

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



TEJA GERMOVNIK

**VREDNOTENJE MEDSEBOJNIH VPLIVOV ALOGENSKIH  
DENDRITIČNIH CELIC V MEŠANIH KULTURAH *in vitro***

***EVALUATION OF INTERACTIONS OF ALLOGENEIC DENDRITIC  
CELLS IN MIXED CULTURES *in vitro****

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, na Centru za tipizacijo tkiv, pod mentorstvom doc. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

*Ob tej priložnosti bi se iskreno zahvalila mentorju, doc. dr. Matjažu Jerasu mag. farm., za vso posredovano strokovno znanje, usmerjanje pri pisanju in ker si je vedno vzel čas za odgovarjanje na moja vprašanja pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala gre tudi somentorju, dr. Urbanu Švajgerju mag. farm., za koristne napotke, pomoč pri delu v laboratoriju in opravljanju meritev.*

*Najlepše bi se zahvalila tudi mojima staršema in sestri Neži, ki so mi tekom študija ves čas pomagali, fantu Franciju, ker je verjel vame in me podpiral, ter vsem prijateljem in sošolcem za nepozabna študijska leta.*

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Ljubljana, 2011

Teja Germovnik

Sestava diplomske komisije:

Predsednik: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Mentor: doc. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Somentor: dr. Urban Švajger, mag. farm.

Član: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

**KAZALO VSEBINE**

<b>Povzetek</b> .....	<b>III</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Seznam okrajšav</b> .....	<b>VII</b>
<b>Kazalo slik</b> .....	<b>IX</b>
<b>Kazalo preglednic</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 VLOGA DC V IMUNSKEM SISTEMU.....	1
1.1.1 VRSTE DC IN NJHOVA PORAZDELITEV V TELESU.....	1
1.1.2 ŽIVLJENJSKI CIKEL MIELOIDNIH DC.....	3
1.1.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREŽIVETJE DC.....	5
1.1.4 VLOGA DC PRI AKTIVACIJI IN PROLIFERACIJI LIMFOCITOV T.....	7
1.1.5 VLOGA DC PRI DIFERENCIACIJI CD4 <sup>+</sup> LIMFOCITOV T.....	9
1.1.5.1 Vloga različnih citokinov pri polarizaciji imunskega odziva vrste T <sub>H1</sub> .....	10
1.1.5.2 Ostali dejavniki, ki usmerjajo imunski odziv T <sub>H1</sub> /T <sub>H2</sub> .....	11
1.2 PRIPRAVA ČLOVEŠKIH DENDRITIČNIH CELIC <i>in vitro</i> .....	12
1.2.1 DIFERENCIACIJA NEZRELIH DC.....	13
1.2.2 PRIPRAVA ZRELIH DC.....	15
1.3 IMUNSKA TERAPIJA RAKA Z DC.....	18
1.3.1 UGOTAVLJANJE IMUNSKEGA ODZIVA PO APLIKACIJI DC.....	19
1.3.2 NASTANEK EFEKTORSKIH CD8 <sup>+</sup> CITOTOKSIČNIH LIMFOCITOV T (CTL).....	20
1.3.3 PRIPRAVA CEPIV NA OSNOVI DC.....	22
1.3.4 UPORABA DC ZA IMUNSKO ZDRAVLJENJE RAKA.....	23
<b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE</b> .....	<b>25</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>27</b>
3.1 MATERIALI.....	27
3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI.....	27
3.1.2 GOJIŠČA.....	27
3.1.3 TOPNI DEJAVNIKI.....	28
3.2 METODE.....	29
3.2.1 OSAMITEV MONOCITOV Z GRADIENTNIM CENTRIFUGIRANJEM.....	29
3.2.1.1 Osamitev mononuklearnih celic (MNC) iz levkocitnega koncentrata.....	29
3.2.1.2 Osamitev monocitov iz suspenzije mononuklearnih celic.....	29
3.2.2 PRIPRAVA DENDRITIČNIH CELIC.....	30
3.2.2.1 Priprava nezrelih dendritičnih celic.....	30
3.2.2.2 Priprava zrelih dendritičnih celic.....	31
3.2.3 PRIPRAVA SUSPENZIJ CD4 <sup>+</sup> LIMFOCITOV T.....	31
3.2.4 OSTALI POSTOPKI PRI DELU S CELIČNIMI KULTURAMI.....	32
3.2.4.1 Štetje celic.....	32

3.2.4.2 Spremljanje morfoloških značilnosti celic.....	33
3.2.4.3 Zamrzovanje in odmrzovanje celic.....	33
3.2.5 SPREMLJANJE APOPTOZE DC .....	34
3.2.6 UGOTAVLJANJE CELIČNIH FENOTIPOV NA RAZLIČNIH STOPNJAH PRIPRAVE DC .....	34
3.2.6.1 Označevanje celic s specifičnimi monoklonskimi protitelesi.....	34
3.2.6.2 Določanje fenotipa DC s pretočnim citometrom.....	35
3.2.7 MERJENJE CITOKINOV V SUPERNATANTIH CELIČNIH KULTUR S TEHNIKO ELISA.....	36
3.2.8 MEŠANA LIMFOCITNA REAKCIJA (MLR) .....	36
3.2.8.1 Gojenje mešanih kultur in merjenje proliferacijskega odziva.....	36
3.2.9 POLARIZACIJSKA STIMULACIJSKA SPOSOBNOST RAZLIČNO GOJENIH DC.....	37
3.2.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	38
3.2.11 NAČRT DELA.....	39
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>40</b>
4.1 PRIPRAVA DC IZ MONOCITOV <i>in vitro</i> .....	40
4.2 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI DC V MONOKULTURAH IN MEŠANIH ALOGENSKIH KOKULTURAH.....	41
4.2.1 DOLOČANJE OBSEGA APOPTOZE .....	41
4.2.2 IZRAŽANJE ZNAČILNIH POVRŠINSKIH MOLEKUL NA DC .....	43
4.2.3 IZDELOVANJE IL-10 IN IL-12p70 V NEZRELIH IN ZRELIH DC .....	47
4.3 SPOSOBNOST DC ZA INDUKCIJO ALOGENSKEGA IMUNSKEGA ODZIVA ....	50
4.3.1 UGOTAVLJANJE PROLIFERACIJSKIH ODZIVOV LIMFOCITOV T PO STIMULACIJI Z ALOGENSKIMI DC.....	50
4.3.2 INDUKCIJA EFEKTORSKIH LIMFOCITOV T VRSTE T <sub>H</sub> 1 IZ CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> NAIVNIH LIMFOCITOV T .....	52
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>55</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>66</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## Povzetek

Dendritične celice (DC) uvrščamo med profesionalne antigene predstavljajoče celice (APC), saj s svojim delovanjem uspešno povezujejo mehanizme prirojene in pridobljene imunosti. V primerjavi z drugimi APC najučinkoviteje sprožijo aktivacijske celične imunске odzive, izjemno pomembne pa so tudi pri vzdrževanju tolerance na telesu lastne antigene. Medtem, ko imajo nezrele DC veliko sposobnost privzemanja snovi iz svoje okolice, pa je za zrele značilna učinkovita predelava antigenov in njihovo izražanje v okviru molekul HLA, ki jih sočasno z močnimi kostimulacijskimi signali ponujajo v prepoznavo naivnim limfocitom T. Zaradi vseh teh izjemnih lastnosti, so jih začeli uporabljati v terapevtske namene, med drugim tudi za zdravljenje rakavih obolenj.

V strokovni literaturi so opisani številni postopki priprave, predvsem avtolognih DC, *in vitro*. Alogenske DC, ki jih lahko diferenciramo iz monocitov nesorodnih zdravih oseb, predstavljajo pomemben potencialen vir celic za imunsko terapijo, saj jih lahko na ta način najlažje pripravimo in shranimo v zadostnem številu, kar nam omogoča, da jih v več odmerkih uporabimo pri posameznem pacientu oziroma z njimi zdravimo večje število bolnikov. Namen našega dela je bil ovrednotiti morebitne medsebojne vplive alogenskih DC, gojenih v enakih deležih v mešanih kokulturah *in vitro*. Zlasti nas je zanimalo, ali sočasna prisotnost DC nesorodnih oseb v isti kulturi vpliva na njihovo stabilnost, fenotip, proizvodnjo citokinov in sposobnosti aloimunske aktivacije limfocitov T.

Iz monocitov, ki smo jih osamili iz mononuklearnih celic štirih posameznih darovalcev, smo v prisotnosti GM-CSF in IL-4 pripravili nezrele DC, ki smo jih nato aktivirali s poli(I:C). V vseh eksperimentih smo med seboj primerjali nezrele in zrele DC, ki smo jih gojili posamično v monokulturah ali skupaj v mešanih kokulturah. V vseh primerih smo s pretočnim citometrom izmerili deleže apoptotičnih in mrtvih DC ter določili obsege izražanja značilnih površinskih molekul CD80, CD86, CCR7 in HLA-DR, s testom ELISA pa preverili tudi njihovo zmožnost izdelovanja citokinov IL-10 in IL-12p70. Aloimunske odzive limfocitov T na stimulacijo z nezrelimi in zreli DC, predhodno gojenimi v monokulturah ali v mešanih kokulturah, smo ovrednotili: i) z merjenjem njihove proliferacije v funkcijskem testu reakcije pomešanih limfocitov (MLR), in ii) z znotrajceličnim določevanjem citokinov IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 in IL-10 s pomočjo pretočne citometrije.

