high mortality in patients with acute myeloid leukemia.

The objective of our study was to elucidate the optimal antigen loading strategy of dendritic cells for the induction of WT1 specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, which can enhance the antigenic potential of the vaccine and consequently induce long-term immunological memory. As such, we optimised a 4 hour long cytotoxic assay using recombinant T cell receptor CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes as effector cells, specific for Wilms' tumor 1 126-134 epitope and human leukemia cell lines as target cells, labelled with CellTrace Violet fluorescent viability marker. With this method we compared the cytotoxic activity of tumor cells loaded with full length mRNA or 15 amino acid long peptides, where the latter seemed superior to elicit T cell mediated cytotoxic killing of loaded tumor cells. We performed a 24hour T cell activation assay as well as ELISA assay and came to the same conclusions.

Afterwards we generated 4 DNA constructs coping for increasing sizes of amino acid sequences, where we took a known Wilms' tumor 1 epitope (a.a.126-134) RMFPNAPYL, which specifically binds to HLA-A2 molecules as the template of our designs. We successfully determined the flanking primers and amplified the DNA sequences using the PCR method. We ligated these fragments into the pcDNA 3.1 plasmid vector and transduced them into Escherichia Coli. Unfortunately, despite our best efforts and multiple trials, we could not detect the correct plasmid DNA fragments after isolation of grown bacterial colonies.

Keywords: dendritic cell-based vaccine, Wilm's tumor 1, acute myeloid leukemia

SEZNAM OKRAJŠAV

7AAD	7-Aminoaktinomicin D
aGvHD	akutna reakcija presadka proti gostitelju (ang. acute Graft versus host disease)
ak	aminokislina
AML	akutna mieloblastna levkemija
APC	antigene predstavljajoče celice
bp	bazni par
CD	označevalec antigenov na površini posameznih celic (ang. Cluster of differentiation)
Celice NK	naravne celice ubijalke (ang. Natural killer cells)
Celice T _H	celice T pomagalko (ang. T helper cells)
CLT	citotoksični limfociti T
CTV	CellTrace Violet, vijolično celično barvilo
DC	dendritične celice
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimsko-immunski test (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	endoplazmatski retikulum
FBS	fetalni goveji serum (ang. Fetal bovine serum)
FitC	fluorescein-5-izotiocianat
Flt3L	ligand FMS-podobne tirozinske kinaze 3
GM-CSF	granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
GvL	reakcija presadka proti levkemiji (ang. Graft versus leukemia)
HLA	kompleks tkivne skladnosti pri človeku (ang. Human leukocyte antigens)
HRP	hrenova peroksidaza
IFN	interferon
IL	interlevkin
KMC	krvotvorne matične celice
LB	bakterijsko gojišče Luria-Bertani
MACS	magnetno ločevanje celic (ang. Magnetic-activated cell sorting)
mDC	mieloidne dendritične celice

MFI	srednja intenziteta fluorescence (ang. Median fluorescence intensity)
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (ang. Major histocompatibility complex)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (ang. Phosphate-buffered saline)
PC5	Fikoeritrin-cianin-5
PC7	Fikoeritrin-cianin-7
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)
pDC	plazmacitoidne dendritične celice
PE	fikoeritrin
PerCP	peridin klorofil
PGE-2	prostaglandin-E2
PK	popkovnična kri
RNA	ribonukleinska kislina
SCF	kolonije spodbujajoči dejavnik (ang. Stem cell factor)
TAA	antigeni značilni za tumorske celice (ang. Tumor associated antigens)
TC	tumorske celice
TCR	celični receptor limfocitov T
T _m	temperatura tališča
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
WT1	Wilmsov tumor 1 gen
ZO	začetni oligonukleotidi

1. UVOD

1.1 AKUTNA MIELOBLASTNA LEVKEMIJA

Novi pristopi v imunski terapiji so v zadnjih 10 letih bistveno izboljšali preživetje bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML). Kljub napredku in izboljšavam na področju presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC), je po zadnjih statističnih podatkih preživetje pediatričnih bolnikov prvih pet let po prvi diagnozi okoli 50%, skupaj z odraslimi do 60 let pa le 24%. Starejši bolniki, ki ne morejo prejeti intenzivne kemoterapije, povprečno preživijo zgolj nekaj mesecev ali največ eno leto. Glavni vzrok za visoko smrtnost je predvsem ponovni izbruh bolezni, ki se žal pojavi pri večini bolnikov, in to kljub popolni remisiji po klasični polikemoterapiji in presaditvi KMC. Za dolgoročno ozdravitev bolnika je nujno potrebna popolna odstranitev levkemičnih tumorskih celic, kar je glavni cilj sodobne imunske terapije (1, 2, 3).

Akutna mieloblastna levkemija je rakava bolezen krvnih celic mieloične vrste, pri kateri kromosomske translokacije povzročijo zapis nenormalnih fuzijskih beljakovin, najpogosteje transkripcijskih dejavnikov, katerih spremenjene lastnosti povzročijo blokado celične diferenciacije. Značilen je hiter razrast nenormalnih nezrelih mieloblastov, ki se kopičijo v kostnem mozgu in motijo tvorbo normalnih krvnih celic. Posledično pride do pomanjkanja zdravih levkocitov, kar se kaže v večji dovzetnosti bolnikov za okužbe ter pojavu gripi podobnih simptomov. Poznamo več podvrst AML z različnimi prognozami in načini zdravljenja. AML zdravimo dvostopenjsko, indukcijsko in konsolidacijsko. Z indukcijskim zdravljenjem skušamo doseči remisijo bolezni s kombinacijo citostatikov, npr. citarabina in davnorubicina. To dosežemo, ko v krvni sliki ne zaznavamo več prisotnosti levkemičnih tvorb. Nato sledijo dva do trije cikli konsolidacijskega zdravljenja s citostatiki in imunosupresivi z namenom, da odstranimo preostale levkemične celice, ki jih ne moremo več zaznati s sodobnimi diagnostičnimi metodami. Pri bolnikih z visokim tveganjem za ponovitev bolezni pa priporočajo alogensko presaditev KMC (4).

Pred presaditvijo alogenskih KMC bolnik prejme visoke odmerke kombinacije citostatikov, in sicer busulfana in ciklofosfamida ali fludarabina, redkeje pa ciklofosfamida in obsevanje. Najpogostejša zapleta po presaditvi KMC sta dovzetnost bolnikov za okužbe in akutne reakcije presadka proti gostitelju oziroma aGvHD (ang. *acute Graft versus Host Disease*). Za preprečevanje slednje mora bolnik prejeti imunosupresivna zdravila,

najpogosteje ciklosporin v kombinaciji z metotreksatom (4, 5). Za presaditev lahko uporabimo alogenske KMC, izolirane iz periferne krvi, kostnega mozga ali popkovnične krvi (PK). Slednje pridobimo tako, da jih po rojstvu otroka zberemo iz placente in popkovnične vene. Ta postopek pridobivanja in uporabe KMC je primeren predvsem za pediatrične bolnike, in sicer za zdravljenje več kot 70 različnih vrst bolezni. Bistvene prednosti uporabe PK so visoka vsebnost KMC v vzorcu, predvsem pa redkejša pojavnost in lažji potek aGvHD (4).

Poglavitna prednost alogenske (darovane celice) pred avtologno (lastne celice) presaditvijo KMC je prepoznavanje morebitnih ostankov malignih celic kot tujkov in njihovo odstranjevanje s protitumorsko usmerjenimi kloni darovalčevih limfocitov. Govorimo o t.i. reakciji presadka proti levkemiji ali GvL (ang. *Graft versus Leukemia*). Ključnega pomena za nastanek GvL po presaditvi KMC je hitra proliferacija tumorsko specifičnih citotoksičnih limfocitov T (CLT) darovalca. Izid presaditve KMC lahko izboljšamo s predhodno ekspanzijo KMC iz PK ali z uporabo dveh enot PK ter s sočasno aplikacijo specifičnih protitumorskih limfocitov T, predhodno pripravljenih in namnoženih *ex vivo* (adoptivna imunska terapija). Med najnovejše pristope za zdravljenje levkemij po presaditvah KMC uvrščamo imunske terapije, ki so bodisi pasivne (npr. infuzija limfocitov T, ki izražajo rekombinantne T-celične receptorje ali protitumorskih protiteles) ali aktivne, kjer stimuliramo bolnikov lastni imunski sistem s cepivi v obliki DC, opremljenih s tumorskimi antigeni (6, 7, 8).

1.2 VLOGA DENDRITIČNIH CELIC V IMUNSKEM SISTEMU

1.2.1 Dendritične celice

Dendritične celice (DC) so specializirane oz. profesionalne antigene predstavljajoče celice (APC), ki imajo pomembno vlogo pri indukciji in regulaciji primarnega celičnega imunskega odziva ter učinkovito povezujejo prirojeno in pridobljeno imunost. Heterogena populacija DC nastaja v kostnem mozgu pod vplivom ravnega in diferenciacijskega dejavnika, liganda fms-podobne tirozinske kinaze 3 (Flt3L) ter granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajočega dejavnika (GM-CSF). Poznamo tri diferenciacijske stopnje DC: predhodniške ali prekurzorske celice ter nezrele in zrele DC (9, 10).

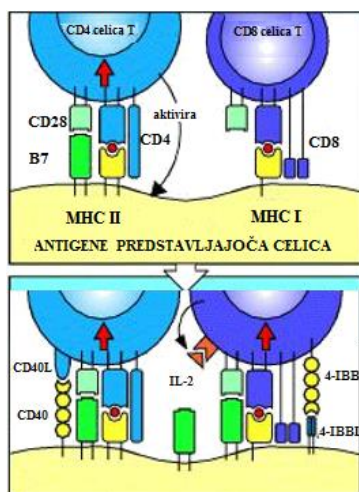
DC lahko razvrstimo v dve osnovni skupini, na osnovi njihovega označevanja s protitelesi proti površinskim molekulam CD11c in CD123. Tako so CD11c⁺ in CD123⁻ DC monocitnega izvora in jih imenujemo mieloidne DC (mDC), CD11c⁻ CD123⁺ DC pa so limfoidnega izvora in jih uvrščamo med limfoidne oz. plazmacitoidne DC (pDC). Prekursorji DC ter nezrele, še posebej pa zrele DC značilno močno izražajo molekule pglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC – *ang. Major histocompatibility complex*) razreda II, na njihovih površinah pa ni površinskih molekul CD14 (monociti), CD3 (celice T), CD19, 20, 24 (celice B), CD56 (naravne celice ubijalke) in CD66b (granulociti). Samo zrele DC pa izražajo kostimulacijske molekule CD83 (10).

Skupini mDC in pDC se razlikujeta glede na porazdelitev po telesu, nabor citokinov, ki jih proizvajata in funkcijah. Tako imajo pDC pomembno vlogo v nespecifični, prirojeni protivirusni imunosti. Nahajajo se predvsem v krvi in limfatičnih organih, kjer so pglavitne proizvajalke interferona α (IFN- α). Ugotovili so, da pDC lahko aktivirajo protitumorski odziv, vendar pa je ta njihova funkcija še vedno dokaj neraziskana. Nasprotno pa najdemo mDC v različnih tkivih in jih na podlagi tega delimo v dve večji skupini: 1) Langerhansove DC, ki se nahajajo v epidermisu in 2) intersticijske ali mukozne DC, ki se nahajajo v sluznicah črevesja, urogenitalnega in respiratornega trakta. Trenutne raziskave kažejo, da so intersticijske DC uspešnejše pri aktivaciji humoralne imunosti kajti vplivajo na diferenciacijo CD4⁺ celic T do folikularnih celic pomagalk (T_H – *ang. T helper cell*). Langerhansove DC pa so zelo uspešne aktivatorke celične imunosti, predvsem s CD8⁺ limfociti T posredovane citotoksičnosti, pri čemer igra pomembno vlogo IL-15, ki ga proizvajajo (9, 11).

1.2.2 DC in predstavljanje antigenov

Nezrele DC privzemajo antigene iz svojega mikrookolja s fagocitozo, makropinocitozo ali receptorsko posredovano endocitozo. Med njihove najbolj izražene endocitozne receptorje spadajo receptorji lektinskega tipa C (npr. manozni receptorji in molekule DEC-205), integrini ter receptorji Fc- γ tipov I, II in III. Nezrele DC imajo torej visoko endocitozno aktivnost, zato neprestano vzorčijo svoje mikrookolje, obenem pa majhen potencial za aktiviranje limfocitov T. Morebitno prisotne patogene, torej bakterije in viruse, pa tudi mrtve celice in imunske komplekse zaznajo z receptorji PRR (*ang. Pattern Recognition Receptors*) (9, 11).

Po privzemu antigenov in njihovi prepoznavi s PRR se začne pot zorenja nezrelih DC, ki se postopno pretvorijo oz. dozoriijo v specializirane celice, nujno potrebne za učinkovito stimulacijo limfocitov T. Pri tem se morfološko spremenijo, reorganizirajo citoskelet, izgubijo adhezijske sposobnosti, pridobijo pa številne izrastke (dendrite) in sposobnost migracije do bližnjih bezgavk, kar jim omogočajo na novo izraženi kemokinski receptorji CCR7. Zrele DC imajo zmanjšano sposobnost za privzem antigenov, močno pa povečajo izražanje molekul MHC razredov I in II ter kostimulacijskih molekul B7.1(CD80) in B7.2(CD86), ki se vežejo na aktivacijske molekule CD28 in zaviralne molekule CTLA-4, izražene na CD4⁺ limfocitih T. Po interakciji z zreli DC, ki predstavljajo antigenske peptide, vezane na molekule MHC, aktivirani limfociti T povečajo izražanje receptorjev 4-1BB in molekul CD40L, ki se vežejo na ustrezne aktivacijske ligande na površini DC (Slika 1). Zorenje in diferenciacijo limfocitov T pa pospešujejo tudi vnetni citokini, npr. TNF- α , IL-12 in IFN- α , ki jih proizvajajo DC (12).

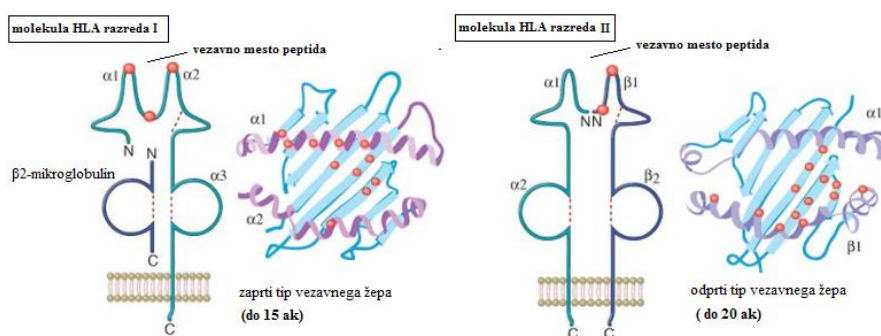


Slika 1: Shematski prikaz kostimulacije CD4⁺ limfocitov T z APC preko interakcij med kostimulativnimi molekulami CD28 in B7 ter CD40 in CD40L (zgoraj) ter posredno aktivacijo CD8⁺ celic T s spodbujanjem izločanja IL-2 ter izražanja aktivacijskih molekul 4-1BB (spodaj). Prirejeno po viru (13).

DC proteine, potem, ko jih privzamejo iz mikrookolja, encimsko razgradijo na krajše peptide, ki se nato znotrajcelično vežejo na molekule MHC razreda II. Nastali kompleksi MHC-peptid se transportirajo na površino DC in s tem omogočijo njihovo prepoznavanje z ustreznimi kloni T-celičnih receptorjev (TCR), prisotnih na CD4⁺ limfocitih T. TCR je heterodimer, največkrat sestavljen iz polipeptidnih verig α in β , pri čem ima vsaka od njiju variabilno in konstantno področje, podobno kot protitelesa. Molekule MHC so izjemno polimorfni glikoproteini, ki jih kodirajo geni na krajšem kraku 6. kromosoma in

predstavljajo eno od najbolj variabilnih področij v človeškem genomu. Molekule MHC razreda I in II pri človeku označujemo s kratico HLA (*ang. Human Leukocyte Antigens*). Razvrščamo jih v skupine HLA-A, HLA-B, HLA-C (razred I) ter HLA-DR, HLA-DQ in HLA-DP (razred II) (12).

Molekula HLA razreda I je zgrajena iz transmembranske polipeptidne verige α , sestavljene iz treh domen in nanjo nekovalentno vezanega β_2 -mikroglobulina. Vezavno mesto za antigenski peptid tvorita variabilni domeni α_1 in α_2 . Molekula HLA razreda II pa je zgrajena iz dveh transmembranskih verig α in β , zgrajenih iz po dveh domen, pri čemer variabilni domeni α_2 in β_2 tvorita vezavno mesto za antigenske peptide (Slika 2) (12).



Slika 2: Strukturi molekul HLA razreda I (levo) in II (desno) ter obliki vezavnih mest za antigenske peptide - pogled od zgoraj; prirejeno po viru (14).

Pomembna razlika v zgradbah molekul HLA razredov I in II je tudi v vezavnih nišah za peptide. V molekuli HLA razreda I je njena velikost omejena na 8 do 15 aminokislinskih ostankov, nasprotno pa je pri molekuli HLA II ta na obeh skrajnih delih bolj odprta, zato se lahko vanjo vežejo daljši, tudi do 20 aminokislinskih dolgi peptidi. Vezavna mesta v različnih alelskih različicah molekul HLA, v odvisnosti od aminokislinskih zaporedij, definirajo specifičnosti peptidov ki se lahko vežejo vanje, kar označujemo z izrazom vezavna restrikcija HLA. V takoimenovanih vezavnih žepih se sidrni aminokislinski ostanki v vezavnem mestu nekovalentno povezujejo z verigo aminokislinskih atomov vzdolž antigenskega peptida. TCR prepozna kompleks HLA-peptid tako, da je usmerjen diagonalno nanj, pri čemer pride v stik tako z izpostavljenimi deli peptida kot tudi z deli domen molekule HLA, ki ga predstavlja (12, 15).

Molekule HLA razreda I z vezanimi peptidi prepoznavajo s svojimi TCR $CD8^+$, molekule HLA razreda II s peptidi pa TCR na $CD4^+$ limfocitih T. Antigeni, ki nastajajo znotraj citozola (t.i. endogeni antigeni, npr. deli virusov ali pa lastni fiziološko ali patološko

prisotni proteini) se najprej procesirajo do peptidov, ti pa nato vstopijo v endoplazmatski retikulum, kjer se lahko vežejo na molekule HLA razreda I (Slika 3). Zunajcelični oz. eksogeni antigeni pa pridejo v APC z endocitozo, se v kisljih veziklih z encimi razgradijo do peptidov, ti pa se nato vežejo na molekule HLA razreda II, ki preko omenjenih veziklov potujejo na celično površino (Slika 3) (11, 12).

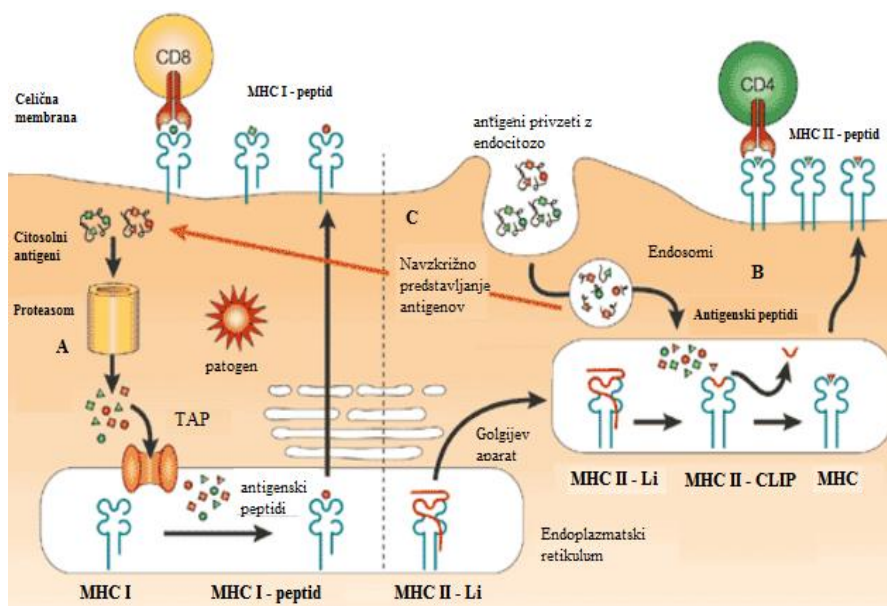
Razgradnja endogenih proteinov poteka preko citolitične poti, ki zajema njihovo ubikvitinacijo ter razgradnjo s proteasomskimi encimskimi kompleksi do različno dolgih peptidov. Ti nato potujejo v lumen endoplazmatskega retikuluma (ER) z aktivnim, od ATP odvisnim transportom preko prenašalca TAP (*ang. Transporters associated with Antigen Processing*). V ER se nato s pomočjo šaperonov tapasina, kalneksina in kalretikulina vežejo na molekule HLA I, nato pa tako nastali kompleksi preko Golgijevega aparata potujejo na površino celice (11, 12, 15).

Zunajcelični proteini, ki jih APC privzamejo z endocitozo, se razgradijo v endosomih, ki se zlijejo s kisljimi lizosomi. Pri tem znižanje vrednosti pH aktivira kisle proteaze, ki proteinske antigene razgradijo na manjše peptidne fragmente. V ER nastale molekule HLA razreda II imajo vezavno mesto za antigene zasedeno z invariantno verigo (Ii), ki preprečuje vezavo endogenih peptidov. Ko molekula HLA II prispe v kisle endosome, encimi razcepijo Ii, v vezavnem mestu pa ostane manjši fragment CLIP, ki se iz vezavne niše sprostí šele po interakciji med molekulama HLA razreda II in HLA-DM, s čimer sta omogočena dostop in vezava eksogenih peptidov (12, 15).