Ugotovili smo, da so alogenske DC v mešanih kokulturah stabilne skozi daljše obdobje in da se njihov fenotip, v primerjavi s tistimi, gojenimi v monokulturah, ni spremenil. Dendritične celice iz mešanih alogenskih kokultur se v profilu proizvedenih citokinov niso bistveno razlikovale od tistih iz monokultur, so pa bile zato učinkovitejše prožilke proliferacije alogenskih limfocitov T v mikrokulturah MLR. Čeprav so DC iz vseh vrst kultur izdelovale nekoliko manj IL-12p70, pa so bile tiste iz mešanih alogenskih kokultur uspešnejše pri sprožitvi imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1. Glede na naše izsledke lahko trdimo, da so alogenske DC iz mešanih kokultur sposobne najučinkoviteje sprožiti specifični aloimunski odziv naivnih limfocitov T *in vitro*, na kar naj bi najbolj vplival večji nabor različnih molekul HLA, ki ga izražajo na svojih površinah.

## Abstract

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells (APCs), which act as a link between the innate and antigen-specific adaptive immunity. In comparison to other types of APCs, they trigger activating cellular immune responses more effectively and are also extremely important in the maintenance of tolerance to self antigens. Immature DCs have a great capability to uptake antigens from their microenvironment, while their mature counterparts are characterized by highly efficient antigen processing, binding of resulting antigenic peptides to HLA molecules and presenting them to naïve T lymphocytes, with concomitant strong co-stimulatory signals. Because of their exceptional properties, DCs are being considered for therapeutic purposes, including the immunotherapy of cancer.

Variety of different *in vitro* protocols for preparing DC have been described in the literature to date, but mainly for the use of autologous DC. Allogeneic DCs derived from monocytes of healthy unrelated donors represent an important potential source of cells for immune therapies, because they can be prepared and stored in high quantities that can be used either in multiple doses for a treatment of a single patients or applied to many different recipients. The purpose of our work was to evaluate potential interactions between equal numbers of different allogeneic DC within their mixed cocultures *in vitro*. In particular, we were interested to explore whether the concomitant presence of DCs derived from different donors in the same culture affects their stability, phenotype, cytokine secretion profiles, as well as their capacities to stimulate T lymphocytes.

Monocytes, isolated from peripheral blood mononuclear cells of four unrelated healthy individuals, were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4 in order to differentiate them into immature DCs, that were subsequently matured by the addition of poly(I:C). In every individual experiment immature and mature DCs from individual monocultures as well as their mixed allogeneic cocultures were included and compared. In all of these experimental settings the proportions of apoptotic and dead DCs as well as their surface expression of typical markers CD80, CD86, CCR7 and HLA-DR were assessed by flow cytometry. Additionally, their capacities for IL-10 and IL-12p70 production were determined by ELISA. *In vitro* T-cell responses following their stimulation with differentially cultured immature and mature allogeneic DCs were evaluated: i) by measuring their proliferation in a standard *in*

*vitro* functional test, i.e. the mixed lymphocyte reaction (MLR), and ii) by assessing their intracellular concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10 with flow cytometry.

We found out that DCs in mixed allogeneic cultures are stable even during a longer period of time and that their phenotype remains unchanged, compared to control DCs from monocultures. The cytokine profile of DCs from mixed allogeneic cocultures did not differ significantly from that of DCs in monocultures, but they were nevertheless more efficient stimulators of T-cell proliferation in MLRs. Although DCs from all types of cultures were producing rather low amounts of IL-12p70, those derived from mixed allogeneic cocultures much more effectively polarized naïve T lymphocytes toward a T<sub>H</sub>1 profile. Based on our results, we can conclude that allogeneic DCs from their mixed cocultures are able to induce stronger specific alloimmune responses of naïve T cells *in vitro* than those of single donors from monocultures, which is most probably due to a wider range of different HLA molecules expressed on their surfaces.



## Seznam okrajšav

Ag	antigen
APC	antigene predstavljajoče celice
BC	levkocitni koncentrat (ang. <i>Buffy Coat</i> )
CD	celični označevalec (ang. <i>Cluster of Differentiaton</i> )
celice NK	naravne celice ubijalke (ang. <i>Natural Killer cells</i> )
celice T <sub>H</sub>	celice T pomagalke (ang. <i>Helper T Cells</i> )
CpG	zaporedje več citozinskih in gvaninskih ostankov skupaj
cpm	števki na minuto (ang. <i>counts per minute</i> )
CTL	cititoksični limfociti T
DC	dendritične celice
ER	endoplazmatski retikulum
FBS	fetalni goveji serum (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i> )
GM-CSF	granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (ang. <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i> )
HLA	kompleks tkivne skladnosti pri človeku (ang. <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
IFN	interferon
IL	interlevkin
LC	Langerhansove celice
li	invariantna veriga
LPS	lipopolisaharid
MCM	z monociti kondicionirano gojišče (ang. <i>Monocyte Conditioned Medium</i> )
mDC	mieloidne dendritične celice
MFI	srednja intenziteta fluorescence (ang. <i>Mean Flourescence Intensity</i> )
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (ang. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MLR	mešana limfocitna reakcija (ang. <i>Mixed Lymphocyte Reaction</i> )
MNC	mononuklearne celice
PBMC	mononuklearne celice iz venske krvi

	(ang. <i>Peripheral Blood Monocyte Cells</i> )
pDC	plazmacitoidne dendritične celice
PI3K	fosfatidilinozitol-3'-OH kinaza
R	odzivne celice (ang. <i>Responding cells</i> )
RANK	ang. <i>Receptor Activator of Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i>
PRR	ang. <i>Pattern Recognition Receptor</i>
S	dražilne celice (ang. <i>Stimulating cells</i> )
TAA	antigeni značilni za tumorske celice (ang. <i>Tumor Associated Antigen</i> )
TAP	ang. <i>Transporters Associated with Antigen Processing</i>
TCR	celični receptor limfocitov T (ang. <i>T-Cell Receptor</i> )
TGF- $\beta$	transformirajoči rastni faktor $\beta$ (ang. <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
TLR	receptorji podobni receptorju Toll (ang. <i>Toll-like receptors</i> )
TNF- $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ (ang. <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )
TRANCE	ang. <i>Tumor necrosis factor-Related Activation-Induced Cytokine Receptor</i>

**Kazalo slik**

- Slika 1: Življenjski krog mieloidnih DC, *in vivo*
- Slika 2: Vezava antigenov v okviru molekul MHC razreda I in MHC razreda II
- Slika 3: Shematski prikaz diferenciacije DC iz monocitov v nezrele DC in priprava zrelih DC z različnimi dejavniki zorenja *in vitro*
- Slika 4: Aktivacija CTL v prisotnosti oziroma odsotnosti CD4<sup>+</sup> limfocitov T
- Slika 5: Načrt dela
- Slika 6: Delež apoptotičnih in mrtvih celic v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah nezrelih in s poli(I:C) dozorelih DC
- Slika 7: Fenotip celic na različnih stopnjah priprave DC; (A) nezrele DC, (B) zrele DC
- Slika 8: Izražanje površinskih molekul v monokulturah (A) in mešanih alogenskih kokulturah (B) nezrelih in zrelih DC
- Slika 9: Citokinski profil v supernatantih monokultur in mešanih alogenskih kokultur v nezrelih in zrelih DC
- Slika 10: Proliferacijski odziv celokupnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v kulturah MLR z zrelemi in nezrelemi monokulturami oziroma mešano alogensko kokulturo DC
- Slika 11: Sposobnosti DC, različno pripravljenih kultur, da izzovejo polarizacijo CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> naivnih limfocitov T v smeri imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1

**Kazalo preglednic**

- Preglednica 1: Osnovne koncentracije topnih dejavnikov in namen njihove uporabe
- Preglednica 2: Specifična monoklonska protitelesa (mAb) za pretočno citometrijo, ki smo jih uporabili za označevanje površinskih molekul, izraženih na nezrelih in zrelih DC
- Preglednica 3: Specifična protitelesa za pretočno citometrijo, ki smo jih uporabili za detekcijo različnih citokinov v limfocitih T

## 1 UVOD

Za obrambo pred tujimi organizmi in snovmi (antigeni) je človeško telo tekom evolucije razvilo učinkovit imunski sistem, ki vključuje mehanizme naravne ali prirojene odpornosti in pridobljene oziroma specifične imunosti. Specifični imunski odziv okrepi zaščitne mehanizme naravne imunosti, je usmerjen in osredotočen na mesta, kjer je prisoten antigen (Ag). Pomemben je za nastanek protiteles, efektorskih celic in imunskega spomina. Pri tem so poleg limfocitov T nujno potrebne tudi specializirane antigene predstavljajoče celice (APC). Mednje štejemo makrofage, limfocite B in dendritične celice (DC). Slednje so najučinkovitejše APC, saj s svojim delovanjem povezujejo mehanizme naravne odpornosti z antigen specifičnim imunskim odzivom. Za razliko od drugih APC je za DC značilno, da učinkoviteje sprožijo imunske odzive, pomembne pa so tudi pri vzdrževanju tolerance na telesu lastne antigene.

Dendritične celice preizkušajo v številnih kliničnih študijah in sicer v obliki cepiv za zdravljenje rakavih obolenj, avtoimunskih in kroničnih vnetnih bolezni. Cilj tovrstne imunske terapije je antigensko specifična modulacija imunskega odziva. Pri rakavih bolnikih bi bila zaradi njihovega slabega zdravstvenega stanja priprava cepiv z uporabo DC nesorodnih zdravih oseb namesto avtolognih, zelo dobrodošla (1). Znano je tudi, da alogenske APC veliko močneje aktivirajo efektorske limfocite T. Vendar pa moramo pri njihovi uporabi zagotoviti vsaj delno ujemanje z bolnikovimi antigeni poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC; ang. *Major Histocompatibility Complex*), da lahko računamo na specifične imunske odzive njegovih imunskih celic na s tumorji povezane antigene (TAA; ang. *Tumor-Associated Antigens*).

### 1.1 VLOGA DC V IMUNSKEM SISTEMU

#### 1.1.1 VRSTE DC IN NJIHOVA PORAZDELITEV V TELESU

Dendritične celice predstavljajo heterogeno populacijo, ki predstavlja 1-2% vseh celic, pri čemer pa je njihov delež v krvi majhen, in sicer le 0,2% levkocitov. To razmeroma redko

celično vrsto je leta 1868 prvič opisal Paul Langerhans, ki je v epidermisu kože našel celice s številnimi izrastki, in sklepal, da je odkril živčne celice (2). Te, po njem imenovane Langerhansove celice pa so podskupina DC. Točna opredelitev vrste DC pri človeku je težavna, saj gre za zelo raznoliko skupino celic. Opredelimo jih lahko glede na: njihov izvor in fenotip, ki ga ugotavljamo na podlagi kombinacije površinsko izraženih molekul ter funkcijo, ki jo opravljajo v telesu. Poleg tega se DC nahajajo v različnih tkivih in organih na različnih razvojnih stopnjah. Dendritične celice so dobile ime prav zaradi svoje oblike, za katero so značilni številni izrastki. Vsem tem celicam je skupno, da konstitutivno izražajo molekule kompleksa tkivne skladnosti razreda II, ki jih pri ljudeh označujemo s kratico HLA (ang. *Human Leukocyte Antigen*), in da za razliko od drugih APC vsebujejo le malo endocitoznih mešičkov in lizosomov. Prav tako ne izražajo površinskih molekul, ki so značilne za druge levkocitne vrste, npr. CD3, CD14, CD19, CD11b in CD56 (3).

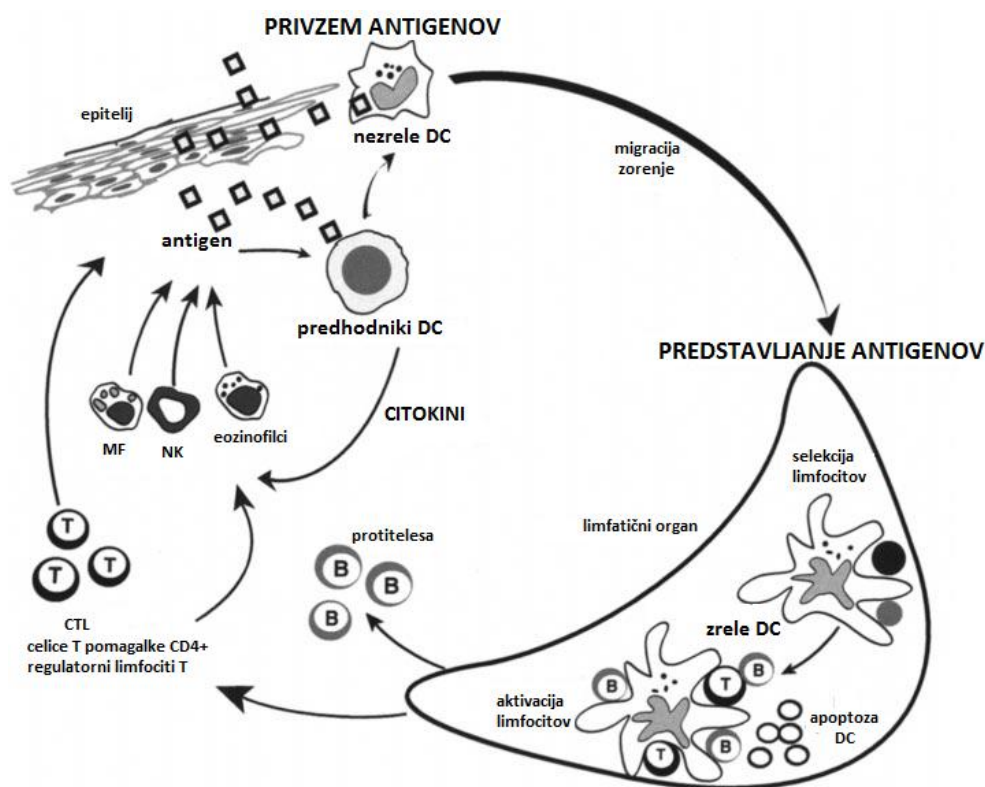
V strokovni literaturi večinoma navajajo 4 razvojne stopnje DC (4): progenitorne celice v kostnem mozgu, prekurzorske, nezrele in zrele DC. Prekurzorske DC v človeškem telesu delimo na mieloidne (mDC), ki so CD11<sup>+</sup> in CD11<sup>-</sup> plazmacitoidne (pDC), ki so limfoidnega izvora. Obe vrsti celic se razlikujeta v naboru citokinov, ki jih proizvajata, pojavljanju v telesu, fenotipu in funkcijah, ki jih opravljata.

Najbolje preučene so mieloidne DC, ki jih, glede na izražanje sladkornih strukturnih enot na celični površini ali glede na lokacijo v telesu, največkrat delimo na intersticijske in Langerhansove celice (LC). Intersticijske ali mukozne DC se nahajajo v dermisu in intersticiju večine ostalih telesnih organov. Intersticijske DC v perifernih tkivih so klasične mieloidne DC. Langerhansove celice pa se pojavljajo le v epidermisu kože ter sluznicah črevesja, urogenitalnega in respiratornega trakta (5). V primerjavi z LC, intersticijske DC veliko učinkoviteje privzemajo antigene in izražajo višje nivoje nespecifičnih esteraz, samo LC pa izražajo E-kadherin in langerin, ki je pomemben za nastanek Birbekovih granul (6).

Za razliko od mDC, je za pDC značilno izražanje molekul CD123, verig  $\alpha$  receptorja za interleukin 3 (IL-3 $\alpha$ R) ter razmeroma šibka ekspresija kostimulacijskih molekul CD40 in CD86. V imunskem odzivu na virusne okužbe imajo pDC sposobnost izdelovanja velikih količin interferonov vrste I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) (7), v telesu pa jih najdemo predvsem v krvi in sekundarnih limfatičnih organih.

### 1.1.2 ŽIVLJENJSKI CIKEL MIELOIDNIH DC

V pogojih *in vivo* se iz  $CD34^+$  mieloidnih progenitornih celic v kostnem mozgu razvijejo monociti ( $CD11^+CD14^+CD1^-$ ) in predhodnice Langerhansovih celic ( $CD11^+CD14^-CD1^+$ ). Prekurzorske celice nato krožijo po krvi, kjer neposredno srečujejo patogene, kar povzroči sproščanje citokinov (IFN- $\alpha$ ), ki lahko aktivirajo eozinofilce, makrofage in naravne celice ubijalke (celice NK). Poleg tega lahko vstopajo tudi v periferna tkiva, v katerih se nahajajo v nezreli oziroma neaktivirani obliki. Kot takšne imajo veliko sposobnost endocitoze in fagocitoze, kar jim omogoča stalno privzemanje snovi iz njihovega mikrookolja. Nezrele DC so slabi aktivatorji limfocitov T, saj izražajo razmeroma majhno število molekul HLA razredov I in II. Prav tako pa je na njihovih površinah prisotnih le malo kostimulacijskih molekul CD40, CD80 in CD86 (4).



**Slika 1:** Življenjski krog mieloidnih DC, *in vivo* (4).

Za privzem snovi iz svojega neposrednega okolja nezrele DC uporabljajo različne mehanizme, ki vključujejo:

- makropinocitozo zunajcelične tekočine,
- fagocitozo večjih delcev,
- receptorsko posredovano endocitozo, ki jo omogočajo lektinski receptorji tipa C (manozni receptorji, DEC-205) in receptorji Fc $\gamma$  vrste I, II in III (vežejo se na molekule CD64, CD32 oziroma CD16) in integrini (vežejo apoptotska telesa) (8).