Navzkrižna predstavitev antigenov

Poleg opisanih pa obstaja tudi alternativna pot, preko katere v DC, potem ko se v njih eksogeni antigen razgradi do ustreznih peptidov, lahko pride do njihove vezave ne le na molekule HLA razreda II, temveč tudi razreda I. Ta navzkrižni mehanizem predstavljanja antigenov (*ang. Cross-Presentation ali Cross-Priming*) omogoča DC tako aktivacijo CD4⁺ kot tudi CD8⁺ limfocitov T in igra pomembno fiziološko vlogo pri indukciji tolerance na lastne antigene. Procesirani antigeni pa so seveda lahko tudi apoptotične ali nekrotične tumorske celice, z virusom okužene celice ter različni imunski kompleksi. Ta alternativna predstavitevna pot antigenov je možna predvsem zaradi velike raznolikosti molekul, ki sodelujejo v antigenskem procesiranju. Pri navzkrižni prezentaciji poteka privzem antigenov najpogosteje s fagocitozo, v določenih primerih pa tudi z receptorsko

posredovano endocitozo. Možno je tudi, da eksogeni proteini in peptidi zapustijo endosomski prostor in se vključijo v citolitični proces v citozolu, kjer jih proteasomi razgradijo na krajše peptide, ki se nato preko TAP prenesejo v ER, kjer se lahko vežejo na molekule HLA razreda I. Poleg tega predvidevajo, da se novo nastali fagosomi, ki vsebujejo eksogene antigene, lahko približajo ER in z njim tvorijo skupni predel, v katerem se nato lahko eksogeni peptidi vežejo na proste molekule HLA razreda I (Slika 3). Nastali kompleksi HLA I-eksogeni peptid potem, tako kot v primeru klasičnega predstavljanja endogenih antigenov, potujejo na površino APC, kjer jih nato s svojimi TCR prepoznajo ustrezni kloni naivnih CD8⁺ celic T (11, 16).



Slika 3: Shematski prikaz klasičnih in navzkrižnih poti predstavljanja antigenov v okviru molekul MHC razredov I in II; prirejeno po viru (17).

1.2.3 Interakcije DC z limfociti T

Specifično prepoznavanje kompleksov molekula HLA-antigenski peptid s TCR na limfocitih T s tujko imenujemo »priming«. Ta proces se dogaja v sekundarnih limfatičnih organih, torej bezgavkah, vranici ali sluzničnih limfatičnih tkivih. Uspešen »priming« naivnih limfocitov T se kaže v njihovi klonski ekspanziji in diferenciaciji v efektorske ter na koncu spominske celice. Obseg oz. jakost T-celičnega odziva je odvisen od več dejavnikov, npr. količine izraženih antigenov na DC, afinitete vezave TCR na komplekse HLA-peptid, vrste stimulacije in stopnje dozorelosti DC. Nezrele DC lahko le šibko in za kratek čas stimulirajo limfocite T, zato se v takem primeru imunski spomin ne razvije. Nasprotno pa lahko zrele DC bistveno močnejše in dlje stimulirajo celice T, poleg tega pa

zaradi citokinov IL-2, IL-7, IL-12 in IL-15, ki jih proizvajajo spodbujajo razvoj tako efektorskih kot spominskih limfocitov T (12).

Aktivacija CD4⁺ limfocitov T z DC je ključnega pomena tudi za nastanek spominskih CD8⁺ celic T. Menijo, da je ta efekt povezan z interakcijami med kostimulativnimi molekulami CD40-CD40L, preko katerih CD4⁺ celice T dodatno, povratno aktivirajo zrele DC, te pa uspešno inducirajo nadaljnje nastajanje spominskih CD8⁺ limfocitov T. Pri tem sodelujejo tudi druge površinsko izražene molekule, npr. člani receptorske družine TNF, OX40 in 4-1BB. CD4⁺ limfociti T pomembno sodelujejo tudi v procesih ekspanzije in diferenciacije CD8⁺ limfocitov T, in sicer z izločanjem IFN- γ in IL-2. Prav tako so ugotovili, da igrajo naravne regulatorne celice T (T_{REG}) pomembno vlogo pri selekciji CD8⁺ limfocitov T z visoko afinitetnimi in avidnimi TCR, kar je posledica interakcij med CD4⁺ celicami T in DC. Celice T_{REG} proizvajajo IL-10, s katerim lahko zavrejo delovanje DC in uravnavajo nastajanje kemokinov, s čimer omejuje interakcije med DC in celicami T z nizko avidnimi TCR za prepoznavanje posameznega antigena (18).

DC lahko, glede na vrsto aktivacijskega dražljaja, ki ga posredujejo, vplivajo na funkcijske lastnosti naivnih CD4⁺ limfocitov T. Po aktivaciji se namreč lahko ti diferencirajo bodisi v smeri celic pomagalk T_{H1} ali pa T_{H2}. Prve so vnetne celice, ki proizvajajo IL-2, IFN- γ in TNF- β , s čimer ojačijo citotoksični odziv CD8⁺ celic T, druge pa sproščajo protivnetne citokine, IL-4, IL-5, IL-10 in IL-13 in tako zmanjšujejo vpliv celic T_{H1}, poleg tega pa promovirajo humoralne imunske odzive, saj vzpodbujajo nastajanje plazmatk iz aktiviranih limfocitov B ter s tem tvorbo protiteles. Smer diferenciacije naivnih limfocitov T torej določajo citokini, ki jih proizvajajo stimulirane DC. Njihov profil (vnetni ali protivnetni) je odvisna od podtipa DC, anatomske lokacije, kjer potekajo medcelične interakcije in vrste dražljaja za zorenje DC (12, 18).

1.2.4 Citotoksičnost CD8⁺ celic T (CLT)

Vezava TCR na komplekse molekula HLA razreda I-antigenski peptid na tarčni celici povzroči polarizacijo CD8⁺ CLT, posledični dvig znotrajcelične koncentracije Ca⁺⁺ in reorganizacijo citoskeleta. Efektorski CD8⁺ limfociti T sproščajo specializirane litične granule s proteinom perforinom, ki tvori luknjice v celični membrani tarčnih celic in granicimi, ki preko aktivacije kaspaz v tarčnih celicah sprožijo proces apoptoze. CLT lahko aktivirajo apoptozo tarčnih celic tudi neodvisno Ca⁺⁺ ionov, in sicer preko vezave

Fas-L (CLT) na molekulo Fas (tarčna celica). Na aktiviranih efektorskih CLT se poveča izražanje adhezijskih molekul LFA-1 in receptorjev CD2, preko katerih se tesno povežejo s tarčnimi celicami in ostanejo nanje vezani dovolj dolgo, da lahko sprostijo efektorske citotoksične molekule. Ta čas pa je npr. precej krajši kot v primeru vezave efektorskih CD4⁺ limfocitov T na makrofage ali limfocite B. Pri tem nastaja IFN- γ , ki blokira virusno replikacijo in omogoča še učinkovitejšo odstranitev patogenov. Po tem, ko se odcepijo od tarčnih celic, CLT ponovno sintetizirajo citotoksine in napadejo naslednje. Mehanizem njihove citotoksičnosti je torej strogo antigensko specifičen in omogoča smrt posamičnih tarčnih celic brez pojava nekroze (11, 12).

1.3 PROTITUMORSKO CEPIVO IZ DC

S številnimi raziskavami so v zadnjih dvajsetih letih dokazali, da lahko cepiva izdelana iz DC, opremljena z ustreznimi tumorskimi antigeni, vnetnimi citokini ali drugimi adjuvanti, izzovejo specifične imunske in pozitivne klinične odzive bolnikov z rakom, predvsem pa, da je njihova uporaba varna. Leta 1990 so objavili prvi članek o kliničnem testiranju tovrstnih cepiv, od takrat pa so na tem področju izvedli več kot 1.300 novih kliničnih študij (www.clinicaltrials.gov), med katerimi jih je trenutno 150 v fazi III.

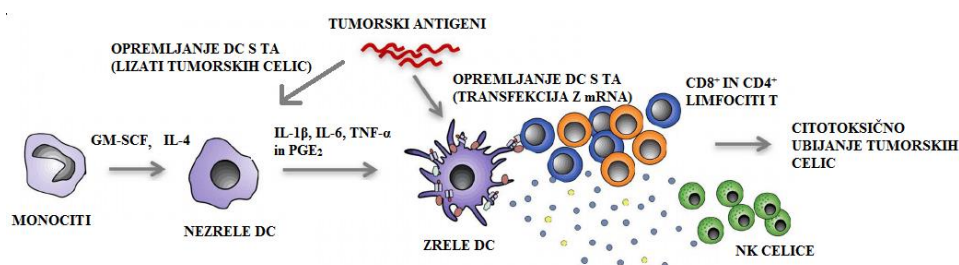
Tumorske celice razvijejo številne mehanizme, s pomočjo katerih se izognejo imunskemu nadzoru in s tem uničenju. Mednje sodijo številne genske mutacije, izgube izražanja določenih antigenov in indukcija izrazite imunosupresije po več poteh, kot npr. s sekrecijo TGF- β . Potem ko tumorske celice uidejo imunskemu nadzoru, vztrajajo v ravnovesju z imunskim sistemom, vse dokler se to ne prevesi v prid napredovanja tumorja. Z razvojem in uporabo cepiv na osnovi DC, opremljenih z antigeni, značilnimi za tumorske celice (TAA - *ang. Tumor Associated Antigens*), lahko imunskim celicam bolnika ponovno omogočimo prepoznavanje in ubijanje malignih celic (19).

Najnovejši pristop tovrstne terapije je tudi aktivacija specifičnega in nespecifičnega protitumorskega imunskega odziva z adoptivno uporabo efektorskih celic, generiranih *ex vivo*, npr. naravnih celic ubijalk (NK – *ang. Natural Killer Cells*), tumorsko specifičnih CLT, opremljenih s himernimi antigenskimi receptorji (CAR) ali transgenimi TCR. Največ takih terapij so preskusili na bolnikih z malignim melanomom, rakom prostate, malignim gliomom in ledvičnim rakom, ki sodijo med najbolj imunogene rakave bolezni (18, 20, 21).

V fazi I kliničnih preskušanj se je uporaba cepiv na osnovi DC izkazala kot varna, saj so zaznali so le blage lokalne reakcije (bolečina, izpuščaji ali srbečica) na mestu injiciranja. Le redko so se pojavili sistemski stranski učinki, npr. vročina ali občutek slabosti. Največja nevarnost, ki ji je bolnik pri takem zdravljenju izpostavljen je avtoimunska reakcija, vendar pa je verjetnost za njen nastanek majhna (21).

1.3.1 Izdelava cepiva iz DC

Osnovne zahteve za izdelavo tovrstnega cepiva so: priprava velikih količin avtolognih ali alogenskih DC *ex vivo*, njihova transfekcija s TAA in večkratna aplikacija cepiva bolniku v določenih časovnih intervalih (Slika 4).



Slika 4: Postopek priprave DC iz monocitov in njihovo opremljanje s TAA za specifično aktivacijo protitumorskih klonov CLT; prirejeno po viru (22).

Večinoma uporabljajo za pripravo cepiv iz monocitov pridobljene DC, ki jih dozoriijo z dodatkom citokinske mešanice IL-1 β , IL-6, TNF- α in PGE₂, s katero povečajo izražanje kostimulacijskih molekul CD40, CD80, CD83 in kemokinskega receptorja CCR7. Danes velja, da predstavljajo najboljši vir za pripravo DC CD34⁺ KMC, saj imajo take DC zelo dobre sposobnosti za aktivacijo CD8⁺ limfocitov T. Druga pomembna prednost tega pristopa, ki jo izkoriščajo predvsem pri presaditvah KMC pa je, da lahko v primeru nizkega števila CD34⁺ celic v presadku, protokolu dodajo dodaten ekspanzijski korak za povečanje njihovega števila pred postopkom diferenciacije v nezrele DC (20).

1.3.1.1 Izbor antigenov za pripravo celičnih cepiv

Pravilen izbor antigenov je najpomembnejši korak pri izdelavi celičnega cepiva. Ustrezni kandidati so tisti TAA, ki so se tekom nastanka tumorja izognili imunskemu nadzoru in so pomembni dejavniki njegove neovirane rasti in razvoja. Za vnos antigenov v DC največkrat uporabljamo metode elektroporacije, pasivne transfekcije z inkubacijo ali lipofekcije s kationskimi lipidi. Glede na podatke iz dosedanjih študij so protitumorska cepiva največkrat izdelali z uporabo mrtvih tumorskih celic (TC), tumorskih lizatov,

nativnih in sintetiziranih antigenskih proteinov/peptidov ter celokupne tumorske mRNA. Najbolje je seveda, da DC opremimo s celotnim antigenim naborom tumorja, in sicer tako, da jim dodamo lizirane tumorske celice, jih transficiramo s celotnim zapisom DNA/RNA za tumorske proteine ali pa tako, da z elektrofuzijo izdelamo imunohibridome iz DC in obsevanih TC. Takega pristopa se poslužujemo v primerih, ko ne poznamo ključnih tumorskih antigenskih epitopov, kadar se TAA razlikujejo med posameznimi bolniki, ki imajo sicer enako bolezen ali pa takrat, ko so geni, ki kodirajo tumorske proteine nagnjeni k pogostim mutacijam. Še najbolj raziskana je uporaba, s posameznimi aleli HLA omejena vezava antigenskih peptidov, ki jih lahko modificiramo tako, da ne povzročajo avtoreaktivnosti, pri tem pa ojačamo afiniteto s katero jih prepoznavajo specifični kloni TCR. Dobra stran te metode je tudi v tem, da omogoča enostavno in standardizirano izdelavo velikih količin sinteznih peptidov ter enostavnejše spremljanje specifičnih imunskih odzivov nanje. Njena slaba lastnost pa je omejenost vezave peptidov na točno določen alel HLA in nujna določitev njihovih imunogenih epitopov. Pri več epitopnem pristopu izdelave cepiv iz DC lahko uporabimo več različnih TAA naenkrat, pri čemer pa tekmovanje peptidov za vezavo na določeno molekulo HLA lahko zmanjša obseg izražanja želenih kompleksov HLA-peptid na površinah DC. Ugodno rešitev te težave predstavlja uporaba zapisov mRNA, prepisanih *in vitro*, za vse ali pa izbrane posamične peptide TAA. Z razvojem te metode opremljanja DC z antigeni so uspešno premagali omejitve izražanja peptidov v okviru točno določenih molekulah HLA in tako omogočili pripravo večjih količin imunogenega antigenskega materiala s postopkom PCR. Transfekcija DC s tumorsko DNA se ni izkazala pri aktivaciji limfocitov T, obenem pa so se odprla tudi vprašanja v zvezi z varnostjo njene uporabe zaradi možne vgraditve v celični genom. Pri uporabi RNA te nevarnosti ni, saj se v transficirani celici izraža le prehodno in se ne integrira v celični genom (20, 22, 23, 24).

DC lahko transficiramo tudi z rekombinantnimi proteini, transduciramo z nereplikativnimi rekombinantnimi virusnimi vektorji ali s plazmidnimi, TAA kodirajočimi vektorji. Vsi ti pristopi omogočajo molekulam HLA, da izberejo, vežejo in predstavijo najustreznejše epitope iz celotnega aminokislinskega zaporedja antigena. Imunogenost celičnih protitumorskih cepiv lahko ojačamo s sočasno aplikacijo tujih, močno imunogenih proteinov, kot je npr. KLH (*ang. Keyhole Limpet Hemocyanin*), citokinov IL-12, IL-15, ligandov kostimulacijskih molekul B7-2 in/ali CD40L ter kemokinov, npr. CCL21 (25, 26, 27).

1.3.1.2 Antigen WT1

Z določitvijo proteina Wilmsovega tumorja 1 (WT1), ki je TAA, značilen za AML, so se odprla vrata številnim novim imunoterapevtskim strategijam. Mutacija gena, ki kodira ta protein namreč povzroči nastanek Wilmsovega tumorja. Gre za pogosto obliko ledvičnega raka v zgodnjem otroštvu, protein WT1 pa je transkripcijski dejavnik cinkovega prsta, ki je kodiran na kromosomu 11p13 in je prekomerno izražen v levkemičnih blastih (v 90% pri AML) ter tumorjih ledvičnega, kolorektalnega in pljučnega raka. Obilno izražanje proteina WT1 napoveduje slabši potek bolezni, zato je dober označevalec minimalne zaostale oz. rezidualne AML po polikemoterapiji in presaditvi KMC. V izredno nizkih koncentracijah ga lahko zaznamo tudi v tkivih spolnih žlez, maternice, ledvic ter v mezotelijskih strukturah. Gen, ki ga kodira je od 10- do 1.000-krat močnejše izražen v levkemičnih celicah, zato predstavlja idealno tarčo za zdravljenje levkemij. Njegov dobro raziskan imunogeni epitop je peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄ (RMFPNAPYL), ki se veže na molekule HLA-A2. Pogosto ga uporabljajo za spremljanja protitumorskega citotoksičnega delovanja CD8⁺ celic T in uspešnosti poteka zdravljenja po imunski terapiji (28, 29, 30, 31).

1.3.1.3 Ojačanje odziva CLT preko stimulacije CD4⁺ limfocitov T

Raziskave kažejo, da hkratna stimulacija CD8⁺ in CD4⁺ limfocitov T omogoča obsežnejšo in trajnejšo aktivacijo CLT, njihovo večjo infiltracijo v tumorske predele in modulacijo njihovega mikrookolja, kar vodi v zmanjšanje velikosti tumorja. Za uspešno indukcijo teh učinkov pa moramo seveda izbrati take TAA, ki poleg CD8⁺ aktivirajo tudi CD4⁺ limfocite T, predvsem celice T_H1. Pri opremljanju DC z antigeni je zato pomembna polivalentna izbira peptidov, ki se lahko vežejo tako na molekule HLA razreda I kot II. Dober način za doseg tega cilja je izkoriščanje navzkrižnega predstavljanja omenjenih peptidov na različnih molekulah HLA. Pri tem lahko uporabimo določene komplekse antigen-protitelo za vezavo na receptorje Fc, izražene na DC, ciljanje receptorjev DEC-205 ali stimulacijo DC z agonisti tollu podobnih receptorjev TLR. Med novejše pristope sodijo tudi transfekcija DC z modificiranimi plazmidi mRNA, protismiselnimi oligonukleotidi za invariantno verigo (Ii) ter uporaba fuzijskih konstruktov, ki spremenijo endosomsko/lizosomsko transportno signalizacijo (12, 32).

1.3.2 Aplikacija cepiv iz DC

Način aplikacije in odmerjanje celičnih cepiv sta v vsakem posameznem primeru specifična. Običajno jih, razen pri prvi aplikaciji do uporabe hranijo zmrznjene v tekočem N₂. V različnih študijah so jih aplicirali intradermalno, subkutano, intranodalno ali intratumorsko, pri čemer so posamezne odmerke s po 2 – 10 x 10⁶ celic bolnikom injicirali 2 - 6-krat, z vmesnimi večtedenskimi premori. Mesto aplikacije pomembno vpliva na učinkovitost in jakost aktivacije limfocitov T. Glede na dosedanje izsledke so bile najučinkovitejše subkutane in intradermalne aplikacije, ki omogočajo migracijo DC v bližnje bezgavke. Še vedno pa ni enotnega mnenja o tem, ali je potrebno DC aplicirati v predel blizu tumorja in tako ponovno vzpodbuditi tumorje infiltrirajoče limfocite ali pa je bolje predstaviti TAA novim, naivnim celicam T, morda z intranodalno (v bezgavko) dostavo cepiva (33, 34).

1.3.3 Spremljanje učinkov po aplikaciji cepiv iz DC

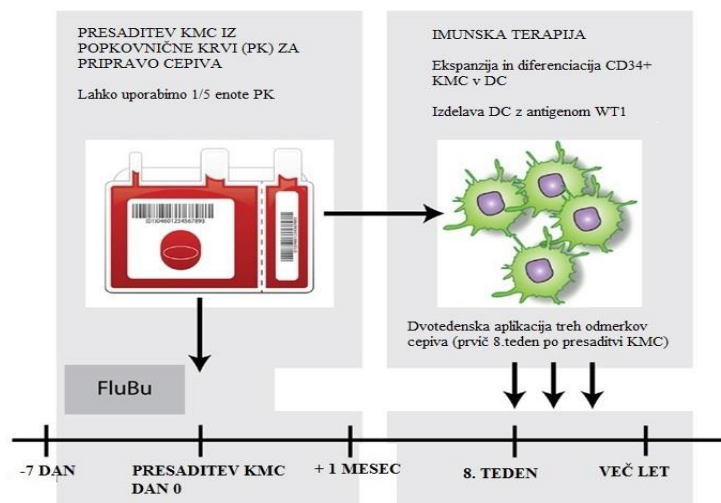
Dandanes še vedno nimamo standardiziranega načrta za spremljanje učinkovitosti protitumorskih terapij s celičnimi cepivi, zato je objektivno primerjanje uspešnosti tovrstnega zdravljenja med posameznimi kliničnimi študijami zelo težko. Največ podatkov *in vivo* je na razpolago v poročilih o kliničnih testiranjih faz I in II, v katerih preučujejo predvsem varnost cepiv in včasih tudi o preživetju bolnikov. Glavni cilj testiranj *in vitro* pa je določanje nadomestnih funkcijskih parametrov, s katerimi lahko ugotovljamo spremembe in potek napredovanja bolezni ter tako skušamo kar se da točno napovedati klinični izid imunske terapije pri bolnikih. V ta namen se najpogosteje uporabljata analiza efektorskega T-celičnega repertoarja in ugotavljanje efektorskih funkcij s specifičnimi antigeni stimuliranih limfocitov T (35, 36, 37).