DC prepoznajo prisotnost patogenih snovi s svojimi receptorji PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*), ki se vežejo na za patogene značilne molekulske vzorce PAMP (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Mednje sodijo različni lektinski in receptorji NOD (ang. *Nucleotide Oligomerization Domain*) ter dobro preučeni receptorji TLR (ang. *Toll-Like Receptors*). Lipopolisaharid (LPS), ki je sestavina celične stene Gram negativnih bakterij, aktivira TLR4, medtem ko receptor TLR2 prepozna peptidoglikane, značilne za Gram pozitivne bakterije. Bakterijski flagelin aktivira receptor TLR5, dvoverižna RNA (dsRNA) pa TLR3. Receptor TLR9, ki ga izražajo pDC, aktivirajo nemetilirana zaporedja CpG, prisotna v bakterijski DNA (9).

Aktivacijski signali, ki so poleg omenjenih mikrobnih snovi, sposobni sprožiti zorenje DC, so tudi ligandi, izraženi na aktiviranih CD4<sup>+</sup> limfocitih T, predvsem ligand CD40 (CD40L) in molekule, ki jih celice izdelujejo v odzivu na vnetno poškodbo tkiva. Slednje so najpogosteje vnetni citokini npr. TNF- $\alpha$  in IL- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , ki ga sproščajo z virusi okužene celice, poleg tega pa tudi proteini celičnega stresa, npr Hsp-60 in Hsp-70 (Hsp; ang. *Heat shock protein*) (10).

Po uspešni aktivaciji DC z omenjenimi dejavniki se zmanjša njihova sposobnost privzemanja Ag iz okolice, močno pa se poveča površinsko izražanje molekul HLA in koncentracija kostimulacijskih molekul iz družine B7, CD80 (B7-1) in CD86 (B7-2) ter CD40, ki imajo vse pomembno vlogo pri aktivaciji limfocitov T, saj jim med drugim zagotovijo signal za izdelovanje IL-2. Samo zrele DC izražajo molekulo CD83. Med zorenjem pride tudi do morfoloških sprememb, ki se kažejo v reorganizaciji citoskeleta, izgubi adhezijskih sposobnosti in pridobitvi celične gibljivosti. Zrele DC tako za razliko od nezrelih niso

pritrjene, saj pridobijo številne izrastke na katerih so izraženi receptorji za kemokin CCR7, kar jim omogoča potovanje v najbližje bezgavke. Hkrati se v zrelih DC pospeši predelava Ag v peptide, ki se po vezavi na molekule HLA pojavijo na njihovi površini. V T-celičnih področjih bezgavk nato zrele DC limfocitom T učinkovito predstavijo antigene, ki so jih privzele v perifernih tkivih. S sproščanjem kemokinov, zrele DC poleg naivnih limfocitov T, v sekundarne limfatične organe usmerjajo tudi druge APC, npr. limfocite B. Limfociti B prepoznajo Ag po njihovi vezavi na B-celične receptorje (BCR). Po njihovem sočasnem stiku z aktiviranimi celicami T pomagalkami T<sub>H</sub> (ang. *Helper T cell*), se limfociti B pretvorijo v plazmatke, ki izdelujejo protitelesa, nato pa v spomske celice B (4).

Ugotovili so, da lahko v bezgavke, v odsotnosti vnetja ali okužbe, potujejo tudi nezrele DC. Te namreč v različnih tkivih privzemajo apoptotična telesa odmrlih celic, jih predelajo in se nato premaknejo v bližnje bezgavke, kjer povzročijo nastanek imunske neodzivnosti (tolerance) specifičnih klonov limfocitov T na lastne Ag. Takšni limfociti T se ob ponovnem srečanju z enakim Ag ne odzovejo več (11). Da lahko tovrstne t.i. tolerogene DC, v odsotnosti vnetnega procesa oziroma stimulacije preko receptorjev TLR, potujejo v sekundarna limfatična tkiva, je potrebna določena stopnja njihove aktivacije. To pomeni, da morajo na svojih površinah povečati izražanje kostimulacijskih molekul CD80/CD86, s čimer postanejo delno aktivirane. Ob tem pa povečajo proizvodnjo imunosupresivnega citokina IL-10 in sočasno zaustavijo izločanje provnetnega citokina IL-12, zato lahko pomembno vplivajo na aktivacijo regulatornih limfocitov T, Treg (12).

### 1.1.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PREŽIVETJE DC

Pomemben dejavnik, ki vpliva na uravnavanje imunskega odziva je preživetje DC. Tako zaščita DC pred apoptozo izboljša imunski odziv na tumorsko tkivo *in vivo*. Daljše preživetje DC v sekundarnih limfatičnih organih vpliva na trajanje predstavljanja Ag, kar je zelo pomembno za učinkovito aktivacijo limfocitov T (13). Ocenjena življenjska doba zrelih DC *in vivo* je sicer do 3 dni. Na njihovo podaljšano preživetje vplivajo signali, ki jih prejmejo v stiku z limfociti T. Poleg interakcije med molekulo CD40 in njenim ligandom CD40L, izraženim na limfocitih T, zavira apoptozo zrelih DC tudi povečano izražanje proteinov iz družine Bcl-2



(ang. *B cell lymphoma 2*). Njihov vpliv je opazen samo pri tistih DC, ki so se aktivirale preko receptorjev TLR. Izražanje molekul Bcl-2 zavira delovanje eksogenega IL-10 na DC in zmanjša nivo endogene sinteze tega citokina med zorenjem DC. Ugotovili so namreč da je dodani IL-10 po 12 oziroma 24 urah sprožil apoptozo DC, pripravljenih iz monocitov, ki so jih aktivirali z LPS. Pri tem je bil učinek endogenega IL-10 na hitrost njihove apoptoze po 24 urah od aktivacije z LPS, v primerjavi z učinkom eksogenega IL-10, bistveno manjši (14).

Poleg LPS, ki aktivira receptor TLR4, vpliva na daljšo življenjsko dobo zrelih DC, po vezavi na receptor TLR9, tudi DNA zaporedje CpG. Spontano apoptozo DC zavira tako, da statistično značilno poveča proizvodnjo protiapoptoznih proteinov Bcl-2 in Bcl-x<sub>L</sub> ter zmanjša izražanje aktivne kaspaze-3. Oba omenjena protiapoptozna mehanizma sta odvisna od aktivacije kinaze PI3K, saj njena inhibicija skrajša preživetje DC (15).

Tudi interakcija med molekulami RANKL (ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand*), izraženih na limfocitih T, in receptorji RANK (ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B*) na zrelih DC uravnava preživetje DC. Molekule RANKL ne izzovejo povečanega izražanja kostimulacijskih molekul, pač pa vzpodbudijo DC, da proizvajajo provnetne citokine, vključno z IL-12 (16). Receptorje RANK/ TRANCE (TRANCE; ang. *Tumor necrosis factor-Related Activation-Induced Cytokine Receptor*) izražajo tudi nezrele tkivne DC. Ugotovili so, da je sočasno izražanje obeh receptorjev na DC, pripravljenih iz CD34<sup>+</sup> predhodnikov povzročilo, da so v mediju, brez dodanih citokinov te celice preživele do 2 dni. Pravzaprav naj bi daljše preživetje zagotavljala interakcija TRANCE/RANK na isti celici, vendar pa pri tem niso izključene tovrstne medcelične interakcije (17).

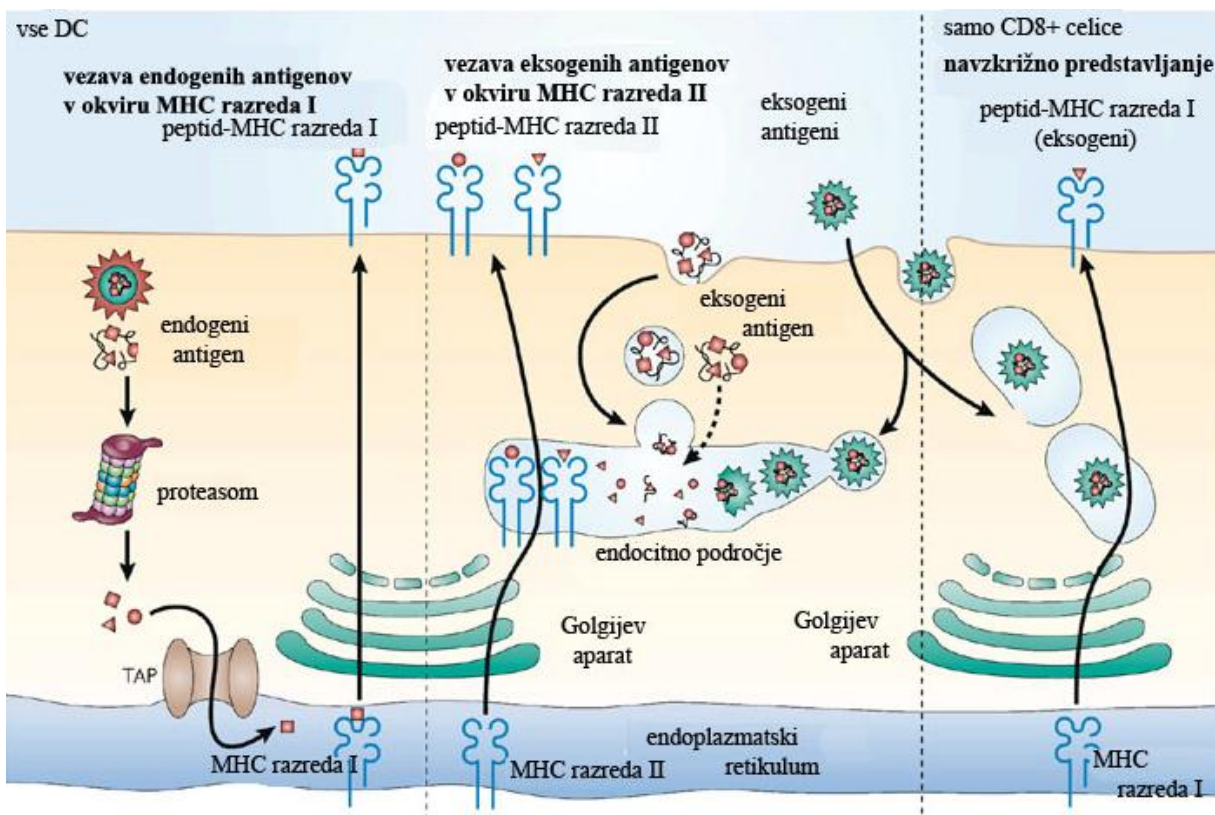
Da se lahko naivni limfociti T popolnoma aktivirajo morajo ostati kompleksi med DC in limfociti T v limfatičnem tkivu stabilni vsaj 2 dni. Življenjska doba DC je zato pomemben dejavnik, saj vpliva na število zrelih DC v T-celičnih področjih sekundarnih limfatičnih organov, s čimer uravnava obseg in moč imunskega odziva (18). Ugotovili so, da apoptoza DC omeji prepoznavanje in uničevanje tarčnih celic z antigensko specifičnimi efektorskimi citotoksičnimi CD8<sup>+</sup> limfociti T (CTL), po drugi strani pa njena inhibicija izrazito poveča učinek protitumorskih cepiv, pripravljenih na osnovi DC (19).

#### 1.1.4 VLOGA DC PRI AKTIVACIJI IN PROLIFERACIJI LIMFOCITOV T

Za DC bi lahko rekli, da vzorčijo svoje mikrookolje, saj limfocitom T v bezgavkah posredujejo informacije o razmerah v perifernih tkivih. Mirujoči limfociti T se aktivirajo s specifičnim prepoznavanjem v APC privzetih Ag, ki jih te razgradijo v kratke peptide in ki so nato vezani na molekule HLA. Molekule HLA razreda I vežejo peptide, ki izvirajo pretežno iz znotrajceličnih, endogenih Ag (normalni, fiziološko prisotni proteini, sestavine virusov in znotrajceličnih bakterij), molekule razreda II pa vežejo peptide, ki izvirajo pretežno iz zunajceličnih, eksogenih proteinov (normalni, fiziološko prisotni proteini, sestavine bakterij). Znotrajcelični proteini se v citoplazmi razgradijo v peptide s proteasomskimi encimskimi kompleksi in se, s prenašalcem TAP (ang. *Transporters Associated with Antigen Processing*), ki veže ATP, aktivno prenesejo skozi membrano zrnatega endoplazmatskega retikuluma (ER). Tu se s kalneksinom povezana molekula HLA I združi s prenašalcem TAP in v svoje vezavno mesto sprejme ustrezen peptid. Tako nastali kompleksi potujejo iz ER, preko Golgijevega aparata, na površino DC, kjer jih s svojim T-celičnim receptorjem (TCR, ang. *T-Cell Receptor*) prepoznajo ustrezni kloni CTL (20). Njihova glavna funkcija je specifično uničenje z virusom okuženih celic. Zunajcelični proteini pridejo v DC z endocitozo ali fagocitozo in se razgradijo v peptide s kislimi proteazami v endosomih. V ER nastale molekule HLA II imajo vezavna mesta za antigenske peptide zasedena z invariantno verigo (Ii) vse dokler ne prispejo do kisljih endosomov. Tu se invariantna veriga razcepi in v vezavno mesto se lahko vežejo antigenski peptidi. Tvrstni kompleksi se nato prenesejo na celično površino, kjer jih s svojimi TCR specifično prepoznajo ustrezni kloni CD4<sup>+</sup> celic T<sub>H</sub>. Poglavitna vloga celic CD4<sup>+</sup> T pomagalk je aktivacija drugih celic imunskega sistema (21).

Zmožnost predstavljanja zunajceličnih proteinov tudi v okviru molekul HLA I, uvršča DC med najučinkovitejše APC. To jim omogoča mehanizem navzkrižnega predstavljanja Ag (ang. *cross-priming* ali *cross-presentation*), ki je še posebej pomemben pri indukciji tolerance na lastne Ag in aktivaciji CTL v imunskem odzivu na viruse in s tumorji povezane antigene (22). Molekularne mehanizme navzkrižnega predstavljanja Ag lahko pojasnimo z dvema modeloma. Skladno s prvim naj bi se vsi koraki zgodili na nivoju fagosoma. Del zunajceličnih Ag naj bi se translociral v citosol, kjer naj bi se s proteasomskim encimskim kompleksom

razcepili v peptide. Ti pa se nato preko prenašalca TAP prenesejo v ER do nezasedenih molekul HLA razreda I. Drugi model pa predvideva, da se zunajcelični Ag internalizirajo v fagosome, sočasno pa se njihovemu lumnu približa ER, kar omogoči dostop antigenim peptidom do molekul HLA razreda I (23).



**Slika 2:** *Vežava antigenov v okviru molekul MHC razreda I in MHC razreda II (22).*

Za aktivacijo in proliferacijo naivnih limfocitov je poleg prvega specifičnega signala, ki nastane potem, ko TCR prepozna antigeni peptid vezan na ustrezno molekulo HLA, potreben še drugi signal. Tega zagotavlja interakcija med kostimulacijskimi molekulami (CD80, CD86), ki se nahajajo na površini DC, ter njihovimi ligandi, molekulami CD28, izraženimi na limfocitih T. Kostimulacijske molekule same po sebi ne morejo aktivirati limfocitov T do efektorske funkcije, zato pa bodisi ojačijo ali oslabijo specifični aktivacijski signal preko kompleksa TCR. Ker zrele DC konstitutivno izražajo velike količine molekul HLA razredov I in II, poleg tega pa tudi CD80 in CD86, so najučinkovitejše vzpodbujevalke

antigensko specifične proliferacije naivnih, efektorskih in spominskih limfocitov T. Kostimulacijski signal v limfocitih T izzove tudi izražanje molekul Bcl-x<sub>L</sub> in jih s tem zavaruje pred apoptozo (24). Za sprožanje aktivacije in pridobitev efektorskih funkcij limfocitov T so pomembne tudi takoimenovane dopolnilne molekule, ki povečajo občutljivost in trdnost interakcije med TCR in kompleksi molekul HLA-antigenski peptid. Pomembno adhezijsko interakcijo predstavlja vezava med T-celično površinsko molekulo CD2 in njenim ligandom, molekulo LFA-3 (CD58), izraženo na APC. K trdnosti tovrstnih medceličnih interakcij bistveno prispeva tudi vezava levkocitnega funkcijskega antigena LFA-1 (ang. *Leukocyte Function-Associated Antigen-1*) z medcelično adhezijsko molekulo ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecules-1*). Za razliko od interakcije CD2-LFA-3 traja ta dalj časa in je prisotna tudi na periferiji, zato je pomembna tudi za potovanje limfocitov skozi različna tkiva (25). Pri stabilizaciji vezave med TCR in kompleksom molekule HLA-antigenski peptid sodelujejo tudi koreceptorske molekule. Tako delujeta membransko izraženi molekuli CD4, na celicah T<sub>H</sub> in CD8, na CTL. Hitrejša aktivacija TCR s posredovanjem koreceptorjev CD4 oziroma CD8, je posledica dveh mehanizmov, in sicer fizične stabilizacije povezave med TCR in kompleksom molekula HLA-antigenski peptid ter posledične fosforilacije tirozinske kinaze Src, ki je vezana na citoplazemski del obeh koreceptorjev (26).

#### 1.1.5 VLOGA DC PRI DIFERENCIACIJI CD4<sup>+</sup> LIMFOCITOV T

Da proliferaciji sledi diferenciacija limfocitov T v ustrezne efektorske celice, ki nato potujejo v področje vnetja, je potreben še tretji signal. Zagotavljajo ga citokini, ki jih proizvajajo in izločajo imunske celice. Zrele DC na ta način usmerjajo imunski odziv CD4<sup>+</sup> limfocitov T v smeri T<sub>H</sub>1 ali T<sub>H</sub>2. Ti dve obliki celičnega imunskega odziva se razlikujeta v citokinih, ki jih izločajo diferencialno aktivirani limfociti T. Tako celice T<sub>H</sub>1 proizvajajo IL-2, IFN- $\gamma$  in TNF- $\beta$ , limfociti T<sub>H</sub>2 pa IL-4, IL-5, IL-6 in IL-10 (27). Razlike v citokinskih profilih T<sub>H</sub>1 in T<sub>H</sub>2 so povezane z njihovimi različnimi funkcijami. Medtem ko so limfociti T<sub>H</sub>1 vnetne celice, ki močno spodbujajo celično imunost preko dozorevanja in delovanja CTL, pa limfociti T<sub>H</sub>2 nudijo pomoč limfocitom B, da se pretvorijo v plazmatke in izdelujejo protitelesa. Citokini vrste T<sub>H</sub>2, zlasti IL-4 in IL-10 preprečujejo dolgotrajen odziv limfocitov

T<sub>H</sub>1, tako da preprečijo njihovo proizvodnjo IFN- $\gamma$  (28). Seveda pa velja tudi obratno, kar pomeni, da citokini vrste T<sub>H</sub>1 zavirajo imunski odziv T<sub>H</sub>2 (29).