Zlati standard predstavlja določanje števila aktiviranih CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T ter ugotavljanje citotoksičnega delovanja specifičnih protitumorskih CLT. V primeru cepiv iz DC, opremljenih z znanimi TAA lahko analiziramo nastale specifične klone CLT z uporabo ustrezno označenih tetramerov ali pentamerov molekul HLA-peptid in pretočne citometrije. Gre za z ustreznim fluorokromom označene multimere kompleksov molekula HLA-peptid, ki se selektivno vežejo na ustrezne antigensko specifične TCR, izražene na posameznih klonih CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T. Za določanje koncentracij proizvedenih citokinov, predvsem IFN- γ , TNF- α in IL-2, najpogosteje uporabljamo encimsko-immunske

teste ELISA ali izvedenko ELISPOT. Citokine lahko merimo tudi z znotrajcelično, z večparametrsko pretočno citometrijo, pri čemer moramo predhodno *in vitro* aktivirane celice T najprej permeabilizirati, da lahko vanje vstopijo za citokine specifična, fluorescenčno označena protitelesa. Drug sklop metod pa nam omogoča ugotavljanje števila in funkcije celic T, ki sta povezana z njihovo aktivacijo, proliferacijo, citotoksičnostjo in proizvodnjo citokinov. S proliferacijskimi testi limfocitov T lahko primerjamo T-celične odzive pred in po cepljenju. Metoda temelji na stimulaciji limfocitov T z APC, opremljenimi s TAA ter merjenju količine s tricijem označenega radioaktivnega timidina, ki se vgradi med sintezo na novo nastalih verig DNA. S citotoksičnimi testi pridobivamo pomembne informacije o protitumorskem delovanju cepiva, saj merimo jakost protitumorskega citotoksičnega delovanja efektorskih CD8⁺ CLT. Test izvedemo tako, da specifične efektorske CD8⁺ limfocite T 4h inkubiramo s tarčnimi celicami, napolnjenimi z radioaktivnim ⁵¹Cr ter nato izmerimo količine sproščenega kroma po njihovi citolizi. Kot tarčne celice večinoma uporabljamo TC, ki jih na različne načine opremimo s preiskovanimi TAA. Uporabljamo tudi različne metode PCR, s katerimi določamo prisotnost minimalne rezidualne bolezni - MRD (*ang Minimal Residual Disease*), ki je dober pokazatelj stanja bolezni in uspešnosti uporabljene imunske terapije (20, 35, 36, 37).

1.4 CEPIVO IZ DC IZDELANO V UMC V UTRECHTU

Raziskovalna skupina na oddelku za imunologijo UMC v Utrechtu, na Nizozemskem, je razvila učinkovito in varno cepivo iz DC, ki ga želijo aplicirati pediatričnim bolnikom z AML, po presaditvi KMC iz PK. DC, ki bi jih opremili z ustreznim antigenim peptidom WT1, bi uporabili za indukcijo specifičnega T-celičnega klonskega repertoarja, ki bi odstranil preostale levkemične celice, s čimer bi preprečili ponoven izbruh bolezni. Po standardnem zdravljenju AML s citostatikom fludarabinom in busulfanom, bolnik prestane presaditev KMC, pridobljenih iz PK. Za izdelavo cepiva lahko uporabijo le 1/5 KMC iz presadka. Cepivo prvič aplicirajo 8 tednov po presaditvi KMC, nato pa še dvakrat v dvotedenskih razmakih (Slika 5). Zaradi majhnega števila KMC in DC v odvzeti PK so morali razviti kultivacijski protokol, s katerim lahko 250 – 500-krat povečajo število CD34⁺ KMC in jih nato ustrezno diferencirajo v DC. Ta količina zadostuje za pripravo treh odmerkov cepiva za 30 kg težkega pediatričnega bolnika, od katerih vsak vsebuje po 1 x 10⁶ celic/kg telesne teže.



Slika 5: Časovni trak poteka presaditve KMC iz PK in nadaljnje imunske terapije s cepivom iz DC, pri pediatričnih bolnikih z AML. Povzeto po viru (20).

Ker je v pogojih dobre proizvodne prakse (GMP – ang. *Good Manufacturing Practice*) uporaba živalskih derivatov za pripravo celičnih cepiv za ljudi prepovedana, pri njihovi izdelavi za gojenje celic uporabljajo človeški AB serum. Izdelali so dvodelni protokol, sestavljen iz enotedenskega gojenja $CD34^+$ KMC v rastnem mediju s citokini Flt3L, SCF, IL-3 in IL-6 ter nadaljnjo enotedensko kultivacijo v diferenciacijskem mediju s 5% človeškega AB seruma in dodanimi GM-CSF, Flt3L, SCF in IL-4. Ekspanzijsko fazo lahko podaljšajo še za dva tedna, pri čemer dosežejo dodatno, 10-kratno povečanje števila DC na teden. Za aktivacijo DC uporabijo citokinsko mešanico iz IL-1 β , IL-6, TNF α in PGE $_2$, ki ustreza zahtevam GMP. Dokazali so, da so vse DC, ki jih pridobijo na ta način mieloidne vrste in izražajo ustrezne površinske molekule (HLA I in II, CD80, CD86, itd.). Nato s preverjanjem njihovih migracijskih in stimulacijskih lastnosti najprej preverijo njihovo ustreznost za izdelavo cepiva, potem pa vanje z elektroporacijo vstavijo celoten zapis mRNA za onkoprotein WT1, in sicer v koncentraciji 20 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$. Po inkubaciji TC z limfociti T, ki izražajo rekombinantne TCR, specifične za imunogeni antigenski peptid WT1 $_{126-134}$, so zaznali njihovo izrazito citotoksičnost, ob tem pa izmerili tudi povečano sproščanje IFN- γ , kar med drugim dokazuje ustrezno vezavo in predstavitev peptida WT1 $_{126-134}$ v okviru molekul HLA-A2. Pri tem so zaznali spremenljive jakosti aktivacije limfocitov T z uporabo DC različnih oseb, ki so so HLA-A2 pozitivni, kar pripisujejo individualnim razlikam v razgradnji proteinov in procesiranju antigenskih peptidov. Trenutni cilj raziskovalne skupine je optimizacija načina opremljanja DC s TAA, kar bi omogočilo še močnejšo in obsežnejšo aktivacijo klonov protitumorskih $CD4^+$ in $CD8^+$ limfocitov T (6).

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Delo bomo opravili na Univerzitetnem medicinskem centru (UMC) v Utrechtu, na Nizozemskem, kjer so razvili cepivo na osnovi DC, pridobljenih iz CD34⁺ KMC iz PK, ki ga nameravajo v prihodnji klinični študiji uporabiti kot dodatno imunsko terapijo po alogenski presaditvi KMC, za preprečitev ponovnega izbruha bolezni AML pri pediatričnih bolnikih.

Znano je, da je onkoprotein WT1 izražen v več kot 90% bolnikov z AML in je ustrezen pokazatelj negativnega poteka bolezni. Indukcija specifičnih CD8⁺ CLT, ki prepoznavao antigenske peptide WT1, vezane na ustrezne molekule HLA razreda I, omogoča odstranitev preostalih levkemičnih blastov po presaditvi KMC iz PK in s tem dolgoročno ozdravitev bolnikov z AML.

Po privzemu onkoproteina WT1, ga DC podvržejo zadržani proteolitični razgradnji, pri čemer pa je le malo nastalih antigenskih peptidov takih, da jih, vezane na molekule HLA, lahko prepoznajo limfociti T. Odločilni dejavniki pri nastanku in izboru ustreznih antigenskih peptidov so endosomske proteaze in pa izpolnjevanje strukturnih pogojev za njihovo vezavo na točno določene molekule HLA. Predpostavljamo, da je za boljšo aktivacijo WT1-specifičnih CD8⁺ citotoksičnih limfocitov T in vzpostavitev dolgoročne imunosti na omenjeni onkoprotein potrebno sočasno aktivirati tudi CD4⁺ celice T. Zato želimo pridobiti podatke o ustreznih velikostih in aminokislinskih zaporedjih peptidnih fragmentov WT1, ki bi omogočali njihovo predstavitev tudi v okviru molekul HLA razreda II. V primerjavi z molekulami HLA razreda I imajo namreč te na obeh straneh širše konce vezavne niše in so zato manj omejene glede velikosti in konfiguracije peptidnih antigenov (25, 38).

Poleg tega nameravamo v okviru magistrske naloge s pomočjo dostopnih imunskih testov ovrednotiti različne načine opremljanja DC s tumorskimi antigeni (TAA) ter preveriti uspešnost predstavljanja izbranih imunogenih peptidov onkoproteina WT1 na molekulah HLA obeh razredov, I in II.

Pri tem bo naš cilj optimizacija novejšega 4-urnega citotoksičnega testa *in vitro*, v katerem bomo namesto najpogosteje uporabljene metode označevanja tarčnih celic z radioaktivnim ⁵¹Cr uporabili vijolično celično barvilo CellTrace Violet (CTV), ki se

kumulira v citozolu (39). S pomočjo tega modificiranega citotoksičnega in klasičnega T-celičnega aktivacijskega testa bomo nato primerjali efektorske aktivnosti limfocitov T, opremljenih z WT1-specifičnimi rekombinantnimi TCR, potem, ko jim bomo dodali tumorske celice (TC), ki bodo v okviru molekul HLA-A2 (alelska različica A*02:01) predstavljale različne peptidne fragmente onkoproteina WT1, sestavljene bodisi iz po 15 ak (uporaba peptivatorja, t.j. definirane zbirke liofiliziranih peptidov) ali pa tiste, ki bodo nastali endogeno po transfekciji TC z mRNA z zapisom celotne dolžine WT1.

Menimo, da bomo z uporabo načrtovanih, različno velikih proteinskih fragmentov lahko določili optimalno velikost in strukturno konfiguracijo imunogenih peptidov WT1, ki bi se lahko uspešno vezali tako na molekule HLA razreda I kot II in tako izzvali aktivacijo protitumorskih CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T. V ta namen nameravamo izdelati 4 konstrukte mRNA za peptide WT1 z naraščajočimi aminokislinskimi dolžinami, pri čemer nam bo za osnovo dobro raziskani epitop WT1₁₂₆₋₁₃₄ (RMFPNAPYL), ki se dokazano veže na molekule HLA-A2. Konstrukte mRNA z različnimim zapisi za peptide WT1 bomo nato posamično elektroporirali v HLA-A2 pozitivne tumorske celice ter s testoma specifične T-celične aktivacije in citotoksičnosti primerjali njihovo antigensko učinkovitost oz. imunogenost.

Osnovni cilj našega dela bo torej izboljšanje antigenskega potenciala celičnega cepiva na osnovi DC ter s tem povečanje uspešnosti zdravljenja pediatričnih bolnikov z AML.

3. MATERIALI IN METODE

Vse postopke smo izvajali pod aseptičnimi pogoji, v komori z laminarnim pretokom filtriranega zraka, pri sobni temperaturi. Celične kulture smo gojili v inkubatorjih pri 37 °C, v vlažni atmosferi (95%), z dodanim 5% CO₂. Vsi uporabljeni laboratorijski materiali, gojišča in reagenti so bili sterilni in apirogeni.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in njihovih proizvajalcev.

Reagenti	Proizvajalec
0,4 % raztopina tripanskega modrila	Thermo Fisher, ZDA
7AAD (7-Aminoaktinomycin D)	Thermo Fisher, ZDA
Agarosa SeaKem LE	Lonza, Švica
Deoksiribonukleotidna mešanica, dNTP	Thermo Fisher, ZDA
EDTA (Etilendiamintetraoetna kislina)	Sigma-Aldrich, ZDA
mRNA GFP	Thermo Fisher, ZDA
mRNA WT1	Thermo Fisher, ZDA
Oranžni nanašalni pufer 6X	Thermo Fisher, ZDA
Označevalec nukleinskih kislin Midori Green	Bulldog Bio, ZDA
PBS (raztopina fosfatnega pufra, sterilna)	Sigma-Aldrich, ZDA
PenStrep (penicilin+streptomycin, 1:1)	Sigma-Aldrich, ZDA
Peptivator WT1	Milteny Biotec, Nemčija
Pufer TAE (tris-ocetna kislina-EDTA)	UMC Utrecht, Nizozemska
Pufer za pretočni citometer FACS	UMC Utrecht, Nizozemska
Raztopina fikola	Amersham, Združeno kraljestvo
Restriksijski pufer CutSmart 10X	New England BioLabs, ZDA
Türkov reagent	Merck, Nemčija
Voda za PCR	Thermo Fisher, ZDA
Začetni oligonukleotidi	Bioke, Nizozemska

3.1.2 Gojišča

Preglednica II: Seznam uporabljenih gojišč in njihovih proizvajalcev.

Gojišča	Proizvajalec
Agar gojišče za E.coli LB (Luria-Bertani)	UMC Utrecht, Nizozemska
Medij Optimem I	Thermo Fisher, ZDA
Medij RPMI 1640	Thermo Fisher, ZDA
Medij SOC	Thermo Fisher, ZDA
Medij X-VIVO 15	Thermo Fisher, ZDA
Tekoči medij LB z ampicilinom (100 µg/mL)	UMC Utrecht, Nizozemska

Za pripravo popolnega gojišča smo dodali RPMI 1640 mediju fetalni goveji serum (FBS) 10% (v/v) in 1% (v/v) PenStrep.

3.1.3 Kompleti

Preglednica III: Seznam uporabljenih reagenčnih/testnih kompletov in njihovih proizvajalcev.

Kompleti	Proizvajalec
Fiksirni/permeabilizacijski komplet Foxp3 PERM	eBioscience, ZDA
Fluorescenčno barvilo CellTrace Violet	Thermo Fisher, ZDA
Komplet za čiščenje plazmidov NucleoSpin	Macherey-Nagel, Nemčija
Komplet za ekstrakcijo in čiščenje DNA iz gela	Macherey-Nagel, Nemčija
Komplet za hitro ligacijo DNA	Roche, Švica
Mikromagnetni izolacijski komplet MACS CD34	Milteny Biotec, Nemčija
Phusion Hot start II HF DNA polimeraza in pufer	Thermo Fisher, ZDA
Test ELISA za določanje vsebnosti IFN- γ	eBioscience, ZDA

3.1.4 Laboratorijska oprema

Preglednica IV: Seznam uporabljene laboratorijske opreme in njihovih proizvajalcev.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Aparat za opazovanje in slikanje gelov G-box	Syngene, Združeno kraljestvo
Centrifuga	Bio-Rad, ZDA
Centrifugirke	Eppendorf, Nemčija
Centrifugirke s filtrom LeukoSep	Greiner Bio One, Avstrija

Čitalec gelov Gel Doc XR	Bio-Rad, ZDA
Čitalec mikrotitrskih plošč iMark	Bio-Rad, ZDA
Elektroporacijska kiveta 4mm	Bio-Rad, ZDA
Elektroporator Gene Pulser Xcell	Bio-Rad, ZDA
Hemocitometer Bürker Türk	Optik Labor, Nemčija
Ločevalna kolona MACS LS	Milteny Biotec, Nemčija
Ločevalnik-magnetno držalo MidiMACS	Milteny Biotec, Nemčija
Magnetno stojalo MACS Multistand	Milteny Biotec, Nemčija
Mikrotitrne plošče z 12, 24, 96 vdolbinicami	TPP, Švica
Mikrotitrne plošče z 96 vdolbinicami za test ELISA	NUNC Maxisorp, Danska
Modri LED transiluminator	IO Rodeo, ZDA
Naprava za elektroforezo	Bio-Rad, ZDA
Naprava za PCR PTC 200	Bio-Rad, ZDA
Plastičen vsebnik T75	Corning, ZDA
Pretočni citometer BD FACSCanto II	BD Biosciences, ZDA
Propilenske centrifugirke 1,8-50 mL	Corning, ZDA
Sterilni filter 0,20 µm Minisart	Sartorius, Nemčija
Stresalnik Vibromix	Eppendorf, Nemčija

3.1.5 Biološki materiali

Preglednica V: Seznam bioloških materialov in njihovih proizvajalcev.

Biološki materiali	Proizvajalec
Bakterije za kloniranje E.coli TOP10	Thermo-Scientific, ZDA
Človeški AB serum	Sanquin Bloodbank, Nizozemska
FBS (Fetalni goveji serum)	HyClone, ZDA
Plazmidni vektor pcDNA 3.1	Thermo-Scientific, ZDA
Popkovnična kri	WKZ Utrecht, Nizozemska
Rekombinantni TCR CD8 ⁺ in CD4 ⁺ limfociti T, specifični za WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ peptid	UMC Utrecht, Nizozemska
Restriksijski encim EcoRI	New England BioLabs, ZDA
Restriksijski encim KpnI	New England BioLabs, ZDA
Restriksijski encim SacI	New England BioLabs, ZDA
Restriksijski encim SpeI	New England BioLabs, ZDA

Preglednica VI: Seznam uporabljenih specifičnih protiteles za pretočno citometrijo in njihovih proizvajalcev.

Protitelesa	Proizvajalec
CD137 (PE)	eBioscience, ZDA
CD3 (FitC)	eBioscience, ZDA
CD34 (FitC)	eBioscience, ZDA
CD45 (PC5)	eBioscience, ZDA
CD8 (PC7)	eBioscience, ZDA
HLA-A2 (PE)	eBioscience, ZDA
Kozja-proti-mišja protitelesa (PE)	Dako, ZDA
Mišja-proti-človeška WT1 protitelesa	Dako, ZDA

Preglednica VII: Seznam uporabljenih človeških rekombinantnih citokinov in njihovih proizvajalcev.

Citokini	Proizvajalec
Flt3L (ligand Fms-podobne tirozinske kinaze 3)	Milteny Biotec, Nemčija
GM-CSF (Granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik)	Milteny Biotec, Nemčija
IL-1 β	Milteny Biotec, Nemčija
IL-3	Milteny Biotec, Nemčija
IL-4	Immunotools, Nemčija
IL-6	Milteny Biotec, Nemčija
Immunotools, Nemčija	Immunotools, Nemčija
SCF (Kolonije spodbujajoči dejavnik)	Milteny Biotec, Nemčija
TNF- α (Tumorje nekrotizirajoči dejavnik alfa)	Immunotools, Nemčija

3.1.6 Celične linije

Preglednica VIII: Seznam uporabljenih tumorskih celičnih linij in njihov izvor.

Celične linije	Proizvajalec
Celična linija AML BV173	UMC Utrecht, Nizozemska
Celična linija AML ML1	UMC Utrecht, Nizozemska
Celična linija AML NB4	UMC Utrecht, Nizozemska
Celična linija AML THP1	UMC Utrecht, Nizozemska

Celična linija multiplega mieloma MM1.S	UMC Utrecht, Nizozemska
Celična linija multiplega mieloma U266	UMC Utrecht, Nizozemska

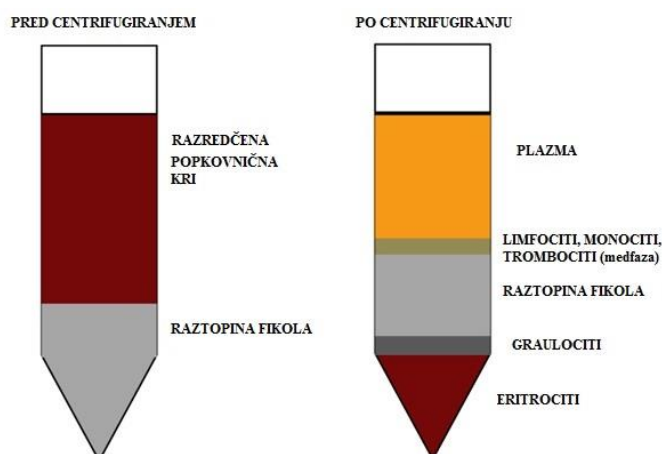
3.2 METODE

3.2.1 Izolacija in gojenje CD34⁺ KMC iz PK

3.2.1.1 Izolacija mononuklearnih celic iz PK

Svežo PK, odvzeto s heparinom, smo pazljivo prelili v plastičen vsebnik T75 in jo razredčili v razmerju 1:1 s fosfatnim pufrom PBS. Predhodno smo odvzeli 50 µL vzorca nerazredčene PK za določanje fenotipa HLA darovalca. Pripravili smo ustrezno število 50 mL centrifugirk LeukoSep, jih napolnili s po 15 mL raztopine fikola in centrifugirali 10 s pri 2.300 obratih/min, da se je raztopina pomaknila pod gelski filtrski obroč. Nato smo v ustrezno število centrifugirk prenesli razredčeno PK in jih pri sobni temperaturi centrifugirali 20 min pri 2.300 obratih/min, brez zaviranja. Pri tem so se krvne celice ločile po plasteh na osnovi gostotnih gradientov.

Pod raztopino fikola se zberejo eritrociti in granulociti, nad njimi pa limfociti, trombociti in monociti. Najprej smo pazljivo odsesali vrhnji sloj plazme, nato pa prenesli sloj mononuklearnih celic v nove 50 mL centrifugirke ter jih dopolnili s PBS do skupnega volumna 50 mL. Celično suspenzijo smo centrifugirali 10 min pri 2.300 obratih/min in odlili supernatant, s čimer smo odstranili večino trombocitov ter preostanek fikola in plazme. Spiranje smo ponovili še dvakrat, po zadnjem spiranju pa celično usedlino resuspendirali v 50 mL ohlajenega pufra MACS (*ang. Magnetic-activated Cell Sorting*) za magnetno ločevanje celic.



Slika 6: Prikaz plasti porazdeljenih krvnih celic pred in po centrifugiranju z raztopino fikola; prirejeno po (40).