#### 1.1.5.1 Vloga različnih citokinov pri polarizaciji imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1

Glavni citokin, ki ga izdelujejo aktivirane DC po stimulaciji z LPS, poli(I:C) ali CD40L, je IL-12 oziroma njegova aktivna oblika IL-12p70. Spodbuja proizvodnjo IFN- $\gamma$  v limfocitih T in je pomemben za nastanek celic vrste T<sub>H</sub>1. Dendritične celice proizvajajo velike količine IL-12p70 v prvih 10 urah po stimulaciji z LPS in nato dosežejo plato v 12-18 urah. Razpoložljivost IL-12 v bezgavkah je zato odvisna od stalnega dotoka zrelih DC, takoj po njihovi aktivaciji v vnetnem področju. V zgodnjih fazah imunskega odziva, ko v bezgavke prispejo večje količine aktiviranih DC, je diferenciacija limfocitov T usmerjena v odziv vrste T<sub>H</sub>1. Ko se DC izčrpajo, usmerjajo imunski odziv v smeri T<sub>H</sub>2, sčasoma tudi v smeri nepolariziranih limfocitov T (T<sub>H</sub>0), pri tem pa še vedno izražajo CCR7 in so zato udeležene pri nastanku osrednjega imunskega spomina (30).

V študijah *in vitro*, so zrele DC, ki so jih pripravili iz človeških monocitov, v 24-urah po aktivaciji s CD40L proizvajale velike količine IL-12. Z dodajanjem protiteles proti IL-12 se zmanjša delež imunskih celic, ki izdelujejo IFN- $\gamma$ , nasprotno pa dodajanje IL-12 v medij poveča število celic vrste T<sub>H</sub>1. Za pDC, ki favorizirajo odziv vrste T<sub>H</sub>2, pa izdelovanje IL-12 ni značilno. Nasprotno s pričakovanji so ugotovili, da aktivirane pDC, pripravljene iz plazmacitoidnih predhodnikov, proizvajajo IFN- $\alpha$ , citokin, ki spodbuja izločanje IFN- $\gamma$  pri ljudeh. Najverjetneje gre za proces, ki je podoben tistemu, v katerem z virusom aktivirani predhodniki pDC proizvajajo velike količine IFN- $\alpha/\beta$  in posledično diferencirajo v DC, ki nato spodbujajo naivne CD4<sup>+</sup> limfocite T, da proizvajajo tako IFN- $\gamma$  kot IL-10 (31).

Za IL-4 je znano, da je najmočnejši med citokini, ki lahko sprožijo imunski odziv vrste T<sub>H</sub>2. Vendar pa lahko IL-4 usmerja diferenciacijo CD4<sup>+</sup> limfocitov T tudi v smeri odziva vrste T<sub>H</sub>1. Ta mehanizem naj bi bil odvisen od IL-10, ki močno zavira sintezo IL-12. Ko so IL-4 dodali DC, gojenim v prisotnosti LPS, so povzročili zmanjšano izdelovanje IL-10, to pa je sovpadalo s povečano proizvodnjo IL-12. V živalskem modelu so nesporno pokazali, da je za indukcijo odziva vrste T<sub>H</sub>1 nujno potrebna inhibicija proizvodnje IL-10 z IL-4. Nasprotno kot

pri DC iz kostnega mozga in vranice, pa IL-4 po stimulaciji z LPS ni bil sposoben preprečiti nastajanja IL-10 v limfocitih B. Prav nasprotno, v tem primeru je celo povečal njegovo proizvodnjo in s tem usmeril imunski odziv v smer  $T_H2$ . Očitno sta tako prisotnost DC kot limfocitov B nujni za ravnovesje med celičnima odzivoma  $T_H1$  in  $T_H2$  v organizmu, in kar je še pomembneje, tudi za ustrezno uravnavanje proizvodnje citokinov, potrebnih za učinkovit imunski odziv (32).

#### *1.1.5.2 Ostali dejavniki, ki usmerjajo imunski odziv $T_H1/T_H2$*

Na diferenciacijo efektorskih limfocitov T v smeri odziva  $T_H1$  oziroma  $T_H2$  odziva vplivajo tudi drugi dejavniki, npr. količina antigena, narava in nivo kostimulacijskih molekul ter citokinski profil v mikrookolju. Pri tem so udeleženi tudi tisti citokini, ki jih DC proizvajajo v zgodnji fazi stimulacije limfocitov T. Vpliv DC na polarizacijo celic T so preučevali na miših, in sicer tako, da so primerjali tri fenotipsko in funkcionalno različne populacije DC iz kostnega mozga. Tiste, ki so jih gojili v prisotnosti GM-CSF in IL-4 so izražale velike količine molekul CD80/CD86 in MHC razreda II ter proizvajale malo IL-12p70, s tem pa spodbujale celični imunski odziv vrste  $T_H2$ . Za nastanek celičnega imunskega odziva vrste  $T_H1$  pa je bila odločilna prisotnost GM-CSF in IL-15, ki sta povzročila, da so DC izdelovale velike količine IL-12p70 in IFN- $\gamma$  ter malo ali nič citokinov značilnih za profil  $T_H2$ . Tiste populacije DC, ki so jih gojili le v prisotnosti GM-CSF, pa kljub izdelovanju velikih količin IL-12p70, niso izzvale T-celične polarizacije. Zato so sklepali, da za nastanek odziva vrste  $T_H1$ , samo izdelovanje IL-12p70 ni dovolj (33).

Nezrele DC ne zmorejo izzvati učinkovitega imunskega odziva in zato niso primerne za protitumorska cepiva. Zrele DC, ki jih pripravimo iz človeških monocitov (moDC) z aktivacijo s poli(I:C) ali s sproženjem CD40, pa imajo fenotip, ki spodbuja imunski odziv vrste  $T_H1$ . Poli(I:C) povzroči povečano proizvodnjo citokina IFN- $\gamma$ , zmanjša tvorbo IL-5 ter ohrani nespremenjene nivoje IL-10. Podobne rezultate so dobili tudi z zorenjem nezrelih moDC po aktivaciji CD40, le da se v tem primeru izdelovanje IL-5 ni izrazito spremenilo. Poli(I:C) tudi učinkovito spodbuja izdelovanja aktivnega IL-12p70 v bezgavkah. Ugotovili so, da imunski odziv vrste  $T_H1$  ni več prevladoval, ko so moDC, dozorenim s poli(I:C) dodali

IFN- $\gamma$ , saj so s tem zavrli sintezo IL-12 in povečali proizvodnjo IL-10. Zaenkrat še ni povsem jasno, ali IFN- $\gamma$  pomembneje vpliva na nivo IL-12 ali IL-10. Vsekakor pa je IL-10 pomemben citokin, ki v pogojih izrazitega vnetnega dražljaja omejuje imunski odziv vrste  $T_H1$  (34).

Kot smo že omenili, vpliva na različno diferenciacijo limfocitov T tudi količina prisotnega antigena, ki izzove imunski odziv. S pomočjo živalskega modela so ugotovili, da uporaba imunogenega antigena v nizkih koncentracijah v večji meri vzpodbuja imunski odziv vrste  $T_H2$ , v srednjih odmerkih pa  $T_H1$  (35).

Nenazadnje pa vpliv DC na polarizacijo imunskega odziva uravnavajo tudi aktivirani limfociti T v bezgavkah in drugje na periferiji. Tako tiste DC, ki sicer spodbujajo imunske odzive vrste  $T_H1$ , v pogojih, ko so izpostavljene IL-10 ali rastnemu dejavniku TGF- $\beta$  (ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$* ), izzovejo odziv celic  $T_H2$ . Nasprotno pa deluje IFN- $\gamma$ , ki povzroči diferenciacijo limfocitov v smeri  $T_H1$ . Ti rezultati so skladni z ugotovitvijo, da potrebujejo DC za vzpodbuditev proliferacije in ustrezne polarizacije  $CD4^+$  limfocitov T različno mikrookolje. Tiste DC, ki izvirajo iz Peyerjevih zaplat v črevesju ali iz respiratornega trakta, praviloma sprožijo imunske odzive vrste  $T_H2$ , medtem ko povzročijo tiste iz vranice polarizacijo  $T_H1/T_H0$ . Na ta način lahko tudi pojasnimo vpliv, ki ga ima pot vnosa antigena v telo na vrsto imunskega odziva, saj inhalirani antigeni izzovejo imunski odziv vrste  $T_H2$ , injicirani subkutano pa odziv  $T_H1$  (36).