Odvzeli smo 10 μL celične suspenzije in jo pomešali z 90 μL Türkovega reagenta ter s pomočjo hematocitometra in svetlobnega mikroskopa določili število živih in mrtvih (obarvanih) celic v vzorcu. Za nadaljnje imunomagnetno ločevanje celic smo pripravili ustrezno koncentracijo celične suspenzije in sledili navodilom izolacijskega kompleta proizvajalca (Milteny Biotec, Nemčija).

3.2.1.2 Izolacija CD34⁺ KMC z imunomagnetnim ločevanjem

Za izolacijo CD34⁺ KMC smo uporabili imunomagnetni izolacijski komplet (Milteny Biotec). Metoda celičnega ločevanja temelji na uporabi s protitelesi CD34 označenih magnetnih mikrokroglic s tehnologijo MACS. Vzorcju smo dodali suspenzijo magnetnih mikrokroglic s pritrjenimi protitelesi proti molekulam CD34, izvedli predpisano inkubacijo in nato zmes nanesti na ločevalno kolono MACS LS, ki smo jo vpeli na stojalo z magnetnim poljem. Neoznačene celice smo po večkratnem spiranju spustili skozi kolono, na mikrokroglice pritrjene KMC pa po odstranitvi kolone iz magnetnega polja s potiskom bata na koloni zbrali v ločeni centrifugirki. Nato smo s pretočnim citometrom z ustrezno fluorescenčno označenimi protitelesi CD34 (FitC) in CD45 (PC5) preverili isovetnost in čistost izoliranih celic. Vzorce celičnih suspenzij, iz katerih smo izolirali CD34 KMC, smo zmrznili in shranili na -80 °C (41).

3.2.1.3 Ekspanzija in diferenciacija CD34⁺ celic

Izolirane CD34⁺ KMC smo resuspendirali v mediju X-VIVO 15, ki smo mu dodali 1% (v/v) raztopino antibiotikov PenStrep. Celice smo prešteli v števni komori po dodatku 0,4% raztopine tripanskega modrila in nato pripravili suspenzijo s koncentracijo 5 x 10⁴ celic/mL, ki smo jo razdelili v alikvote po 5 mL. Celičnim suspenzijam smo v ustreznih časovnih intervalih, določenih za ekspanzijski in diferenciacijski protokol, dodajali ustrezne kombinacije citokinov (Preglednica IX).

Preglednica IX: Kombinacije in koncentracije citokinov, ki smo jih v določenih časovnih intervalih dodajali za ekspanzijo CD34⁺ KMC in njihovo nadaljnjo diferenciacijo.

1) 7-dnevna ekspanzija celic CD34⁺ po njihovi izolaciji iz PK:

Citokini	Koncentracija (ng/mL)
IL-3	20
IL-6	20
SCF	50
Flt3l	50

2) 7-dnevna diferenciacija celic CD34⁺ v nezrele DC, po njihovi predhodni ekspanziji:

Citokini	Koncentracija (ng/mL)
IL-4	20
GM-CSF	20
SCF	50
Flt3l	50
človeški AB serum	5%

3) 24 do 48-urno zorenje DC:

Citokini	Koncentracija (ng/mL)
IL-1β	10
TNFα	10
IL-6	10
PGE-2	1 μg/mL

3.2.3 Določanje prisotnosti molekul HLA-A2 na in izražanja proteina WT1 v izbranih tumorskih celičnih linijah, s pretočno citometrijo

Pretočna citometrija je metoda, s katero določamo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi kapilarno, kjer jih osvetljuje ozek snop laserske svetlobe. Ko zadane ob celico, se v odvisnosti od njene velikosti in zrnatosti odbije in lomi, v kolikor so celice označene s fluorokromi, pa se absorbira. Celice, označene s fluorescenčnimi protitelesi nato oddajo svetlobo daljše valovne dolžine, ki jo zaznajo ustrezni detektorji. Odbito, lomljeno in oddano svetlobo različnih valovnih dolžin nato aparat izriše v obliki točk, pri velikih in malih kotih.

3.2.3.1 Označevanje in določanje membransko izraženih molekul

S fluorescenčno označenimi protitelesi smo ugotavljali prisotnost molekul HLA-A2 na površinah izbranih levkemičnih celičnih linij in na celicah multiplega mieloma.

Protokol:

- 1) Po $0,5 \times 10^6$ celic vsake od analiziranih celičnih linij smo centrifugirali 2 min pri 2.000 obratih/min in jih spirali s pufrom FACS za pretočno citometrijo.
- 2) Glede na predpisana razmerja smo pripravili naslednje mešanice fluorescenčno označenih protiteles:

➔ Sestava za 5 vzorcev:

<u>Protitelesa anti-HLA-A2 (PE)</u>	1,25 μ L
<u>Protitelesa anti-CD3 (FitC)</u>	10,00 μ L
<u>Protitelesa anti-7AAD (PerCP)</u>	25,00 μ L
<u>Pufer FACS</u>	213,75 μ L
ΣV	250,00 μ L

- 3) Vsakemu celičnemu vzorcu smo dodali po 50 μ L mešanice protiteles in jih inkubirali 30 min pri 4 °C v hladilniku, na temnem.
- 4) Nato smo vzorce 2-krat centrifugirali po 3 min pri 2.300 obratih/min ter jih tako spirali s pufrom FACS.
- 5) Celice smo resuspendirali v 300 μ L pufru FACS in jakost fluorescence izmerili s pretočnim citometrom.

3.2.3.2 Označevanje in določanje znotrajceličnih molekul

Za označevanje znotrajceličnih proteinov smo uporabili Foxp3 fiksirni/permeabilizacijski komplet (PERM) in sledili navodilom proizvajalca (eBioscience, ZDA) (42). Merili smo izražanje endogenega onkoproteina WT1 v celicah levkemičnih linij in v celicah multiplega mieloma.

Protokol:

- 1) Po 1×10^6 celic vsake od analiziranih celičnih linij smo najprej fiksirali s fiksacijsko raztopino iz kompleta PERM.
- 2) Najprej smo dodali reagent PERM v predpisani koncentraciji in vzorce inkubirali 30 min pri 4°C v hladilniku, na temnem.
- 3) Dodali smo pufer PERM v predpisani količini in vzorce centrifugirali 3 min pri 2.300 obratih/min.
- 4) Glede na predpisana razmerja, navedena v proizvajalčevem protokolu, smo pripravili raztopino blokatorja receptorjev Fc in primarnega protitelesa za detekcijo proteina WT1:

→ Sestava za 1 vzorec:

<u>Mišje-proti-človeško primarno protitelo anti-WT1</u>	<u>1,0 μL</u>
<u>Blokator Fc:</u>	<u>8,0 μL</u>
<u>Pufer PERM 1x:</u>	<u>91,0 μL</u>
ΣV	100,0 μL

- 5) To raztopino smo dodali vzorcu celic in ga inkubirali 30 min pri 4°C v hladilniku, na temnem.
- 6) Nato smo vzorec 2-krat centrifugirali po 3 min pri 2.300 obratih/min v pufru PERM 1x (spiranje).
- 7) Dodali smo sekundarno kozje-proti-mišje protitelo ter vzorec ponovno inkubirali 30 min pri 4°C na temnem.

→ Sestava reagenta za 10 vzorcev:

<u>Sekundarno kozje-proti-mišje protitelo (PE)</u>	<u>2,0 μL</u>
<u>Pufer PERM 1x</u>	<u>998,0 μL</u>
ΣV	1.000,0 μL

- 6) Po inkubaciji smo vzorec 2-krat sprali s pufrom FACS s pomočjo centrifugiranja po 3 min pri 2.300 obratih/min.
- 7) Nato smo celice resuspendirali v 300 μ L pufru FACS in izmerili jakost oddane svetlobe s pretočnim citometrom.

Vse meritve smo opravili s pretočnim citometrom BD FACSCanto II (BD Biosciences), podatke pa analizirali s pomočjo programov BD FACS Diva in FlowJo (Tree Star Inc).

3.2.4 Optimizacija testa celične citotoksičnosti z uporabo s CellTrace Violet (CTV) označenih tarčnih celic

Citotoksični testi sodijo med najpomembnejša analizna orodja za vrednotenje aktivnosti celičnih imunoterapevtskih pripravkov, saj nam omogočajo ocenjevanje jakosti specifičnega protitumorskega delovanja CLT. Metoda temelji na 4-urni inkubaciji različnih razmerij tarčnih celic s protitumorskimi efektorskimi CD8⁺ celicami T. Zlati standard za določanje citotoksične aktivnosti CLT predstavlja merjenje količine sproščenega radioaktivnega kroma ⁵¹Cr iz uničenih tarčnih celic, ki je sorazmerna številu ubitih celic. Kljub temu pa ima ta metoda veliko slabih strani, med katere sodita spontano sproščanje ⁵¹Cr iz tarčnih celic in potreba po ponovni stimulaciji CLT pred inkubacijo s tarčnimi celicami. Metoda je tudi časovno omejena in ne omogoča neposrednega merjenja citotoksičnosti *in vivo*. Obenem ima lahko dolgoročno izpostavitve radioaktivnemu ⁵¹Cr škodljive posledice za izvajalce testov, zato jo lahko izvajajo le ustrezno usposobljene osebe. Posledično stremimo k uporabi drugih, alternativnih neradioaktivnih metod za zanesljivo ugotavljanje obsega s CLT povzročene citotoksičnosti.

V okviru našega dela smo optimizirali sodoben 4-urni citotoksični test, v katerem smo namesto radioaktivnega ⁵¹Cr uporabili izbrane metode za fluorescenčno označevanje tarčnih celic in pretočno citometrijo, s čimer smo uspešno neposredno določali deleže s specifičnimi CLT uničenih tarčnih celic.

Uporabili smo protokol za označevanje tarčnih levkemičnih celic z barvilom CellTrace Violet (CTV) in s 7AAD (7-Aminoaktinomycin D), ki je specifični označevalec mrtvih liziranih celic. Spojina CTV je sukcinimidilni ester karboksi-fluorescein diacetata ali barvilo CSFE, ki se kovalentno veže na proste aminske skupine izražene na površinah in znotraj živih celic. Barvilo oddaja močno in dolgotrajno intenzivno fluorescenco z nizko

variabilnostjo in ni citotoksično. V osnovi se CTV barvilo uporablja za označevanje in sledenje delitev celic preko več generacij *in vitro* in *in vivo*, pri čem vsaka hčerinska celica oddaja le polovično intenziteto svetlobe predhodne generacije. Označevanje celic s CTV lahko uporabljamo pri pretočni citometriji tudi v kombinaciji z več različnimi fluorescenčnimi označevalci, seveda pod pogojem, da ti oddajajo svetlobo pri drugih valovnih dolžinah. S tako kombinacijo celičnih fluorescenčnih barvil smo lahko natančno določili deleže živih in mrtvih tarčnih celic s pretočnim citometrom (38, 43, 44).

Vzorci različnih tarčnih celic z in brez dodanih peptidov WT1 smo med seboj primerjali predvsem zaradi različnih obsegov izražanja proteina WT1 v celičnih linijah AML. Del celičnih vzorcev smo predhodno inkubirali 2 uri s peptivatorjem WT1, ki je vseboval zbirko liofiliziranih peptidov, dolgih po 15 aminokislinskih ostankov, ki so skupaj predstavljali celotno dolžino onkoproteina WT1. Peptivatorji torej vsebujejo nabor krajših, do 15 aminokislinskih dolgih sinteznih peptidov določenega proteina, ki jih največkrat uporabljamo za stimulacijo oz. »pulziranje«⁺ CD4⁺ in CD8⁺ ustreznih klonov efektorskih limfocitov T *in vitro*, pri čemer pa moramo seveda predhodno dobro poznati antigenske epitope, ki jih prepoznavajo njihovi TCR. Ob pulziranju celic s peptidi pride do posledičnega sproščanja specifičnih citokinov, ki povečajo izražanje celičnih aktivacijskih označevalcev. S peptidi lahko pulziramo tako specifične efektorske kot tumorske celice, ki antigenske peptide vežejo neposredno na molekule HLA, izražene na svojih površinah, brez njihove predhodne internalizacije in procesiranja.

Protokol testa celične citotoksičnosti

Za določanje optimalne koncentracije barvila CTV v PBS smo morali najprej izvesti titracijo. Pripravili smo naslednje koncentracije barvila CTV:

- A) 1 μ L CTV (5 mM) + 12,5 mL PBS (1:12.500)
- B) 1 μ L CTV (5 mM) + 5 mL PBS (1:5.000)
- C) 1 μ L CTV (5 mM) + 2,5 mL PBS (1:2.500)

Nato smo suspenzijam celic v 1 mL PBS omenjene raztopine dodali v razmerju 1:1 (v/v), jih sprali in merili količino oddane svetlobe s pretočnim citometrom. Na osnovi rezultatov smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo uporabljali mešanico A, z 1 μ L CTV (5 mM) v 12,5 mL PBS.

Najprej smo z uporabo 0,4% raztopine tripanskega modrila in števne komore določili število živih celic, nato pa pripravili suspenzije s po $2,4 \times 10^6$ celic vsake od izbranih celičnih linij AML v po 1 mL kompletnega medija RPMI. Vzorcem smo dodali po 1 μ L peptivatorja WT1 (zbirka peptidov z dolžinami po 15 ak) in jih inkubirali 2 uri v inkubatorju pri 37 °C. Kot kontrole smo uporabili po $2,4 \times 10^6$ posameznih vrst levkemičnih celic, vendar brez predhodne inkubacije s peptivatorjem. Nato smo vzorce 2-krat sprali s po 3 mL PBS (centrifugiranje 5 min pri 1.500 obratih/min) ter celične usedline resuspendirali v PBS do koncentracije $2,4 \times 10^6$ celic/mL.

Celicam v 15 mL centrifugirkah smo v razmerju 1:1 (v/v) dodali po 1 mL ustrezne raztopine CTV ter jih inkubirali 20 minut pri 37 °C. Nato smo centrifugirke dopolnili do 15 mL s PBS in jih centrifugirali 5 min pri 1.500 obratih/min. Celične usedline smo resuspendirali v kompletnem mediju RPMI do koncentracije 1×10^5 celic/mL.

V vodni kopeli smo odtalili krioampulo s $CD4^+$ in $CD8^+$ celicami T, ki izražajo rekombinantne TCR, specifične za peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄, vezan na molekulo HLA-A2. Priprava limfocitov T z rekombinantnimi TCR temelji na uporabi virusnih vektorjev, ki omogoča stabilno vključitev želenega gena v genom gostiteljskih celic. Za pripravo $CD4^+$ in $CD8^+$ limfocitov T, ki smo jih uporabljali v naših poskusih, so uporabili lentivirusni vektor z zapisom za rekombinantni TCR, ki specifično prepozna peptidni epitop WT1₁₂₆₋₁₃₄, vezan na molekulo HLA-A2. Odmrznjene celice T smo večkrat sprali s kompletnim medijem RPMI (centrifugiranje 5 min pri 1.500 obratih/min) in jih prešteli po dodatku raztopine tripanskega modrila. Nato smo jih serijsko redčili tako, da smo pripravili koncentracije v razponu od 4×10^6 /mL do $1,25 \times 10^5$ /mL, v kompletnem mediju RPMI. V mikrotitrski plošči z 96 vdolbinicami smo inkubirali različna razmerja tarčnih celic (različne celične linije AML, predhodno inkubirane s peptivatorjem WT1 ali brez) in efektorskih limfocitov T s specifičnimi rekombinantnimi TCR, in sicer v skupnem volumnu 200 μ L na vdolbinico (Preglednica X). Nato smo mikrotitrsko ploščo centrifugirali 5 min pri 1.200 obratih/min in jo inkubirali 4 ure pri 37 °C. Po inkubiranju smo vzorce prenesli v 1 mL centrifugirke, jim dodali po 200 μ L pufru FACS in 4 μ L barvila 7AAD ter jih analizirali s pretočnim citometrom. S pomočjo analiznega programa BD FACS Diva smo v vsakem posameznem vzorcu zlahka določili populacijo CTV označenih, znotraj teh pa 7AAD pozitivno podpopulacijo mrtvih tarčnih celic.

Preglednica X: Shema mikrotitrne plošče za izvedbo citotoksičnega testa z uporabo 4 različnih človeških celičnih linij AML ter limfocitov T, ki izražajo specifične rekombinantne TCR.

CELIČNE LINIJE	1	2	3	4	5	6	7
THP1							
+ peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
- peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
ML1							
+ peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
- peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
BV173							
+ peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
- peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
NB4							
+ peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
- peptid	10 ⁴ AMLC 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ AMLC
	1 : 40	1 : 20	1 : 10	1 : 5	1 : 2,5	1 : 1,25	1 : 0

Legenda:

AMLC - levkemične celice AML

LT - CD4⁺ in CD8⁺ limfociti T

3.2.5 Vrednotenje različnih načinov dostave antigenov v tumorske celice s citotoksičnim in aktivacijskim testom limfocitov T

S testi T-celične citotoksičnosti in T-celične aktivacije smo vrednotili različne načine opremljanja TC s tumorskimi antigenskimi peptidi (TAA). Na podlagi dokazanega izražanja molekul HLA-A2 in prisotnosti/odsotnosti endogenega onkoproteina WT1 s pretočno citometrijo, smo izbirali ustrezno celično linijo multiplega mieloma. Za naše potrebe smo izbrali celice multiplega mieloma U266, ki ne izražajo proteina WT1, so pa HLA-A2 pozitivne in jih transfecirali bodisi z mRNA s celotnim zapisom za onkoprotein WT1 ali pa jih inkubirali s prekrivajočimi se peptidi, dolgimi po 15 aminokislin, ki jih je vseboval peptivator WT1.

3.2.5.1 Elektroporacija celic U266 z mRNA GFP

Za testiranje dveh protokolov elektroporacije smo pripravili suspenzijo 3×10^6 celic U266 v kompletnem mediju RPMI, jih centrifugirali 10 min pri 1.200 obratih/min in nato resuspendirali v 50 mL medija Optimem I, brez dodanega seruma. Celice smo ponovno centrifugirali, in sicer 5 min pri 1.500 obratih/min ter jih resuspendirali v 200 μ L medija Optimem I brez dodanega seruma. Celotno količino vzorca smo prenesli v 4 mm elektroporacijske kivete, jim dodali po 5 μ g mRNA GFP in jih v elektroporacijski komori pulzirali skladno z izbranim protokolom:

- 1) Protokol z eksponentnim razpadom: kapacitivnost 960 μ F in napetost 300 V
- 2) Protokol s konstantnim časom: napetost 300 V in 7 ms

Da bi si celice po elektroporaciji opomogle, smo vzorce prenesli v 8 mL kompletnega medija RPMI z dodanimi 5% toplotno inaktiviranega človeškega AB seruma. Nato smo jih centrifugirali 5 min pri 1.500 obratih/min in resuspendirali v po 4 mL kompletnega medija RPMI. Celice smo prenesli na mikrotitrsko ploščo s 6 vdolbinicami, in jih inkubirali uro v inkubatorju pri 37 °C. Nato smo jih resuspendirali v 200 μ L pufru FACS in obarvali z barvilom 7AAD ter izmerili fluorescenco s pretočnim citometrom. Podobno smo postopali tudi v primeru njihove elektroporacije z 20 μ g mRNA za WT1, pri čemer smo uporabili protokol s konstantnim časom.

3.2.5.2 Testa T-celične citotoksičnosti in aktivacije z uporabo limfocitov T, ki izražajo specifične rekombinantne TCR

Po uspešni optimizaciji testa T-celične citotoksičnosti z uporabo s CTV označenih tarčnih celic in po testiranju protokolov elektroporacije, smo ta test ter test aktivacije limfocitov T uporabili za testiranje:

- 1) tarčnih celic U266, pulziranih z 1 μ L peptivatorja WT1;
- 2) tarčnih celic U266, elektroporiranih z 20 μ g mRNA z zapisom celotnega onkoproteina WT1, po protokolu s konstantnim časom 7 ms, pri 300 V;
- 3) intaktnih tarčnih celic U266, ki so nam služile za negativno kontrolo.

Pri tem smo postopali tako kot smo to opisali v protokolu za izvedbo testa T-celične citotoksičnosti. Tarčne celice U266 smo inkubirali 4 ure pri 37 °C, in sicer v različnih

razmerjih s CD4⁺ in CD8⁺ limfociti T, ki izražajo rekombinantne TCR, specifične za peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄, vezan na molekule HLA-A2 (Preglednica XI).

Preglednica XI: Shema mikrotitrne plošče za izvedbo testov T-celične citotoksičnosti in T-celične aktivacije z uporabo kombinacij različno obdelanih tarčnih celic U266 in limfocitov T, ki izražajo za peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄ specifične rekombinantne TCR.

	1	2	3	4	5	6	7
U266 + peptid	10 ⁴ U266 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266
U266 + mRNA	10 ⁴ U266 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266
Intaktne U266	10 ⁴ U266 40x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 20x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 10x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 5x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 2,5x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266 1,25x10 ⁴ LT	10 ⁴ U266
	1 : 40	1 : 20	1 : 10	1 : 5	1 : 2,5	1 : 1,25	1 : 0

Legenda:

LT - CD4⁺ in CD8⁺ limfociti T

Izvedba T-celičnega aktivacijskega testa

V vdolbinice mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami smo prenesli različno obdelane in intaktne celice U266 ter jih inkubirali s CD4⁺ in CD8⁺ celicami T, opremljenimi s specifičnimi rekombinantnimi TCR, tako, kot je predstavljeno v Preglednici XI.

Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 24 ur, da smo omogočili zadostno translacijo, procesiranje in vezanje peptidov WT1 na molekule HLA razredov I in II ter stabilno izražanje aktivacijskih molekul. Nato smo izmerili obseg izražanja površinskih receptorjev CD137, ki so prisotni le na aktiviranih CD4⁺ in CD8⁺ limfocitih T. Supernatante mikrokultur pa smo shranili v hladilniku na -20 °C za nadaljnje testiranje.