## 1.2 PRIPRAVA ČLOVEŠKIH DENDRITIČNIH CELIC *in vitro*

Zaradi svoje edinstvene sposobnosti, da uravnavajo delovanje imunskega sistema, so postale DC pomembno terapevtsko sredstvo za zdravljenje rakavih obolenj. Pri pripravi protitumorskih cepiv iz DC, so raziskovalci naleteli na več težav. Med njimi izstopajo predvsem: identifikacija in zagotavljanje imunogenih, s tumorji povezanih antigenov TAA, način njihovega vnosa v DC ter priprava zadostnih količin ustrezno aktiviranih DC. Raziskovanje lastnosti DC in njihove vloge v imunskem sistemu je dolgo časa omejeval njihov majhen delež v telesu. Za pripravo zadostnega števila stabilnih DC, namenjenih terapiji, so uspeli razviti standardizirane in optimizirane postopke, ki nam danes omogočajo

oblikovanje takih populacij DC, ki se med seboj razlikujejo v homogenosti, sposobnosti za aktivacijo limfocitov, naboru proizvedenih citokinov ter v njihovi encimski aktivnosti (37).

### 1.2.1 DIFERENCIACIJA NEZRELIH DC

V zadnjem času se za pripravo nezrelih DC uporabljajo bodisi CD34<sup>+</sup> predniške celice iz kostnega mozga, ali pa monociti, osamljeni iz venske krvi (38). Delež CD34<sup>+</sup> celic med mononuklearnimi celicami v kostnem mozgu je 1%, med perifernimi enojedrnimi celicami v venski krvi (PBMC; ang. *Peripheral Blood Monocyte Cells*), brez predhodne mobilizacije, pa komaj 0,1%. Najlažje dostopen vir predniških celic, ki omogoča pripravo večjega števila DC so zagotovo monociti, zato jih danes uporabljajo v večini postopkov (39).

Sallusto in Lanzavecchia sta že leta 1994 objavila postopek za pripravo DC iz človeških monocitov, in sicer v gojišču z dodanima GM-CSF in IL-4. Po približno 7-ih dneh gojenja sta v kulturi opazila 50-80% posamezno plavajočih celic ali rahlo pritrjenih celičnih skupkov. Gojene celice so imele značilno obliko DC in zmožnost premikanja. Izražale so molekule CD1a, CD1b in CD1c, ne pa tudi molekul CD14, ki so značilne za monocite (39). V primerjavi z monociti, iz njih pripravljene DC učinkoviteje stimulirajo limfocite T. Tako pripravljene nezrele DC pa izgubijo svoje značilne lastnosti in pridobijo fenotip, značilen za makrofage, če medij z GM-CSF in IL-4 zamenjamo z gojiščem brez teh dveh citokinov (37). Tudi v gojiščih, ki so vsebovala bodisi samo GM-CSF, IL-4 ali TNF- $\alpha$  so celice postale podobne makrofagom. V sočasni prisotnosti GM-CSF in TNF- $\alpha$  pa niso več izražale molekul CD14 in so vsaj deloma izražale molekule CD1a, vendar pa so v primerjavi s tistimi, pripravljenimi v gojišču z GM-CSF in IL-4, veliko slabše stimulirale proliferacijo alogenskih limfocitov T. Tako je nastal optimiziran klasičen postopek za pripravo nezrelih DC iz monocitov za eksperimentalne namene, in sicer v gojišču RPMI z dodatkom 10% fetalnega govejega seruma (FBS; ang. *Fetal Bovine Serum*), GM-CSF in IL-4. Zaradi potencialne imunogenosti in možnosti prenosa prionov in virusov, lahko FBS nadomestimo s človeško plazmo, serumom, seumskim albuminom ali pa celice gojimo v posebej za ta namen izdelanih brezserumskih gojiščih. Taki načini priprave DC so zahtevnejši, saj so izkoristki manjši, delež



pritrjenih celic večji, nezrele DC pa niso homogene, saj se med seboj razlikujejo v obsegu izražanju molekul CD1a in CD86 (39).

Danes vemo, da je GM-CSF nujno potreben za preživetje monocitov in njihovo diferenciacijo, medtem ko IL-4 spodbudi nastanek nezrelih DC tako, da prepreči diferenciacijo monocitov v makrofage. Uporaba GM-CSF in IL-4 je zelo učinkovita zaradi visokega donosa in homogenosti nastalih nezrelih DC, še posebej takrat, ko kot izhodne celice uporabimo monocite, osamljene iz levkaferoznih pripravkov (40). Obermeier in sod. so razvili postopek, s katerim lahko že v 24 urah pripravijo nezrele DC, ki so sposobne učinkovito privzemati antigene. Sposobnost njihove endocitoze so preverjali tako, da so monocitom v medij poleg GM-CSF in IL-4 dodali še z barvilom FITC (ang. *Fluorescein Isothiocyanate*) konjugiran dekstran, in sicer na začetku gojenja ter po 12, 24 in 48 urah gojenja. Ugotovili so, da so celice že po 24 urah povečale privzem dekstrana za do 10-krat. Tako so dokazali, da lahko močno skrajšamo čas priprave nezrelih in s tem tudi zrelih DC, ne da bi s tem bistveno vplivali na njihov fenotip ali funkcijo (41).

Za pripravo DC iz monocitov so se kot primerna zamenjava za IL-4 izkazali tudi številni drugi citokini, in sicer zato, ker je veriga  $\gamma$  receptorja za IL-2 (IL-2R $\gamma$ ) poleg tega, da je sestavni del receptorja za IL-4, skupna tudi receptorjem za IL-7, IL-9 in IL-15. Vsi omenjeni citokini spodbudijo diferenciacijo monocitov v DC, ki so morfološko, fenotipsko in funkcijsko podobne tistim, pripravljenim z GM-CSF in IL-4. V primeru, ko so DC pripravili z GM-CSF in IL-7, je slednji izzval izražanje molekul CD32 (človeški receptor Fc $\gamma$ RII) in CD21 (receptor za C3d fragment komplementa) (28). Mohamdzadeh in sod. so primerjali diferenciacijo DC iz monocitov z GM-CSF in IL-4 ter z GM-CSF in IL-15. V gojišču z GM-CSF in IL-15 je sicer prišlo do diferenciacije v nezrele DC, vendar je bilo v kulturi približno 40% takih DC, ki so izražale E-kadherin, langerin in kemokinski receptor CCR6. To pa so fenotipske lastnosti, ki so značilne za LC, vendar pa omenjene celice ne izražajo Birbekovih granul. Zanimivo pa je, da so spodbudile proliferacijo CD8<sup>+</sup> limfocitov T, medtem ko nezrele DC pripravljene z GM-CSF in IL-4 tega niso bile sposobne (42).

Pomembno vlogo pri diferenciaciji in aktivaciji DC ima tudi IFN- $\alpha$ . DC pridobljene iz monocitov s klasičnim postopkom, naj bi namreč v pogojih *in vivo* kazale spremenjeno sposobnost migracije. Zato so se odločili za pripravo DC v prisotnosti IFN- $\alpha$ , ki nastaja v

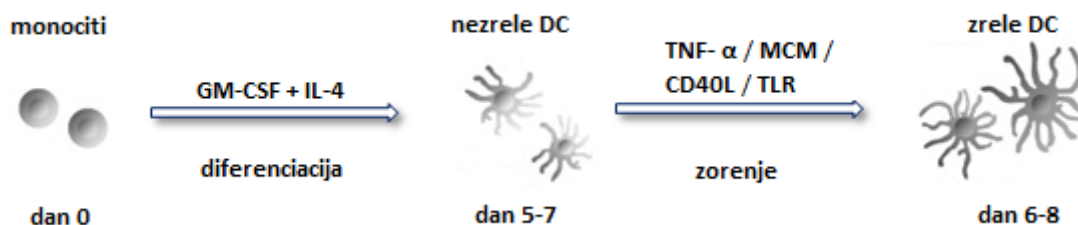
(pato)fizioloških pogojih v odzivu na infekcijo in vnetje. Zaradi tega naj bi IFN- $\alpha$  zagotovil ustrezne vnetne signale in skupaj z GM-CSF inducirala diferenciacijo monocitov v DC. Ko so ga uporabili v tej kombinaciji, celice že po 3 dneh gojenja niso bile več pritrjene na dno gojilne posode in so v gojišču tvorile velike skupke. V tem času so izrazito povečale izražanje površinskih molekul HLA-DR, CD80, CD86 in CD40 ter adhezijskih molekul ICAM (CD54) (40). V gojišču z GM-CSF in IFN- $\alpha$  pripravljene DC, so bile delno zrele. Njihov fenotip je kazal kombinirane značilnosti mieloidnih in plazmacitoidnih DC ter celic NK. Proizvajale so številne citokine, značilne za imunski odziv vrste T<sub>H</sub>1 ter TNF- $\alpha$ , vendar pa so jih v večji meri proizvajale šele po stimulaciji z ustreznimi ligandi TLR. Izdelovanje protivnetnih citokinov, kot sta IL-10 in antagonist receptorjev IL-1 (IL-1Ra), pa je bilo manjše, zato tovrstne DC verjetno slabše zaviralno uravnavajo presežek protivnetnih citokinov (43).