Za detekcijo površinskih molekul s pretočno citometrijo smo pripravili reakcijske mešanice naslednjih fluorescenčno označenih protiteles:

→ Sestava raztopine reagenta za 25 vzorcev:

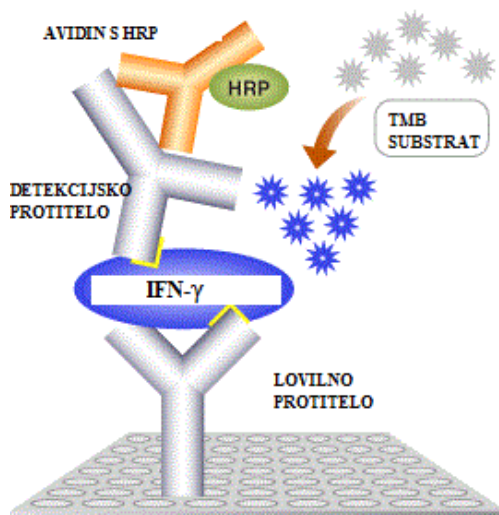
<u>Protitelesa anti-CD3 (FitC)</u>	50,00 μL
<u>Protitelesa anti-CD8 (PC7)</u>	6,25 μL
<u>Protitelesa anti-CD137 (PE)</u>	12,50 μL
<u>Protitelesa anti-7AAD (PerCP)</u>	85,00 μL
<u>Pufer FACS</u>	1.096,25 μL
ΣV	1.250,00 μL

K vsakemu vzorcu celic v posameznih mikrokulturah smo dodali po 50 mL te raztopine in jih inkubirali 30 min pri 4 °C v hladilniku, na temnem, nato pa jih 2-krat centrifugirali po 3 min pri 2.300 obratih/min ter jih tako sprali s pufrom FACS. Celice smo na koncu resuspendirali v 300 μL pufru FACS ter izmerili jakost fluorescence s pretočnim citometrom.

3.2.6 Test ELISA za določanje količine IFN- γ

Encimsko imunski test ali test ELISA (*ang. Enzyme-linked immunosorbent assay*) je metoda, ki se v imunologiji uporablja za detekcijo protiteles ali antigenov v preiskovanih vzorcih. Temelji na specifični interakciji antigen-protitelo. Odvisno od raziskovanega analita uporabljamo posredno, neposredno ali sendvič metodo ELISA. Za merjenje koncentracij nastalega IFN- γ v supernatantih celičnih mikrokultur, ki smo jih shranili ob izvedbi T-celičnega aktivacijskega testa smo uporabili sendvič test ELISA in pri tem postopali skladno z navodili proizvajalca (eBioscience, ZDA) (Slika 7).

Najprej smo v vdolbinice mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami vezali lovilno protitelo, ploščo prekrili s folijo ter jo inkubirali v hladilniku pri 4 °C preko noči. Naslednji dan smo jo 3-krat sprali s pufrom za spiranje (del kompleta ELISA). Pripravili smo serijske redčitve (1:1) osnovnega standarda in vzorcev ter jih inkubirali 2 uri pri 4 °C. Vdolbinice mikrotitrne plošče smo nato 3-krat sprali s pufrom za spiranje in dodali raztopino detekcijskih protiteles ter ploščo inkubirali še 1 uro pri 4 °C. Nato smo jo ponovno 3-krat sprali s pufrom za spiranje in v vdolbinice dodali avidin, označen s hrenovo peroksidazo (HPR), inkubirali 30 min ter nato dodali še substrat, in sicer raztopino TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin). Po 15 min inkubacije na temnem smo dodali raztopino za prekinitev reakcije ter intenzivnosti nastale barve izmerili pri 450 nm, s čitalcem mikrotitrskih ploščic iMark (Bio-Rad, ZDA) (45).



Slika 7: Shematski prikaz detekcije IFN- γ s testom sendvič ELISA; prirejeno po viru (46).

3.2.7 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in optimizacija protokola PCR

3.2.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Da lahko pomnožimo točno določen del DNA, moramo izbrati pravilne začetne oligonukleotide (ZO), ki so komplementarni začetnim in končnim delom izbranih nukleotidnih segmentov DNA. Če želimo pomnožene odseke DNA z molekulskim kloniranjem vstaviti v plazmidni vektor, pa moramo nujno upoštevati določene smernice pri načrtovanju ZO.

Splošne smernice za načrtovanje ZO (47):

- Povprečna dolžina ZO naj bo med 18 in 30 nukleotidi.
- Optimalne temperature tališča (T_m) ZO so med 65 °C in 75 °C, pri čemer razlike med njimi ne smejo biti < 5 °C.
- Če so njihove T_m prenizke, moramo ZO dodati več baznih parov (bp) GC ali pa jim podaljšati dolžino.
- Vsebnost bp GC mora biti med 40 in 60%, 3' konec ZO pa naj se konča z nukleotidom C ali G, zaradi lažjega vezanja na matrico.
- Na 5' koncu ZO naj bo dodan vmesnik iz 3 ali 4 nukleotidov za učinkovitejšo cepitev z restrikcijskimi encimi.

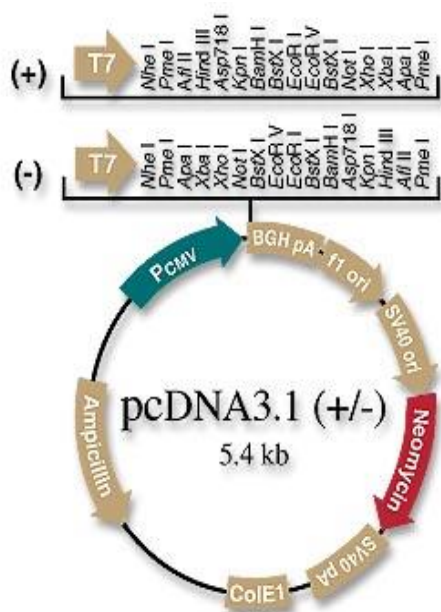
- Izogibati se moramo sekundarnim strukturam in težiti k uravnoteženemu razmerju med bp GC in AT v sekvenci ZO.
- Izogibamo se sekvenčni homologiji znotraj zapisa ZO.

Načrtovanje ZO za *in vitro* transkripcijo/translacijo linearnega zapisa DNA (47):

- Smerni ZO mora vsebovati promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), pri čemer je tretji nukleotid G od 3' konca prva prepisana baza polimeraze RNA T7.
- Promotorju sledi vmesnik, dolg 5-10 nukleotidov, ki izboljša donos izraženih proteinov.
- Smerni ZO mora vsebovati začetni kodon ATG. Ta je lahko tudi sestavni del Kozakovega konsenzusnega zaporedja (*ang. Kozak consensus sequence*), ki je skupek variacij največkrat izraženih začetnih kodonov pri prevajanju evkariontskih molekul mRNA.
- Začetnem kodonu sledi sekvenca 18 ali več nukleotidov DNA, ki jo želimo specifično pomnožiti.
- Protismerni ZO mora vsebovati stop kodon, in sicer bodisi TAA, TGA ali TAG, s katerim dosežemo učinkovit zaključek prepisovanja in tvorbo proteinov pravilne velikosti.
- Tako kot v smerni ZO, moramo tudi pri protismernega za uspešno prileganje vključiti zaporedje 18 ali več nukleotidov izbranega segmenta DNA.

3.2.7.2 Plazmidni vektor

Za sprejemni vektor smo izbrali plazmidni vektor pcDNA 3.1 (Slika 8).



- Vsebuje zgodnji človeški citomegalovirusni (CMV) promotor, ki omogoča visoko izražanje proteinov v sesalskih celicah.
- Vsebuje promotor T7 za *in vitro* transkripcijo v RNA.
- Vsebuje več edinstvenih mest za restrikcijo (polilinker).
- Vsebuje neomicinski antibiotični selekcijski označevalec.
- Vsebuje ampicilinski antibiotični selekcijski označevalec.
- Vsebuje f1 ori za začetek replikacije DNA.

Slika 8: Struktura plazmidnega vektorja pcDNA 3.1; povzeto po viru (48).

3.2.7.3 Načrtovani konstrukti

Eden od najbolj imunogenih in dobro raziskanih peptidov onkoproteina WT1, ki se vežejo na molekule HLA razreda I je WT1₁₂₆₋₁₃₄, z aminokislinskim (ak) zaporedjem RMFPNAPYL. Je sestavni del 19 ak dolgega peptida, ki se veže na molekule HLA razreda II, z zaporedjem SGQARMFPNAPYLPSICLES in predstavlja osnovni antigenski model za našo raziskavo. Temu osnovnemu zaporedju smo najprej dodali 40 ak (20 na karboksilni in 20 na aminski konec), nato pa z dodajanjem nadaljevali vse do dolžine 449 ak, kar predstavlja celotno dolžino proteina WT1.

Osnovna peptida:

Peptid za vezavo na molekule HLA razreda I : RMFPNAPYL (9 ak)

Peptid za vezavo na molekule HLA razreda II: SGQARMFPNAPYLPSICLES (19 ak)

Konstrukti:

Zaradi upoštevanja smernic za načrtovanje ZO smo morali prilagoditi število dodanih ak, kot sledi:

1. Osnovni konstrukt: (ASSGQARMFPNAPYLPSLESQ) 22 ak (94 bp)
2. Konstrukt 112 ak (365 bp)
3. Konstrukt 207 ak (650 bp)
4. Konstrukt 449 ak (1.376 bp) – celotna dolžina *WT1* proteina

Osnovna metoda za vstavev tuje DNA (inserta) v vektorje temelji na restrikcijskih mestih. Zato smo v ZO dodali palindromsko (prepoznavno) zaporedje kot cepitveno mesto z encimoma KpnI in EcoRI. Vektor pcDNA 3.1 pa sicer že vsebuje promotor T7, zato ga ni bilo potrebno vključiti v nukleotidno zaporedje ZO. Uporabili smo tudi dvojni stop kodon TGA za čim bolj natančno prepisovanje in čim čistejše proteinske produkte.

Preglednica XII: Sekvence načrtovanih smernih in protismernih ZO ter vrednosti Tm.

	IMENA ZO	SEKVENCA	Tm
1	Smerni ZO 22 ak	GAGGTACCTGCCACCA ATGG CGTCATCCGGCCAG	66 °C
2	Protismerni ZO 22 ak	CGGAATTCCG TCATCA GCTCTCGAGGCAGCTGG	66 °C
3	Smerni ZO 112 ak	GAGGTACCTGCCACCA ATGG GAGCCGAGCTGGGGC	67 °C
4	Protismerni ZO 112 ak	CGGAATTCCG TCATCA CTGCTGGCCCATGGGA	67 °C
5	Smerni ZO 207 ak	GAGGTACCTGCCACCA ATGGG TGGCGGCGGC	67 °C
6	Protismerni ZO 207 ak	CGGAATTCCG TCATCA GTCACTGCTGTAGGGCGTCC	67 °C
7	Smerni ZO 449 ak	GAGGTACCTGCCACCA ATGGG CTCCGACGTGCG	65 °C
8	Protismerni ZO 449 ak	CGGAATTCCG TCATCA AAGCGCCAGCTGGAGTTT	65 °C

Primer: Konstrukt 207 ak (650 bp)

-> *Smerni ZO WT1 207 ak*

DNA zaporedje

5' – GAGGTACCTGCCACCA**ATGG**GTGGCGGCGGC – 3'

KpnI Kozakovo zaporedje z začetnim kodonom

-> *Protismerni ZO WT1 207 ak*

DNA zaporedje

5' - CGGAATTC**CGTCATCA**GTCACTGCTGTAGGGCGTCC – 3'

EcoRI dvojni stop kodon

3.2.7.4 Pomnoževanje s PCR

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR (*ang. Polymerase Chain Reaction*) je metoda, s katero lahko enostavno in hitro pomnožimo z ZO zamejene fragmente DNA. Reakcija PCR izpopolnjuje kloniranje tako, da omogoča hitro in učinkovito čiščenje fragmentov DNA ter uvedbo modifikacij pri prepisovanju in prevajanju želenih proteinov.

Reakcijska mešanica PCR za 1 vzorec:

Sestavina	Volumen
Polimeraza DNA Phusion Hot Start II (2 U/ μ L)	0,5 μ L
Pufer Phusion HF, 5X	10,0 μ L
Deoksiribonukleotidna mešanica, dNTP (10 mM)	1,0 μ L
Voda za PCR	28,5 μ L
Matrična DNA WT1 (5 ng/ μ L)	5,0 μ L
Smerni ZO (10 mM)	2,5 μ L
Protismerni ZO (10 mM)	2,5 μ L
Σ	50,0 μ L

Program PCR:

Temperatura	Čas		Stopnja
1) 98,0 °C	0:30 s		Iniciacija
2) 98,0 °C	0:10 s	} 34 ciklov	Denaturacija
3) 63,0 °C	0:30 s		Pripenjanje
4) 72,0 °C	0:30 s		Podaljševanje
5) 72,0 °C	0:30 s		Zaključno podaljšanje
6) 4,0 °C	∞		Ohlajanje

3.2.7.5 Agarozna gelska elektroforeza

Po končani reakciji PCR nastale produkte analiziramo z elektroforezo na agaroznem gelu. To je analitska metoda, s katero ločujemo in čistimo fragmente DNA, glede na njihovo velikost. Ko ustvarimo električno polje v pufru TAE (tris-ocetna kislina-EDTA) se začnejo negativno nabiti fragmenti v gelu pomikati proti pozitivnemu potencialu. Ker je v viskoznem mediju njihovo gibanje oteženo, je njihova mobilnost različna in odvisna od velikosti, pri čem krajše molekule potujejo hitreje.

Produkte PCR smo analizirali v 1% agaroznem gelu, ki smo mu dodali barvilo midori green v razmerju 1:10. Vzorce smo pred nanosom redčili z oranžnim nanašalnim pufrom, v razmerju 1:6 in jih odpipetirali v vdolbinice na gelu. Elektroforezo smo izvajali 45 - 60 minut pri napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV svetlobo in ga fotografirali. Velikosti fragmentov smo primerjali z DNA lestvico 1Kb plus. Iz gela smo izrezali ločene pasove DNA, jih raztopili in očistili s pomočjo kompleta za gelsko ekstrakcijo produktov PCR, pri čem smo sledili navodilom proizvajalca (Macherey-Nagel, Nemčija) (49).

3.2.8 Molekularno kloniranje s PCR pridobljenih fragmentov DNA v E.coli

Molekularno kloniranje je sklop eksperimentalnih metod, ki ga uporabljamo za tvorbo rekombinantnih molekul DNA in za usmerjanje njihovega podvojevanja v gostiteljskem organizmu. S PCR namnožene fragmente DNA z zapisom za WT1 smo vcepili v plazmidni vektor pcDNA 3.1 in jih pomnožili v bakterijah E.coli. S pomočjo komercialnih kompletov smo izvedli transkripcijo pridobljenih plazmidnih produktov DNA v mRNA.

3.2.8.1 Priprava vektorja in fragmentov DNA za kloniranje

Plazmidni vektor smo obdelali z restrikcijskimi endonukleazami, ki so ga razcepile na mestu, kamor smo želeli vstaviti s PCR pridobljene fragmente DNA. Posamezen restrikcijski encim namreč povzroči cepitev na točno določenem mestu znotraj prepoznavnega zaporedja. Tako smo pri rezanju dveh različnih molekul DNA z isto restriktazo ustvarili fragmente, ki so bili med seboj navzkrižno kompatibilni. Izbrali smo restrikcijska encima, ki sta ustvarila štrleče enoverižne konce plazmida, komplementarne insertu DNA.

Pomnožene odseke DNA in vektor pcDNA 3.1 smo obdelali z naslednjo raztopino restrikcijskih encimov:

Sestavina	Volumen
Produkt PCR ali vektor pcDNA 3.1 (0.5 µg/µL)	15,0 µL
Pufer Cut Smart, 10X	2,0 µL
Encim KpnI (10 U/µL)	0,5 µL
Encim EcoRI (10 U/µL)	0,5 µL
Prečiščena voda	2,0 µL
ΣV	20,0 µL

Tako pripravljene vzorce smo najprej 1 uro segrevali pri 37 °C v vodni kopeli, nato pa jih ohladili na ledeni kopeli.

Linearizirane plazmide in rezane fragmente DNA smo najprej ločili z gelsko elektroforezo, ločene produkte pa nato izrezali iz gela in jih očistili z gelsko ekstrakcijo, tako, kot smo to opisali v podpoglavju 3.2.7.5.

3.2.8.2 Ligacija fragmentov DNA

Pripravili smo mešanico z restrikcijskimi encimi predhodno obdelanih fragmentov DNA in plazmida v predpisanih razmerjih in jim dodali DNA ligazo, ki je kovalentno povezala komplementarne razrezane konce. Reakcijska mešanica je tako vsebovala pravilno povezane vektorje z vstavljenimi fragmenti DNA, pa tudi vse druge kombinacije, npr. fragmente DNA povezane med sabo, vektorsko DNA povezano med sabo, ipd.

Mešanico reagentov za ligacijo smo izdelali tako kot sledi:

Sestavina	Volumen
Ligacijski encim T4, (5 U/µL)	0,5 µL
Pufer T4, 2X	10,0 µL
Restrikcijsko obdelan produkt PCR	9,0 µL
Restrikcijsko obdelan plazmid pcDNA 3.1	1,0 µL
ΣV	20,5 µL

Vzorce (začetne koncentracije: 0.5 µg/µL), v katerih po obdelavi z restrikcijskimi encimi nismo določali koncentracij, smo inkubirali 5 minut na sobni temperaturi

3.2.8.3 Transformacija plazmidne DNA v E.coli

Za transformacijo smo uporabili kompetentne bakterijske celice E.coli Top10.

Mikrocentrifugirke, ki so jih vsebovale smo predstavili iz zmrzovalnika (-80 °C) na led in vanje dodali po 1 µL ligacijske mešanice ter pri tem pazili, da nismo premešali vsebine. Nato smo jih pustili še dodatnih 20 min na ledu in potem izvedli transformacijo s toplotnim šokom. Mikrocentrifugirke smo za 45 s potopili v vodno kopel, segreto na 42 °C ter jih ponovno inkubirali 2 min na ledu. Vanje smo dodali po 300 µL gojišča SOC (*ang. Super optimal broth with catabolite repression*) ter jih 1 uro inkubirali pri temperaturi 37 °C, med stresanjem pri 250 vrt./min. Nato smo na predhodno segrete petrijevke z gojiščem LB-agar aseptično prenesli vsebino iz mikrocentrifugirk in jo razmazali po površini. Plošče s transformiranimi bakterijami smo inkubirali dva dni pri 37 °C.

Izbrali smo 5 - 10 kolonij bakterij in jih inokulirali v 3 mL tekočega gojišča LB z dodanim ampicilinom (100 µL/mL). Ob izpostavitvi antibiotiku so preživele le tiste bakterijske celice, ki so vsebovale pravilno sklenjen vektor z rezistenco na ampicilin. Te smo nato inkubirali še 2 dni pri sobni temperaturi.

3.2.8.4 Izolacija plazmidne DNA

Minipreparacija je postopek, s katerim liziramo stene bakterijskih celic v transformiranih kolonijah in iz njih izoliramo plazmidno DNA. Pred izolacijo smo bakterijske kulture 1 uro stresali pri 37 °C, nato pa postopek izvedli s pomočjo kompleta NucleoSpin Plasmid EasyPure, pri čemer smo sledili navodilom proizvajalca (Macherey-Nagel, Nemčija) (50).

Tokrat smo uporabili druga restrikcijska encima, in sicer SpeI in SacI. Plazmide smo linearizirali po postopku, ki smo ga opisali v podpoglavju 3.2.8.1.

Priprava mešanice restrikcijskih encimov za 12 vzorcev:

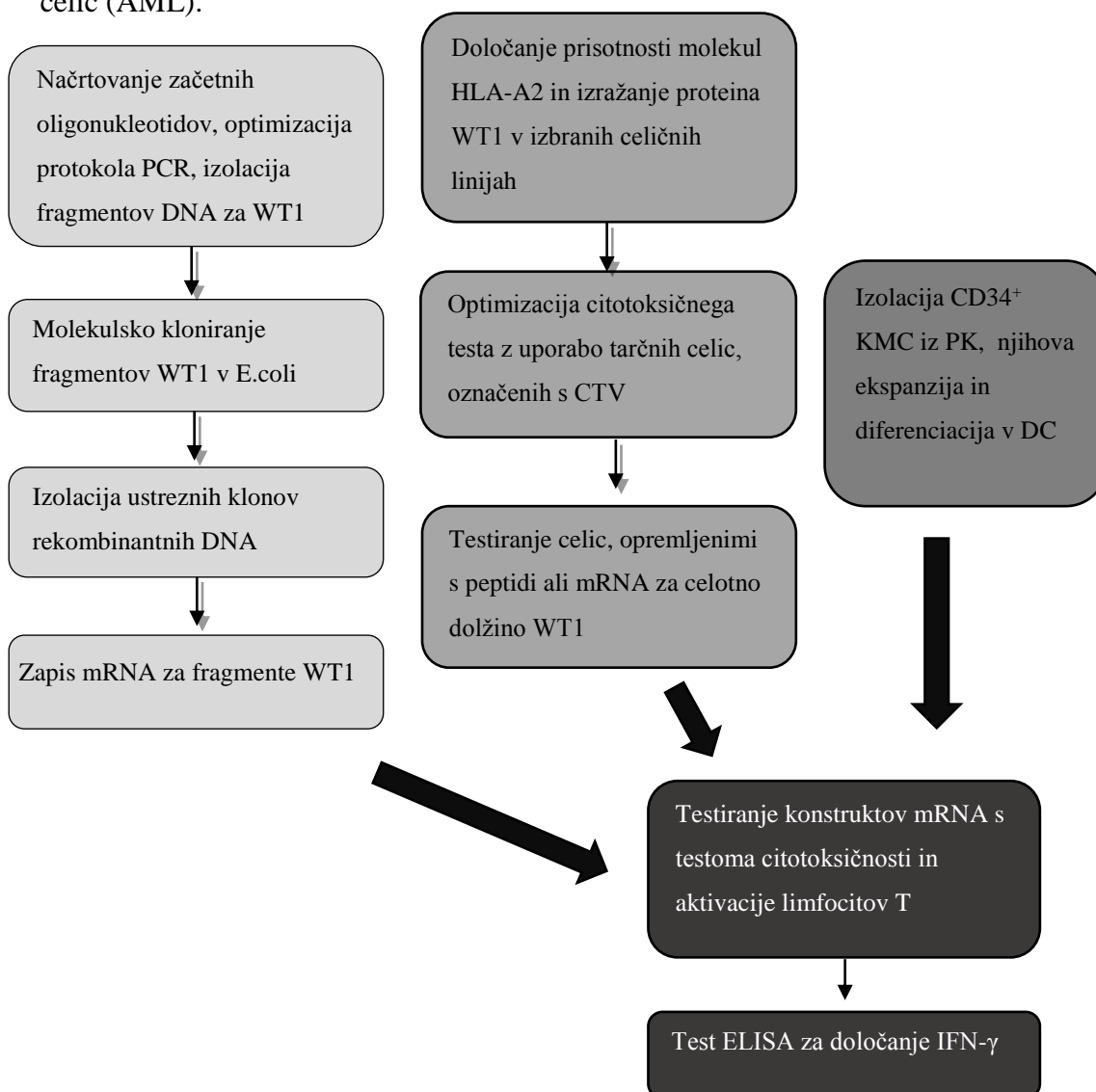
Sestavina	Volumen
Pufer Cut Smart, 10X	13,0 µL
Encim SpeI (10 U/µL)	1,0 µL
Encim SacI (10 U/µL)	1,0 µL
Prečiščena voda	60,0 µL
ΣV	75,0 µL

K 4 μL vsakega posameznega vzorca smo dodali 6 μL zgoraj opisane mešanice in ga inkubirali 1 uro na 37 °C v vodni kopeli. Nastale produkte smo analizirali z gelsko elektroforezo na 1% agaroznem gelu in nato gel slikali pod UV svetlobo.

4. NAČRT EKSPERIMENTALNEGA DELA

Zadali smo si naslednje naloge (Slika 9):

- Optimizirati test za merjenje obsega citotoksičnosti limfocitov T, ki izražajo rekombinantne TCR, specifične za prepoznavo na molekule HLA-A2 (A*02:01) vezanih peptidov WT1₁₂₆₋₁₃₄, ob uporabi s CTV označenih tumorskih celic, opremljenih z antigeni WT1.
- Določiti optimalne velikosti in konfiguracije proteinskih fragmentov WT1, ki bi se lahko vezali tako na molekule HLA razreda I kot razreda II.
- Testirati, ali ti konstrukti izboljšajo T-celično prepoznavanje in ubijanje levkemičnih celic (AML).



Slika 9: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

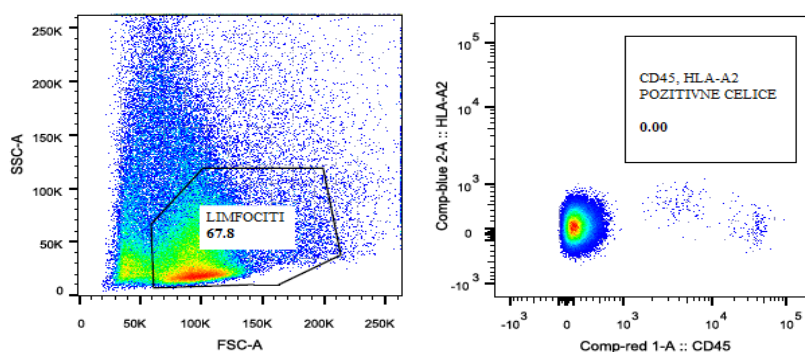
5.1 IZOLACIJA CD34⁺ KMC IZ POPKOVNIČNE KRVI (PK)

Na UMC v Utrechtu so večkrat tedensko izolirali CD34⁺ KMC iz sveže ali največ en dan stare PK, odvzete s heparinom. Na vsaki vrečki s PK je bil zapisan spol in datum rojstva otroka, čas odvzema ter volumen vzorca. Iz vsakega vzorca smo odvzeli po 50 μ L PK in jih shranili za ugotavljanje prisotnosti molekul HLA-A2, s pretočnim citometrom.

Točkovni diagram na Sliki 10 prikazuje primer darovalca, ki nima antigenov HLA-A2.

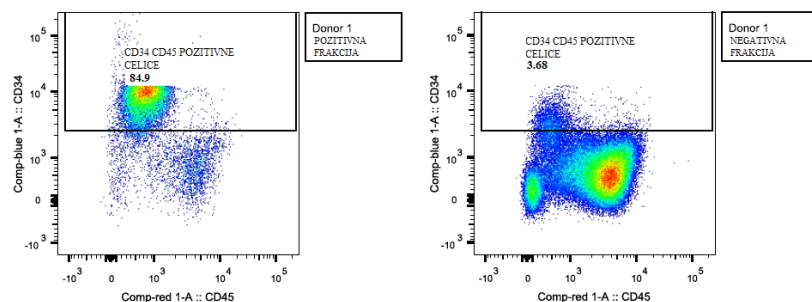
Primer: Darovalec št.1

Spol: moški
Čas rojstva: 5.2.2016 10:15
Volumen krvi: 75mL



Slika 10: Primer točkovnega diagrama pri ugotavljanju izražanja molekul HLA-A2 na limfocitih darovalca št.1. Celice smo označili s protitelesi proti molekulam CD45 (PC5) in HLA-A2(PE) v pufru FACS ter izmerili jakost fluorescenčnih signalov s pretočnim citometrom. Na ordinati (SSC-A) je prikazana granuliranost, na abscisi (FSC-A) pa velikost celic. Zamejili smo populacijo limfocitov (67,8%) ter jo analizirali glede na podpopulaciji CD45⁺ in HLA-A2⁺ celic. Številke označujejo deleže izbranih celičnih populacij v %.

Nato smo na osnovi gostotnega gradienta, z uporabo raztopine fikola, iz razredčene PK izolirali sloj mononuklearnih celic. Te smo nato z metodo imunomagnetnega ločevanja (MACS) ločili na CD34⁺ in CD34⁻ celice. Pri tem smo za ločevanje celic namesto ene, uporabili dve ločitveni koloni MACS LS. Po končani izolaciji CD34⁺ KMC smo s pretočnim citometrom preverili čistost obeh ločenih frakcij (Slika 11).



Slika 11: Točkovna diagrama preverjanja čistosti CD34⁺ in CD34⁻ celičnih frakcij darovalca 1. Levo CD34⁺ in desno CD34⁻ frakcija celic. Celice smo označili s fluorescenčno označenimi protitelesi proti molekulam CD45(PC5) in CD34(FitC) ter izmerili jakosti fluorescenc s pretočnim citometrom. Številke prikazujejo deleže celičnih populacij v %.

V predstavljenem primeru (Slika 11) smo znotraj CD34⁺ frakcije določili 84,9% CD34⁺ celic, kar smo ocenili za ustrezno čist vzorec. Ob tem smo v CD34⁻ frakciji zaznali le nizke vrednosti izgubljenih oz. zaostalih CD34⁺ celic.

Iz CD34⁺ frakcij smo pripravili celične suspenzije s po 5×10^4 celic/mL v mediju X-VIVO 15 ter izvedli njihovo dvotedensko ekspanzijo in diferenciacijo v DC, skladno s predpisanim protokolom. Pri tem smo ugotovili 600-kratno ekspanzijo celic in obilno izražanje označevalcev pripadnosti CD11⁺ HLA-DR⁺, značilnih za DC.

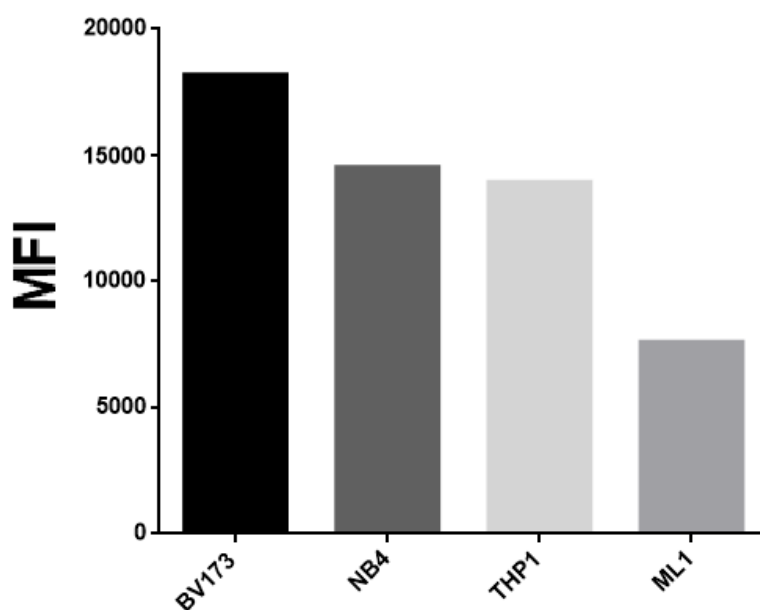
5.2 OPTIMIZACIJA CITOTOKSIČNEGA TESTA Z NERADIOAKTIVNIM OZNAČEVANJEM TARČNIH CELIC S CTV

Za optimizacijo citotoksičnega testa smo izbrali različne človeške celične linije AML: ML1, NB4, BV173 in THP1. Z zunajceličnim in znotrajceličnim označevanjem tarčnih molekul smo na njihovih površinah določali prisotnost oz. odsotnost molekul HLA-A2, v celicah pa obseg izražanja znotrajceličnega proteina WT1. Vse izbrane celične linije so bile HLA-A2 pozitivne, kar je bil pogoj za njihovo nadaljnjo uporabo (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Seznam in lastnosti testiranih človeških celičnih linij AML.

Ime celične linije	Vrsta celične linije	Izražanje molekul HLA-A2
ML1	Akutna mieloblastna levkemija	+
NB4	Akutna mieloblastna levkemija	+
THP1	Akutna mieloblastna levkemija	+
BV173	Akutna mieloblastna levkemija	+

Rezultate znotrajceličnega označevanja onkoproteina WT1 v posameznih celičnih linijah prikazuje referenčni histogram na Sliki 12.



Slika 12: Referenčni histogram, ki prikazuje vrednosti MFI kot merila za obseg izražanja onkoproteina WT1 v celičnih linijah BV173, NB4, THP1, in ML1.

Vse analizirane celične linije so pričakovano izražale onkoprotein WT1, a v različnih obsejih. Ugotovili smo, da ga največ vsebujejo celice BV173 in NB4, nekoliko manj THP1, najmanj pa celice ML1 (Slika 12).

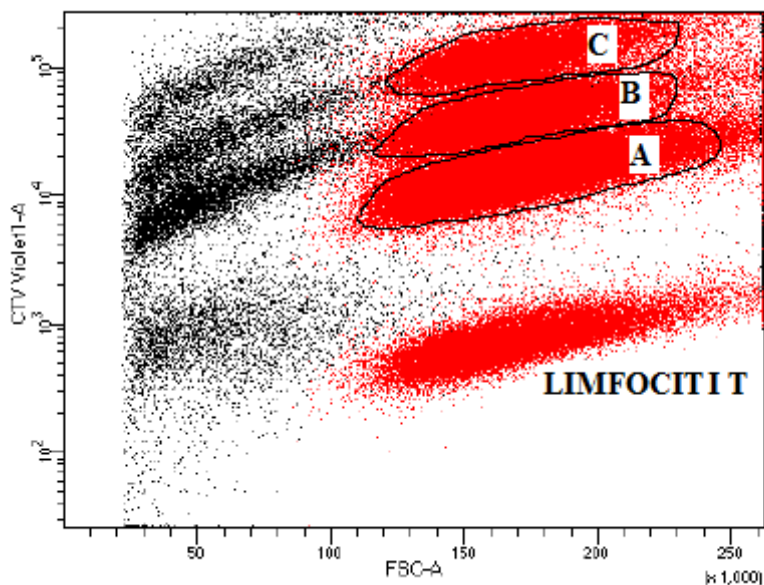
Citotoksični test s tarčnimi celicami človeških celičnih linij AML

Za optimizacijo 4-urnega neradioaktivnega citotoksičnega testa smo morali najprej določiti optimalno koncentracijo dodanega barvila CTV. Če ga dodamo v presežku, namreč lahko pride do nespecifičnega obarvanja neželenih molekul in s tem do visoke intenzitete fluorescence, ki je ne moremo pravilno ovrednotiti s pretočno citometrijo. Poleg tega so lahko previsoke koncentracije barvila citotoksične, kar seveda vpliva na verodostojnost rezultatov (38, 43).

Zato smo želeli najti ustrezno količino CTV, s katero bi dosegli nedvoumno razlikovanje med označenimi in neoznačenimi celicami s pretočnim citometrom. Izvedli smo titracijski postopek, v okviru katerega smo levkemične celice THP1 obarvali z naslednjimi naraščajočimi koncentracijami CTV:

- A) 1 μ L CTV (5 mM) + 12,5 mL PBS (1:12.500)
- B) 1 μ L CTV (5 mM) + 5 mL PBS (1:5.000)
- C) 1 μ L CTV (5 mM) + 2,5 mL PBS (1:2.500)

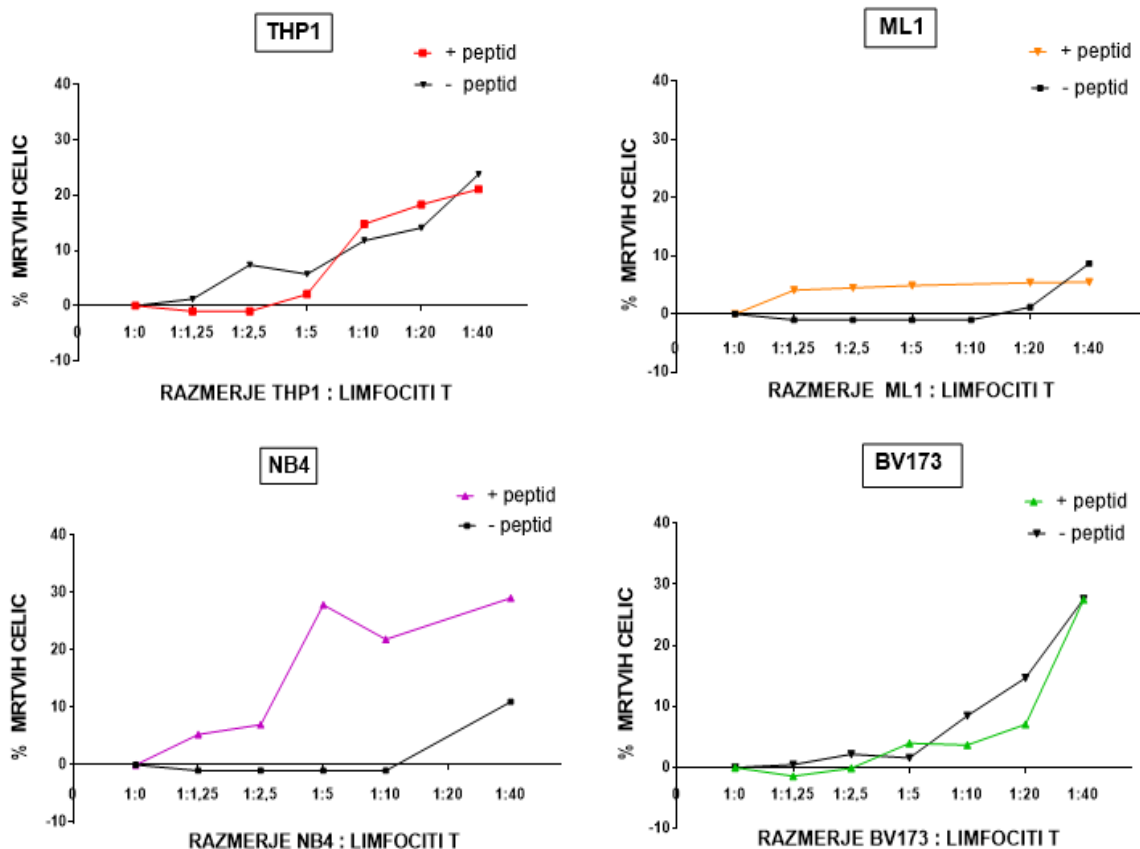
Nato smo različno obarvane celice analizirali s pretočnim citometrom (Slika 13).



Slika 13: Točkovni diagram celic THP1, označenih z naraščajočimi koncentracijami barvila CTV (A – 1:12.500; B – 1:5.000; C – 1:2.500).

Na točkovnem diagramu smo zlahka ločili populacije različno intenzivno obarvanih celic. Za nadaljnji poskus smo zbrali najbolj razredčeno raztopino CTV (A – 1:12.500), s katero smo dosegli jasno ločbo celic ob fluorescenčnih vrednostih znotraj okvira detekcije pretočnega citometra.

V nadaljevanju smo različne tarčne celice oz. celične linije AML, v različnih razmerjih, 4 ure inkubirali z limfociti T, ki izražajo za peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄, vezan na molekule HLA-A2, specifične rekombinantne TCR. Po inkubaciji smo vsem vzorcem dodali barvilo 7AAD in z njim specifično obarvali mrtve celice (Slika 14).



Slika 14: Grafični prikaz deležev mrtvih tarčnih celic BV173, THP1, ML1 in NB4, označenih s 7AAD, po njihovi 4-urni inkubaciji z različnimi količinami efektorskih limfocitov T. Vzorce smo analizirali s programom BD FACSDiva, pri čemer smo zamejili populacijo CTV-pozitivnih, znotraj teh pa s 7AAD obarvano skupino mrtvih tarčnih celic. Tarčnim celicam smo pred izvedbo citotoksičnega testa bodisi dodali peptivator (+ peptid) ali pa ne (- peptid).

Pri uporabi tarčnih celic THP1 smo po 4-urni inkubaciji določili 26% ali manj mrtvih celic. Med tarčnimi celicami z ali brez dodanega peptivatorja pa nismo opazili statistično značilnih razlik. V primeru celic ML1, ki smo jim dodali peptivator smo izmerili le 6-8% mrtvih celic, medtem ko v kombinacijah brez peptivatorja nismo zaznali citotoksičnega delovanja limfocitov T. To lahko pojasnimo z večjim obsegom izražanja znotrajceličnega proteina WT1 v celicah THP1, v primerjavi s celicami ML1. Slednje namreč v primerjavi z ostalimi analiziranimi celičnimi linijami AML izražajo najmanj onkoproteina WT1, kar torej potrjujejo tudi naši rezultati.

Ugotovili smo, da je bil največji obseg s T-celicami izzvane citotoksičnosti prisoten pri uporabi tarčnih celic BV173 in NB4, ki najmočneje izražajo WT1. Pri obeh vrstah tarčnih celic smo zaznali približno 30% mrtvih, predhodno s CTV označenih celic. Opazili smo tudi, da pri uporabi tarčnih celic NB4 brez dodanega peptivatorja (z izjemo najvišjega uporabljenega deleža efektorskih limfocitov T, 1:40) kljub visokemu izražanju znotrajceličnega proteina WT1 ni bilo zaznavne citotoksičnosti. Možen razlog za to bi lahko bil v nižjem obsegu izražanja površinskih molekul HLA-A2, kar je pogosta značilnost tumorskih celic in je še niso uspeli v celoti pojasniti. Zaradi manjšega števila molekul HLA-A2, interno oz. znotrajcelično procesiranje endogenih peptidov WT1₁₂₆₋₁₃₄ in njihova vezava na HLA-A2, kar je pogoj za njihovo prepoznavanje s TCR na specifičnih klonih limfocitov T, nista dovolj učinkovita. Pozitivne rezultate, ki smo jih dobili s tarčnimi celicami, obdelanimi s peptivatorjem pa lahko pojasnimo s tem, da v tem primeru ni potrebna internalizacija tako dodanih antigenskih peptidov, pač pa se lahko ti vežejo neposredno na molekule HLA-A2, ki so že izražene na celičnih površinah (51).

Sicer pa je zmanjšano izražanje ali celo odsotnost molekul HLA na tumorskih celicah pomembna ovira, ki negativno vpliva na klinični potek imunske terapije rakavih obolenj. Tumorske celice razvijejo številne načine pobega pred nadzorom imunskega sistema, med katerimi je tudi modifikacija izražanja molekul HLA, kar vodi tudi v napake pri procesiranju antigenov. Vzrok za to so lahko mutacije genskih zapisov za izražanje molekul HLA, kar ima za posledico motnje v njihovi regulaciji ter posledično manjšo dovzetnost tumorskih celic za lizo s protitumorskimi CLT (51, 52).

Glede na dobljene rezultate menimo, da je protokol citotoksičnega testa, ki smo ga razvili, dovolj učinkovit in specifičen za določanje antigensko pogojenega citotoksičnega delovanja limfocitov T, ob uporabi tarčnih celic, označenih s CTV. Zato smo ga uporabili kot osnovno testno metodo v nadaljnjih raziskavah. Z označevanjem tarčnih celic s CTV pa smo odprli tudi vrata novim metodam za spremljanje učinkovitosti imunskih cepiv *in vitro*. Naš novi test lahko uporabljamo tudi za večdnevne preskuse citotoksičnosti, s katerimi bi spremljali in zaznavali počasnejše efektorske mehanizme CLT. S sočasno uporabo tetramerov oz. pentamerov molekul HLA z vezanimi antigenskimi peptidi in drugih načinov ugotavljanja prisotnosti specifičnih T-celičnih klonov pa bomo lahko s še večjo natančnostjo spremljali aktivacijo in citotoksično delovanje protitumorskih CTL na različne podskupine tarčnih celic.

5.3 VREDNOTENJE RAZLIČNIH NAČINOV DOSTAVE ANTIGENSKIH PEPTIDOV WT1 V CELICE ČLOVEŠKEGA MULTIPLEGA MIELOMA U266

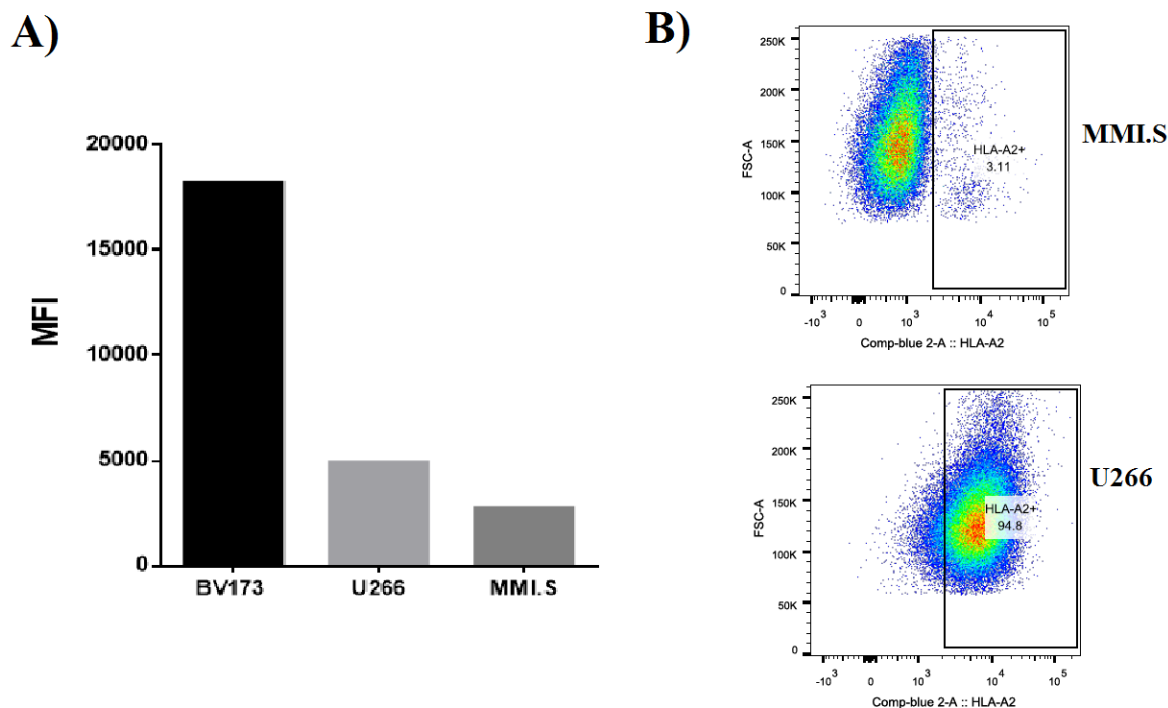
Za elektroporacijo in izražanje načrtovanih konstruktov mRNA za različno dolge peptide WT1 smo potrebovali ustrezne gostiteljske celice. Te ne smejo izražati znotrajceličnega proteina WT1, saj bi to motilo izražanje novo nastalih proteinov/peptidov po transkripciji vstavljenih konstruktov, zaradi česar bi dobili lažno pozitivne rezultate. Ker je predstavljanje imunogenih peptidov WT1₁₂₆₋₁₃₄ omejena s tipom molekule HLA, smo potrebovali celice, ki izražajo HLA-A2.

Zato smo z metodo zunajceličnega in znotrajceličnega fluorescenčnega označevanja molekul določali prisotnost molekul HLA-A2 in količino znotrajceličnega onkoproteina WT1 na in v človeških celičnih linijah multiplega mieloma U266 in MM1.S.

Preglednica XIV: Vrsti testiranih človeških celičnih linij multiplega mieloma in njuno izražanje molekul HLA-A2 in onkoproteina WT1.

Ime celične linije	Vrsta celične linije	Izražanje proteina WT1	Izražanje molekul HLA-A2
U266	Multipli mielom	šibko	+
MM1.S	Multipli mielom	šibko	-

Celični liniji multiplega mieloma MM1.S in U266 sta pričakovano šibko izražali onkoprotein WT1, ob tem pa so bile celice U266 HLA-A2 pozitivne, zato smo jih izbrali kot gostiteljice za izražanje mRNA z zapisi za izbrane peptidne konstrukte WT1 (Slika 15).



Slika 15: A) Referenčni histogram s prikazanimi vrednostmi MFI, ki prikazujejo količine izraženega onkoproteina WT1 v človeških celičnih linijah U266, MML.S in BV173 (pozitivna kontrola). B) Točkovna diagrama ugotavljanja prisotnosti molekul HLA-A2 na celicah U266 in MML.S. Celice smo označili s 7AAD in fluorescenčnimi protitelesi anti-CD3(FitC) in anti-HLA-A2(PE) ter jakosti fluorescenc izmerili s pretočnim citometrom.

5.3.1 Elektroporacija celic U266 z mRNA za GFP

Testirali smo dve možni nastavitvi pulziranja celic U266 z električnim tokom v celičnem elektroporatorju, s čimer smo ugotavljali njihovo preživetje celic v izbranih pogojih ter jakost fluorescence zelenega fluorescenčnega proteina GFP (*ang. Green Fluorescent Protein*), ki smo ga v obliki mRNA elektroporirali vanje.

Pri uporabi elektroporacijskega protokola z eksponentnim razpadom smo uporabili pogoje, pri katerih se je nastavljena napetost iz kondenzatorja hitro sprostila in nato eksponentno razpadla v daljšem časovnem obdobju (milisekunde). V drugem primeru pa smo preskusili protokol s konstantnim časom, pri katerem so bili pulzi nastavljeni na 7 ms pri napetosti 300 V. Kot smo že omenili, smo merili jakost fluorescence GFP, vgrajenega v 7AAD negativne, torej žive celice U266. Po analizi rezultatov smo za nadaljnje delo izbrali elektroporacijski protokol s konstantnim časom, ki je zagotavljal tako večjo izražanje fluorescence GFP kot tudi večjo število živih celic U266.

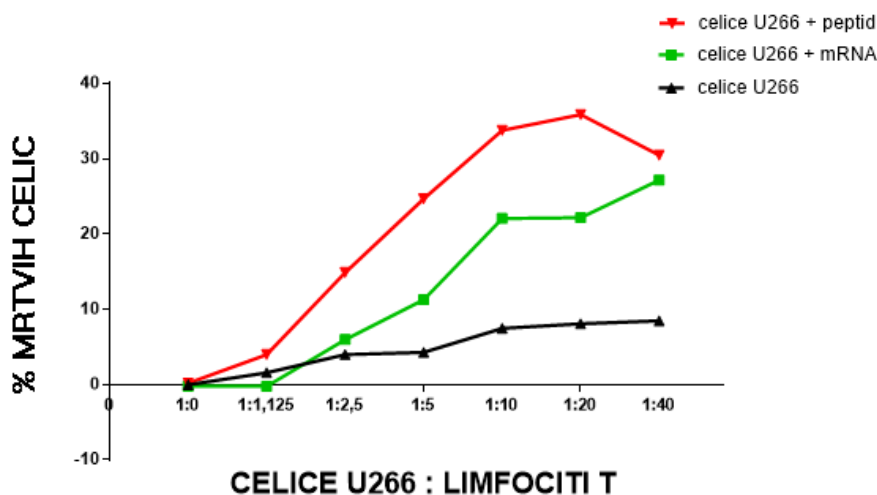
5.3.2 Testa aktivacije in citotoksičnega delovanja limfocitov T z uporabo celic U266, opremljenih z antigeni proteina WT1

Obseg aktivacije in jakost citotoksičnega delovanja protitumorskih limfocitov T smo ugotavljali z uporabo s CTV označenih celic U266, ki smo jih pred tem opremili bodisi s celotnim zapisom mRNA za onkoprotein WT1 ali pa s krajšimi peptidi WT1, z uporabo peptivatorja WT1. Tako pripravljene celice smo nato inkubirali s CD4⁺ in CD8⁺ celicami T, ki izražajo rekombinantne TCR, specifične za peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄, vezan na molekule HLA-A2. Pripravili smo 2 identični mikrotitrski plošči ter izvedli tako citotoksični kot aktivacijski test.

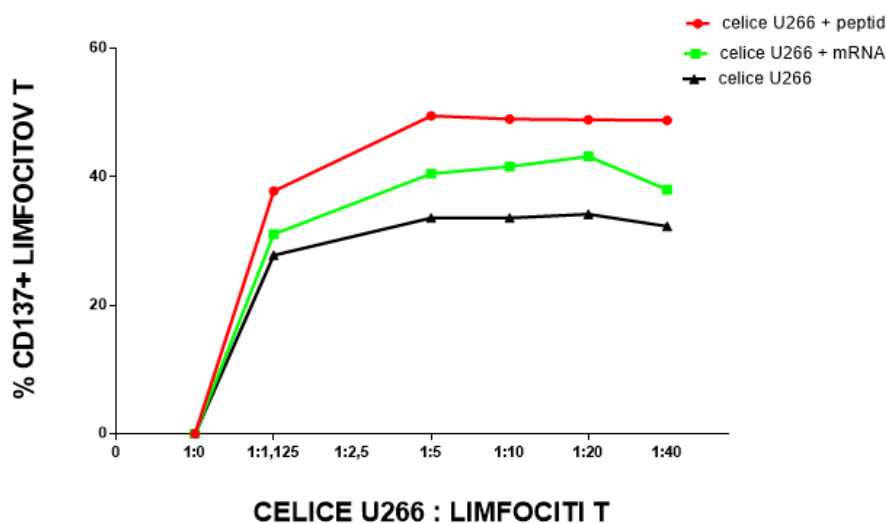
Za določanje obsega citotoksičnega delovanja specifičnih CD8⁺ CLT zoper tarčne celice U266, označene s CTV, smo po 4-urni inkubaciji mrtve celice U266 označili s 7AAD in izmerili fluorescenco s pretočnim citometrom (Slika 16).

Drugo, identično mikrotitrsko ploščo, ki je prav tako vsebovala različna razmerja med limfociti T in s CTV označenimi celicami U266 pa smo inkubirali 24 ur, nato označili mrtve celice z barvilom 7AAD ter na površinah limfocitov T izmerili jakost fluoresce s specifičnimi protitelesi označenih molekul CD137, ki so označevalci njihove aktivacije (Slika 17).

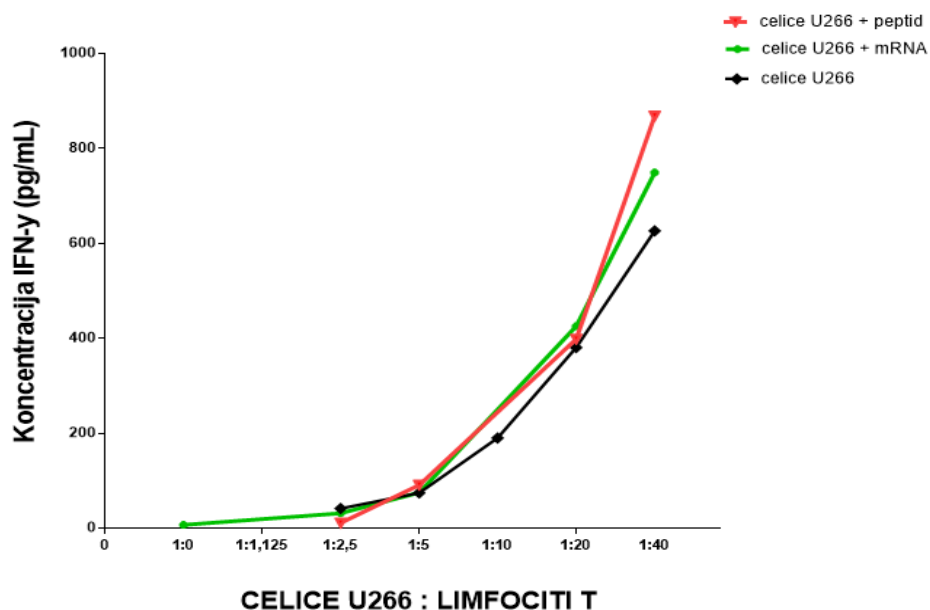
Poleg tega smo s testom sendvič ELISA izmerili tudi koncentracije sproščenega IFN- γ v supernatantih posameznih mikrokultur po 24-urnem T-celičnem aktivacijskem testu (Slika 18).



Slika 16: Grafični prikaz deležev mrtvih, s CTV in 7AAD označenih tarčnih celic U266, opremljenih bodisi s peptidi WT1, transfeciranimi z mRNA za celoten onkoprotein WT1 ali pa brez dodanih antigenov, po 4-urni inkubaciji z različnimi količinami efektorskih limfocitov T (CLT). Podatke smo analizirali s programom BD FACSDiva, pri čemer smo najprej zamejili populacijo CTV-pozitivnih celic U266, znotraj te pa s 7AAD označeno podpopulacijo mrtvih tarčnih celic. Rezultati citotoksičnega testa so prikazani v obliki odstotkov mrtvih tarčnih celic pri različnih razmerjih dodanih efektorskih CLT.



Slika 17: Grafični prikaz deležev CD137⁺ (receptor 4-1BB) aktiviranih efektorskih limfocitov T po 24-urni inkubaciji njihovih različnih količin z vedno enakim številom s CTV označenih tarčnih celic U266. Limfocite T smo označil s fluorescenčno označenimi protitelesi anti-CD3(FitC), anti-CD8(PC7) in anti-CD137(PE) in nato izmerili jakosti fluorescenc s pretočnim citometrom.



Slika 18: Grafični prikaz količin IFN- γ , določenih v supernatantih mikrokultur po izvedenem 24-urnem testu aktivacije efektorskih limfocitov T s testom sendvič ELISA. Vsebnost IFN- γ v pg/mL smo izmerili pri različnih razmerjih celic U266, ki smo jih bodisi opremili z antigeni WT1 ali pa ne, in efektorskih limfocitov T.

Rezultati so pokazali, da so celice U266, ki smo jih opremili s krajšimi peptidi WT1 in tiste, ki smo jih transfecirali z mRNA za celotni protein WT1, uspešno aktivirale in spodbudile citotoksično delovanje efektorskih CLT. Pri tem pa so tarčne celice U266, ki smo jih inkubirali s peptivatorjem WT1, specifični CLT ubijali v približno 10% večjem obsegu kot tiste, ki smo jih elektroporirali z mRNA WT1.

To razliko smo potrdili tudi v T-celičnem aktivacijskem testu, v katerem smo izmerili obilnejše izražanje molekul CD137 na tistih efektorskih limfocitih T, ki smo jih inkubirali s celicami U266, pulziranimi s peptivatorjem WT1. Molekule CD137 (receptor 4-1BB) namreč izražajo samo aktivirani CD8⁺ in CD4⁺ limfociti T, signal, ki nastane po vezavi liganda nanje pa pospešuje njihovo proliferacijo in diferenciacijo, zato je to dober pokazatelj uspešnosti T-celičnega prepoznavanja antigenov.

Tudi s pomočjo testa ELISA smo potrdili navedene ugotovitve, saj smo opazili višje koncentracije IFN- γ v supernatantih mikrokultur, v katerih so bile prisotne celice U266, ki smo jih opremili s peptidi WT1. Citokin IFN- γ proizvajajo le ustrezno stimulirane CD4⁺ in CD8⁺ celice T. IFN- γ spodbuja specifični imunski odziv tako, da vzpodbuja izražanje molekul HLA razreda I in II, kar izboljša predstavljanje antigenov limfocitom T.

Vsi predstavljeni rezultati so vezani na predstavljanje imunogenega peptida WT1₁₂₆₋₁₃₄ v kontekstu molekul HLA-A2, saj smo kot efektorje uporabili klone limfocitov T, ki specifično prepoznajo izključno specifični epitop na tem kompleksu. Peptidi z dolžinami 15 ak iz peptivatorja WT1 se neposredno vežejo v vezavna mesta površinsko izraženih molekul HLA-A2. V elektroporiranih celicah pa se mRNA z zapisom za celoten protein WT1 nahaja v citozolu, kjer pride najprej do translacije proteina, nato pa do njegovega procesiranja in šele potem do vezave nastalih antigenskih peptidov na molekule HLA. Menimo, da so celice, ki smo jim dodali peptivator WT1 bolje predstavljale peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄ v okviru molekul HLA-A2 predvsem zato, ker v tem primeru ni bilo potrebno predhodno prevajanje mRNA v protein, njegovo procesiranje v peptide in njihova nadaljnja vezava na molekule HLA. Poleg tega lahko elektroporacija negativno vpliva na izražanje molekul HLA na tumorskih celicah. Omejenost našega citotoksičnega testa pa je bila v tem, da smo lahko z njim preverjali le en sam imunogen peptidni epitop, kar seveda ne predstavlja celotne slike citotoksičnega imunskega odziva CLT, je pa kljub temu tovrsten podatek dober pokazatelj funkcionalne uspešnosti oz. citotoksičnega potenciala efektorskih limfocitov T.

Pri ugotavljanju učinkov celičnih imunskih cepiv se vedno bolj uveljavlja pristop opremljanja DC z elektroporacijo mRNA z zapisi za celokupne TAA. Prednost te tehnologije pred inkubacijo DC s peptidi (pulziranje) je predvsem v izražanju številnih antigenskih epitopov, neodvisno od fenotipa HLA bolnika, kar je pomemben dejavnik pri obsežnejši proizvodnji protitumorskih cepiv.

Po transfekciji s celokupno tumorsko mRNA, ki vsebuje zapis za vse TAA, ki so značilni za tumor, se torej v DC izrazijo vsi možni epitopi, pri uporabi posameznih peptidov pa smo omejeni le na že raziskane oz. dobro znane antigene. Pri slednjih je T-celični odziv omejen na samo en imunodominantni epitop, ki pa lahko variira med posameznimi bolniki, zato se lahko zgodi, da z njim ne dosežemo želenih rezultatov. DC, ki jih transfeciramo s celokupno tumorsko mRNA pa seveda inducira večji in robustnejši repertoar efektorskih klonov limfocitov T. Ta pristop omogoča tudi predhodne genske modifikacije izražanja proteinov, saj lahko s pomočjo kloniranja konstruktov mRNA dodajamo ali spreminjamo zaporedja nukleotidnih zapisov tako, da izboljšamo imunogenost in predstavljanje antigenskih peptidov vezanih na molekule HLA limfocitom T. Slaba stran transfekcije DC z mRNA pa je razmeroma majhno število preživelih elektroporiranih celic, od katerih vse

niso več aktivne ter variabilnost izražanja antigenskih proteinov. Kljub temu pa je ta metoda opremljanja DC s TAA pridobila certifikat za izvajanje v pogojih dobre proizvodne prakse (GMP), kar je pogoj za klinično uporabnost celičnih cepiv in za obsežnejšo proizvodnjo tovrstnih pripravkov za imunske terapije.

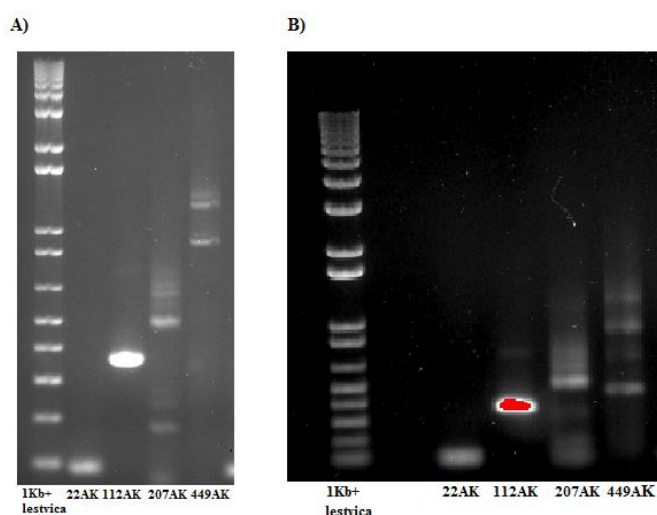
V bistvu gre pri tem za velik napredek, saj je bila največja pomanjkljivost do sedaj razvitih celičnih imunoterapevtskih pripravkov prav njihova izdelava za vsakega posameznega bolnika, ne pa za širšo populacijo obolelih. Cilj razvoja na tem področju je standardizacija celičnih protitumorskih, zlasti večepitopnih cepiv, pripravljenih s pomočjo rekombinantnih proteinov, virusnih vektorjev ali sinteznih peptidov, s čimer bi omogočili njihovo masovnejšo proizvodnjo in širšo uporabo. Največjo prepreko na tej poti predstavljata majhno število dosedaj odkritih univerzalnih TAA in seveda s posameznimi tipi molekul HLA omejeno predstavljanje antigenskih peptidov. Slednje je pogosto vezano na prisotnost molekul HLA-A2, ki pa so zelo pogoste v belski populaciji Evrope in ZDA(>20%) (53).

5.4 NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN OPTIMIZACIJA PROTOKOLA PCR

Za potrebe te raziskave smo izbrali ustreza zaporedja DNA z zapisi za 4 peptide WT1 različnih dolžin. Za osnovo nam je služil znani epitop WT1₁₂₆₋₁₃₄ z ak zaporedjem RMFPNAPYL. Gre za dobro raziskani imunogeni peptid, ki se veže na molekule HLA-A2. Za pomnoževanje ustreznih delov DNA, kjer se nahaja zapis za onkoprotein WT1, z metodo PCR smo načrtovali začetne oligonukleotide (ZO). Pri tem smo bili pozorni na to, da izbrane sekvence niso vsebovale stop-kodonov ali dodatnih prepoznavnih mest za restriksijske encime, preko katerih smo želeli naše inserte DNA vstaviti v izbrani vektor. Paziti smo morali tudi na T_m ZO, na razmerja njihovih baznih parov in prisotnost zapisov, ki bi lahko izzvali nastajanje neželenih zank ali dimerov. Po večkratnih poskusih smo uspeli določiti optimalne ZO, s katerimi smo dobili produkte PCR pravih velikosti, z majhno vsebnostjo neželenih sestavin. Med preskušanjem smo spreminjali sekvenčne zapise ZO in pogoje reakcije PCR.

V prvem sklopu načrtovanih ZO smo produkte po reakciji PCR analizirali z elektroforezo v 1% agaroznem gelu. Namesto jasnih posameznih lis za vsakega od pomnoženih segmentov DNA smo opazili več nespecifičnih lis in dimerov, ki so nastali zaradi medmolekulskih interakcij znotraj nukleotidnih zapisov v ZO (Slika 19).

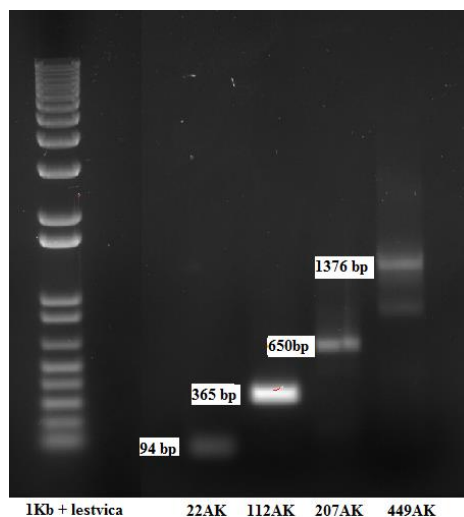
Zato smo v drugem sklopu preskušanih ZO spremenili začetni kodon ATG v polno Kozakovo zaporedje in v strukturo uvedli dvojni stop kodon TGA. S tem smo zmanjšali homologijo zapisa in posledično dobili čistejše lise fragmentov DNA v agaroznem gelu. Pri drugem testiranju ZO smo na gelu prav tako zaznali nekaj nespecifičnih in razmazanih lis. Menili smo, da so se pojavile zaradi nepravilnega pripenjanja ZO na matrično DNA ali pa, da so posledica previsokih T_m preskušanih ZO.



Slika 19: Slika 1% agaroznega gela z elektroforezno ločenimi produkti reakcij PCR, ki smo jih izvedli med prvim (A) in drugim preskušanjem ZO (B). Elektroforezo smo izvedli v pufru TAE, pri konstantni napetosti 100 V. Trajala je približno eno uro. Gel smo nato osvetlili z UV svetlobo in ga slikali. Rdeče obarvana lisa 112 AK (B) prikazuje močno koncentriran produkt.

Pripenjanje ZO je trajalo približno pol minute pri temperaturi 50 – 65 °C, kar je optimalna za delovanje ZO. Ker je bila T_m ZO v drugem sklopu preskušanja 70 – 72 °C, smo jo želeli znižati na 65 – 67 °C. To smo dosegli s ponovnim konstruiranjem zaporedij, pri čemer smo zmanjšali število baznih parov GC in skrajšali sekvence ZO. Obenem smo v protokolu PCR podaljšali tudi čas pripenjanja ZO, in sicer s 25 na 30 sekund (54).

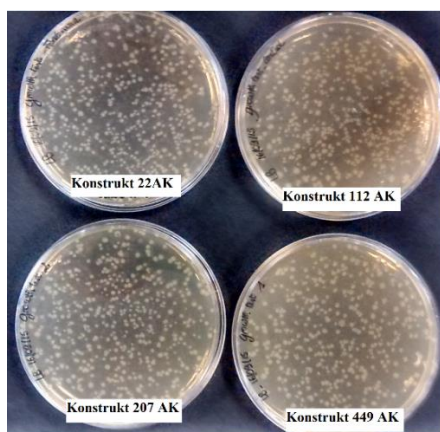
Po teh spremembah ZO smo z elektroforezo produktov PCR na 1% agaroznem gelu dobili jasne lise posameznih fragmentov DNA, s pravnimi velikostmi (Slika 20). Ker so produkti PCR oz. pomnoženi fragmenti DNA končno ustrezali našim kriterijem, smo jih vgradili v izbrani nosilni vektor pcDNA 3.1. Pred tem smo fragmente DNA in nosilni vektor najprej obdelali z restrikcijskima encimoma KpnI in EcoRI, izvedli ligacijo, nato pa plazmide z inserti s toplotnim šokom vstavili v bakterijske celice E.coli.



Slika 20: Slika 1% agaroznega gela z elektroforezno ločenimi produkti reakcij PCR, ki smo jih izvedli v okviru tretjega sklopa testiranj ZO. Elektroforeza v pufru TAE je potekala približno eno uro pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV svetlobo in ga slikali.

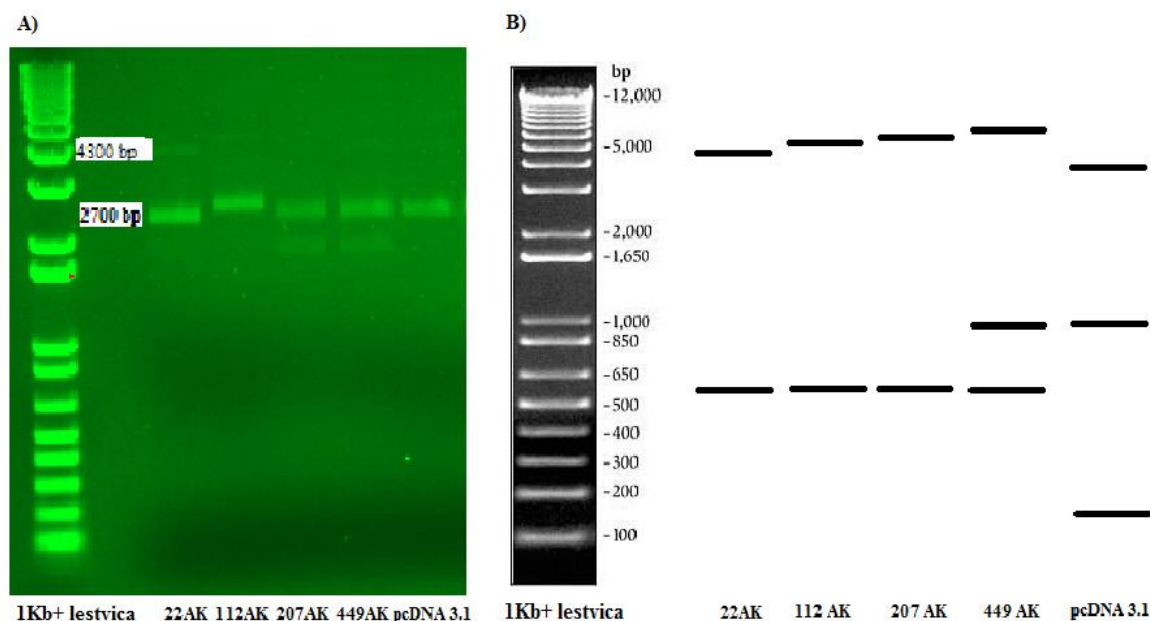
5.5 KLONIRANJE PRODUKTOV PCR V E.COLI

V koraku selekcije nastalih kolonij transformiranih celic E.coli (Slika 21) smo bakterije izpostavili ampicilinu, pri čemer so preživele le tiste s pravilno vstavljenim plazmidom, ki je vseboval vgrajene fragmente DNA.



Slika 21: Slike petrijevk s kolonijami bakterij E.coli z vstavljenimi plazmidnimi konstrukti, ki rastejo na gojišču LB-agar.

Po 2 dneh smo iz njih s postopkom minipreparacije izolirali molekule plazmidne DNA. Produkte kloniranja in čisti plazmid pcDNA 3.1, ki smo ga uporabili za kontrolo, smo obdelali s kombinacijo restrikcijskih encimov SacI in SpeI in jih nato analizirali z gelsko elektroforezo (Slika 22).



Slika 22: A) Slika 1% agaroznega gela z elektroforezno ločenimi produkti kloniranja fragmentov DNA in vektorja pcDNA 3.1, ki smo jih predhodno razrezali z restriktazama SacI in SpeI. Elektroforeza je v pufru TAE potekala približno eno uro, pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV svetlobo in ga slikali.

B) Pričakovani položaji lis, ki bi jih dobili v primeru uspešnega kloniranja po predhodni obdelavi produktov z restriktazama SacI in SpeI – slika je bila izdelana s pomočjo računalniškega programa ApE.

Žal nam kljub večkratnim poskusom kloniranja in uporabi različnih kombinacij restripcijskih encimov ni uspelo dobiti zelenih produktov. Vse do stopnje, v kateri smo z encimoma KpnI in EcoRI ustvarili lepljive konce fragmentov DNA in vektorja pcDNA3.1, smo bili uspešni, saj smo potrdili ustreznost produktov. Vzroke za napake smo zato iskali v korakih kloniranja, a smo po večkratnih ponovitvah tega procesa dobili podobne rezultate. V laboratoriju za delo z gensko spremenjenimi organizmi, kamor smo poslali v analizo vse uporabljene materiale in pripomočke, pa je potrdil njihovo ustreznost oz. neoporečnost. Vzorce smo analizirali tudi spektrofotometrično in pri tem ugotovili nižje koncentracije DNA, kot smo jih pričakovali. Ko smo jih analizirali še z elektroforezo pa smo v gelu opazili nespecifične lise nepravilnih velikosti (Slika 22, A).

Naš končni sklep je bil, da je bil morda vektor pcDNA 3.1 kontaminiran in/ali da je prišlo do napačne ligacije insertov DNA. Zato bi bilo treba v nadaljevanju ponovno konstruirati fragmente DNA in izbrati drug nosilni vektor, v katerega bi jih lahko vstavili.

6. SKLEP

Cilj naše naloge je bil določiti optimalno konfiguracijo proteinov WT1, s katerimi bi poleg CD8⁺ aktivirali tudi CD4⁺ limfocite T, s čimer bi ojačali protitumorski citotoksični imunski odziv CLT in omogočili dolgoročno protitumorsko delovanje imunskih celic bolnikov. Pred testiranjem konstruktov DNA, z zapisi za peptide WT1, smo opravili vrsto optimizacij uporabljenih testov in protokolov. Izpopolnili smo 4-urni citotoksični test, v katerem smo namesto z radioaktivnim ⁵¹Cr, uporabili s fluorescenčnim barvilom CTV označene tarčne tumorske celice. Optimizirani citotoksični test smo nato preskusili še z uporabo dostopnih človeških celičnih linij AML, ki smo jih predhodno testirali na prisotnost molekul HLA-A2 in jakost izražanja znotrajceličnega onkoproteina WT1. Efektorske celice v testu so bili limfociti T, ki so izražali rekombinantne T-celične receptorje, specifične za peptid WT1₁₂₆₋₁₃₄, vezan na molekule HLA-A2 in z njimi izvedli specifično ubijanje tarčnih celic AML ter tako potrdili pravilno delovanje našega citotoksičnega testa.

V nadaljevanju smo izbrali celice multiplega mieloma U266, ki prav tako izražajo molekule HLA-A2, obenem pa le šibko endogeni onkoprotein WT1, in jih opremili bodisi s posameznimi peptidi proteina WT1, dolgimi po 15 ak, in sicer z uporabo peptivatorja WT1 ali pa jih elektroporirali z mRNA z zapisom za celotno dolžino WT1. Pri uporabi celic U266, opremljenih s peptidnimi fragmenti WT1, ki smo jih obarvali s CTV smo izmerili za 10% višjo citotoksičnost in aktivacijo specifičnih limfocitov T, kot v primeru njihove transfekcije z mRNA. Gledano v celoti sta oba pristopa dostave tumorskih antigenov izkazala visoko raven aktivacije CLT in s tem posledičnega ubijanja tumorskih tarčnih celic. Kljub nekaterim prednostim transfekcije dendritičnih celic (DC) s tumorsko mRNA menimo, da sta obravnavani metodi dostave antigenov primerni za nadaljnji razvoj večepitopnih protitumorskih celičnih cepiv kot terapevtskih pripravkov, v smislu možnosti standardizacije postopkov njihove izdelave ter zagotovitve njihove širše uporabnosti.

Za načrtovanje štirih konstruktov DNA z zapisi za peptide WT1 različnih dolžin, smo kot osnovo izbrali dobro raziskani epitop WT1₁₂₆₋₁₃₄, z aminokislinskim zaporedjem RMFPNAPYL, ki se specifično veže na molekule HLA-A2. Konstrukte smo uspešno pomnožili z reakcijo PCR ob uporabi izbranih začetnih oligonukleotidov. Vanje smo

vklučili nukleotidna zaporedja, potrebna za translacijo v želene peptide v gostiteljskih celicah.

Fragmente pomnožene DNA smo nato vstavili v vektor pcDNA 3.1 in jih klonirali v bakterijskih celicah E.coli. Žal, kljub mnogokratnim ponovitvam, iz njih nismo uspeli dobiti želenih produktov, kar smo preverjali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Ne glede na to pa lahko naše delo ocenimo kot uspešno, saj ugotovitve in dobljeni rezultati predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje raziskave na področju izboljševanja antigenskega potenciala celičnih cepiv, izdelanih na osnovi DC, za bolnike z AML.

7. LITERATURA

1. J.E. Rubnitz, H. Inaba: Childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 2012; Vol. 159: 259–76.
2. Van Tendeloo VF., Van de Velde A., Van Driessche A, Cools N., Anguille S.: Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(31):13824-9
3. Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.J., Camitta B.M., Stevens C., Cairo M.S., et al.: Comparable long-term survival after unrelated and HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantations for acute leukemia in children younger than 18 months. *J Clin Oncol.* 2006; 24(1):145–51.
4. <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/typical-treatment-of-aml.html>
5. Döhner H, Estey E.H., Amadori S. in sod.: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115: 453-474.
6. de Haar C., Plantinga M., Blokland N.J., van Til N.P., in sod.: Generation of a cord blood-derived Wilms Tumor 1 dendritic cell vaccine for AML patients treated with allogeneic cord blood transplantation. *Oncoimmunology* 2015; 4(11):e1023973.
7. Cornelissen J.J., Blaise D.: Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission; *Blood* 2016; 127(1):62-70.
8. Eapen M., Wagner E. J.: Transplant outcomes in acute leukemia (I), *Semin Hematol* 2010; 47:46-50.
9. Palucka K., Bacherau J.: Cancer immunotherapy via dendritic cells; *Nature Reviews Cancer* 2012; 12(4):265-77.
10. Shortman K., Liu X.Y.: Mouse and dendritic cell subtypes. *Nature Review Immunology.* 2002, 2(3):151-61.
11. Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L.: Antigenpresentation and T cell Stimulation by dendritic cells. *Institut Curie Annu.Rev.Immunol* 2002.20:621-667.
12. Kenneth M.: *Janeway's Immunology* 8th edition, 2011, Part II in Part II.
13. Kenneth M., *Janeway's Immunology* 8th edition, 2011, Garland Science; Poglavlje IV, Odstavek 8.

14. Abbas in sod.: Cellular and Molecular Immunology 5th Edition; Sanders 2003.
15. Storni T., Bachmann M.F.: Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *J Immunol.* 2005; 174:1811-1819.
16. Heath R. W., Carbone R. F.: Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature reviews* 2001, 126-134.
17. W.R. Heath, R. Carbone: Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance; *Nature Reviews Immunology* 1, 2001, 126-134.
18. Palucka K., Banchereau J.: Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity.* 2013; 39(1):38-48.
19. Obermajer N.: Priprava protitumorskih cepiv na osnovi dendritičnih celic. *Farm vest* 2011;62(1): 9-14.
20. Plantiga M., de Haar C., Nierkens S., Boelens J: Dendritic cell therapy in an allogeneic-hematopoietic cell transplantation setting: an effective strategy toward better disease control? *Frontiersin* 2014, 5: 218.
21. Anguille S., Smits L. Evelien, Lion E., van Tanderloo V. F., Berneman N Z. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014; 15:257-67.
22. Subklewe M., Geiger C., Lichtenegger F.: New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63:1093-1103.
23. Yamamoto A., Kormann M., Rosenecker J., Rudolph C.: Current prospects form RNA gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71(3):484-9.
24. Tavernier G., Andries O., Demeester J.: mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release.* 2011; 150(3):238-47.
25. Tuyraerts S., Aerts J.L., Corthals J., Neyns B. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:1513–1537.
26. Breckpot K., Heirman C., Neyns B., Thielemans K.: Exploiting dendritic cells for cancer immunotherapy: genetic modification of dendritic cells. *J Gene Med* 2004; 6:1175–1188.
27. Jarnjak-Jankovic S., Pettersen R.D., Saeboe-Larssen S., Wesenberg F., Gaudernack G.: Evaluation of dendritic cells loaded with apoptotic cancer cells or expressing tumour mRNA as potential cancer vaccines against leukemia. *BMC Cancer* 2005; 5:20.

28. Berlin C., Kowalewski D.J., Schuster H., Mirza N.: Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia* 2015, 29:647-659.
29. Oji Y., Ogawa H., Tamaki H. in sod.: Expression of Wilms' Tumor Gene WT1 in Solid Tumors and Its Involvement in Tumor Cell Growth. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999; 90:194-204.
30. Coulie G.P., Van den Eynde J.B., Van der Brugger P., Boon T.: Tumor antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature reviews cancer* 2014, 14(2):135-46.
31. Sugiyama Haruo: WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and cancer Immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40(5):377-387.
32. O'Neill D.W., Adams S., Bhardway N.: Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104:8.
33. Chi K.H., Liu S.J., Li C.P. in sod.: Combination of conformal radiotherapy and intratumoral injection of adoptive dendritic cell immunotherapy in refractory hepatoma. *J Immunother* 2005; 28:129–35.
34. Bedrosian I., Mick R., Xu S., Nisenbaum H., Faries M., in sod.: Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003; 21(20):3826-35.
35. Walker B.E., Disis M.L.: Monitoring immune responses in cancer patients receiving tumor vaccines. *Intern.Rev. Immunol.* 2003, 22: 283-319.
36. Cilloni, D., Renneville A., Hermitte F., Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized WT1 Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study. *Journal of clinical oncology*, 2009; 27(31):5195-201.
37. Clay T. M., Hobeika A.C., Mosca P.J.: Assays for Monitoring Cellular Immune Responses to Active Immunotherapy of Cancer. *Clinical Cancer Research* 2001; 7(5):1127-35.
38. Marzo L.A., Kinnear F. B., Lake A. R. :Tumor-Specific CD41 T Cells Have a Major “Post-Licensing” Role in CTL Mediated Anti-Tumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 6047–6055.

39. Quah J.C., Parish C.R.: New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes; *Journal of Immunological Methods* 2012; 31;379(1-2):1-14.
40. Zhonghua Lin in sod.: In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells; *Nature Protocols* 9, 2014.
41. <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/hematopoietic-stem-cells/cd34-microbead-kit-human.aspx>
42. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/staining-intracellular-antigens-flow-cytometry.html#nuclear>
43. Hermansa I. F., Silka J. D., Yang J.: The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *Journal of Immunological Methods* 2004; 285(1): 25– 40.
44. Jedema I., M. van der Werff, Rene'e M. Y. Barge; New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population; *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2677-82.
45. <http://www.ebioscience.com/resources/best-protocols/elisa-protocols.htm>
46. <http://www.neb-online.de/en/cst/pathscan-elisa-arrays/>
47. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-design-tools.html>
48. Invitrogen Corporation, pcDNA 3.1 user manual, V795-20
49. http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalDNARNAProtein.pdf
50. http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NSEP.pdf
51. Hicklin D.j., Marincola F.M., Ferrone S.: HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story; *Mol Med Today*. 1999; 5(4):178-86.
52. Sette A., Chesnut R., Fikes J.: HLA expression in cancer: implications for T cell-based immunotherapy; *Immunogenetics*. 2001; 53(4):255-63.
53. Kalinski P., Urban j., Narang r.: Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need; *Future Oncol*. 2009; 5(3): 379-390.

54. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-troubleshooting.html>

8. PRILOGE

Priloga 1: Aminokislinsko zaporedje proteina WT1

Izooblika 1 (ID: P19544-1) [UniParc]

Dolžina: 449 Masa (Da):49,188

Vir: <http://www.uniprot.org/uniprot/P19544>

```
10 20 30 40 50
MGSDVRDLNA LLPAVPSLGG GGGCALPVSG AAQWAPVLDF APPGASAYGS
60 70 80 90 100
LGGPAPPAP PPPPPPPHS FIKQEPSWGG AEPHEEQCLS AFTVHFSGQF
110 120 130 140 150
TGTAGACRYG PFGPPPSQA SSGQARMFPN APYLPSCLCS QPAIRNQGYS
160 170 180 190 200
TVTFDGTPSY GHTPSHAAQ FPNHSFKHED PMGQQGSLGE QQYSVPPPVY
210 220 230 240 250
GCHTPTDSC TGSQALLRTP YSSDNLYQMT SQLECMTWNQ MNLGATLKGV
260 270 280 290 300
AAGSSSVKW TEGQSNHSTG YESDNHTTPI LCGAQYRIHT HGVFRGIQDV
310 320 330 340 350
RRVPGVAPTL VRSASETSEK RPFMCA YPGC NKRYFKLSHL QMHSRKHTGE
360 370 380 390 400
KPYQCDFKDC ERFRSDQL KRHRRTHTGV KPFQCKTCQR KFSRSDHLKT
410 420 430 440
HTRTHTGKTS EKPFSRWPS CQKKFARSD E LVRHHNMHQR NMTKLQLAL
```