Dendritične celice, pripravljene v prisotnosti GM-CSF in interferonov tipa I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  in IFN- $\omega$ ), imajo kratko življenjsko dobo, saj hitro podležejo apoptozi. Buelens in sod. so opisali diferenciacijo monocitov v nezrele DC tudi v primeru sočasne uporabe IFN- $\beta$  in IL-3. Pri tem je IL-3 povečal preživetje monocitov v gojišču, IFN- $\beta$  pa vplival na njihovo diferenciacijo v DC. V mediju, ki je vseboval le IFN- $\beta$  je bilo namreč več kot 90% monocitov apoptotičnih, ob sočasni prisotnosti IL-3 pa se je njihovo preživetje močno izboljšalo, saj je bilo na 6. dan gojenja več kot 65% celic še vedno živih. Tako pripravljene DC, v primerjavi s tistimi, ki jih diferenciramo z GM-CSF in IL-4, izražajo manj molekul CD1a, obenem pa več receptorjev za IL-3 (CD123), molekul HLA-DR, CD80 ter CD86 in imajo slabšo sposobnost za endocitozo. Ugotovili so tudi, da na podoben način kot IFN- $\beta$  deluje tudi IFN- $\alpha$ , saj prav tako povzroči povečano izražanje molekul CD80 in CD86 na površini DC (44).

### 1.2.2 PRIPRAVA ZRELIH DC

Priprava zrelih DC iz monocitov *in vitro* poteka v dveh stopnjah. Po 5-7 dneh gojenja v prisotnosti GM-CSF in IL-4 nastanejo nezrele DC, ki so še nepravilnih oblik in po lastnostih ustrezajo perifernim DC v mirujočem oziroma stacionarnem stanju. Ko jih nato izpostavimo dejavnikom zorenja, pridobijo lastnosti, značilne za zrele DC. V kulturah so te nepritrjene in

imajo dolge, zavesaste izrastke, in tudi po tem, ko jih prenesemo v gojišče brez vnetnih citokinov, ohranijo svoj fenotip. Zorenje oziroma aktivacija nezrelih DC je kompleksen proces. Pomembno je, da se nezrele DC, ki so specializirane za privzemanje antigenov, med tem procesom spremenijo v celice, ki na svojih površinah učinkovito predstavljajo antigene vezane na molekule HLA in zaradi izražanja kostimulacijskih molekul ter proizvodnje provnetnih citokinov, učinkovito aktivirajo naivne limfocite T (39).



**Slika 3:** Shematski prikaz diferenciacije DC iz monocitov v nezrele DC in priprava zrelih DC z različnimi dejavniki zorenja *in vitro* (45).

Za pripravo zrelih DC uporabljamo različne topne dejavnike, med katere sodijo naprimer: mešanica provnetnih citokinov IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ , efektorske molekule imunskega odziva, kot so CD40L in ligandi za različne TLR, LPS, DNA zaporedje CpG, poli(I:C) in drugi (46). Da bi povečali imunogenost DC, jih običajno zorimo 48 ur ali več. Z monociti kondicionirano gojišče (MCM), ki vsebuje mešanico citokinov, največkrat IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ , je učinkovitejši aktivator DC kot sam TNF- $\alpha$ . Za dozorevanje DC se veliko uporablja tudi gojišče MCM, ki mu dodajo PGE<sub>2</sub>, kar v strokovni literaturi pogosto omenjajo kot standardni koktejl. PGE<sub>2</sub> povzroči, da DC na svojih površinah močneje izražajo molekule CCR7 in s tem pridobijo večjo sposobnost migracije v bezgavke. Po drugi strani pa PGE<sub>2</sub> močno zavira proizvodnjo IL-12 in zato zmanjšuje celični imunski odziv vrste T<sub>H</sub>1 (47). Za imunsko terapijo z DC pa sta prav njihova migracija in proizvodnje provnetnih citokinov tisti lastnosti, ki sta ključni za indukcijo obsežnega in učinkovitega imunskega odziva. Z razvojem novih postopkov, v katerih uporabljajo PGE<sub>2</sub> v kombinaciji z izbranimi ligandi TLR, so

dosegli, da lahko pripravimo zrele DC z visoko migracijsko zmogljivostjo, ki poleg tega obdržijo sposobnost izdelovanja velikih količin IL-12. Kot ligand TLR pogosto uporabljajo poli(I:C), ki oponaša dvojnoverižno virusno RNA (dsRNA) in v zrelih DC močno vzpodbuja proizvodnjo IL-12p70. Pri tem pa je zanimivo, da je sposobnost proizvodnje IL-12p70 v DC, ki jih predhodno dozorejo s kombinacijo poli(I:C) in PGE<sub>2</sub>, v prisotnosti alogenskih limfocitov ali po stimulaciji s CD40L, praktično povsem enaka kot v tistih, ki jih aktivirajo samo s poli(I:C) (48).

Z zorenjem nezrelih moDC samo s poli(I:C), lahko torej pripravimo homogeno populacijo DC, s fenotipom, značilnim za zrele oziroma aktivirane DC. Take celice povečajo obseg izdelovanja IL-12 in IL-10, nivoji nastalega IL-23 pa se bistveno ne spremenijo. Po njihovi stimulaciji s CD40L se je izdelovanje omenjenih citokinov še povečalo, in sicer pri IL-12 za 2-krat, pri IL-10 za 3-krat ter kar za 20-krat pri IL-23. Vpliv dodatne aktivacije zrelih DC s CD40L na njihovo sposobnost imunske stimulacije so preučevali s testom MLR (ang. *Mixed Lymphocyte Reaction*), v katerem so jih v različnih razmerjih gojili skupaj z alogenskimi CD4<sup>+</sup> limfociti T kot odzivniki. Zrele DC so najbolj spodbudile proliferacijo CD4<sup>+</sup> celic T takrat, ko je bilo njihovo medsebojno razmerje 1:10. Ugotovili so tudi, da so DC, dozorene s poli(I:C), v kokulturah s CD4<sup>+</sup> celicami T izdelovale tudi več IFN- $\gamma$ , količina proizvedenega IL-5 pa se je zmanjšala (34).

Da bi izboljšali učinkovitost protitumorskih cepiv na osnovi DC za bolnike s kronično limfocitno levkemijo (KLL) in drugimi podobnimi oblikami raka s slabo opredeljenimi TAA, so primerjali funkcijske lastnosti DC, ki so jih dozoreli v dveh različnih mešanicah citokinov. Nezrele DC, pripravljene iz monocitov bolnikov s KLL, so inkubirali bodisi s standardno citokinsko mešanico, ki je vsebovala IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  in PGE<sub>2</sub> (sDC) ali pa s kombinacijo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  in poli(I:C). Z uporabo slednje kombinacije so uspeli pripraviti t.i. tip  $\alpha$  DC ( $\alpha$ DC1), ki izrazito polarizirajo limfocite T v smer imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1. Izkazalo se je, da  $\alpha$ DC1 na svojih površinah izražajo precej več kostimulacijskih molekul, ob tem pa je količina molekul CCR7 manjša kot v primeru sDC. Celice  $\alpha$ DC1 v primerjavi z sDC proizvajajo tudi znatno več IL-12p70 (10 do 60- krat), in sicer tako med samim zorenjem kot tudi v odzivu na stimulacijo s CD40L. Zorenje DC v prisotnosti IFN- $\gamma$  in odsotnosti PGE<sub>2</sub> naj bi v primeru  $\alpha$ DC1 preprečilo nastanek izčrpanih DC, kar se je pokazalo v povečani

spodobnosti tako pripravljenih zrelih DC, da izdelujejo IL-12p70 tudi potem, ko pridejo v stik z limfociti T. To je še posebej pomembno za imunsko terapijo, kjer morajo zrele DC priti od mesta injiciranja do bezgavk, ob tem pa še vedno ohraniti sposobnost izdelovanja IL-12. Čeprav imajo tako sDC in  $\alpha$ DC1, podobne sposobnosti privzemanja antigenov, pa so slednje ( $\alpha$ DC1) v povprečju 20-krat učinkovitejše pri vzpodbujanju nastanka efektorskih CTL (49).

S simulacijo potovanja monocitov preko endotelija v limfne žile v eksperimentalnem modelu *in vitro* so pokazali, da njihova subpopulacija v 48 urah po migraciji diferencira v DC. Da bi skrajšali čas in stroške priprave DC iz monocitov, so z *in vitro* posnemanjem različnih pogojev razvili postopek, ki dejansko omogoča hitrejšo pripravo zrelih DC. Monocite so najprej 24 ur gojili v prisotnosti GM-CSF in IL-4, nato pa še nadaljnih 24 ur v standardni citokinski mešanici. Pri tem so ugotovili, da je IL-1 $\beta$  zelo pomemben za aktivacijo, saj skupaj s PGE<sub>2</sub> inducira nastanek zrelih DC, njegova odstranitev iz medija pa je povzročila tudi izrazito zmanjšanje proizvodnje IL-12. Tako pripravljene zrele DC so nato primerjali s tistimi, za katere so uporabili standardni postopek zorenja, torej 6-dnevno gojenje monocitov v gojišču z GM-CSF in IL-4, nato pa še nadaljno 24-urno inkubacijo s standardno citokinsko mešanico. Dendritične celice, ki so jih pripravili s hitrim postopkom so bile po privzemu antigena TT (ang. *Tetanus Toxoid*) in aktivaciji s CD40L enako učinkovite pri sproženju proliferacije avtolognih limfocitov T kot tiste, ki so jih pridobili s standardnim postopkom. Obe vrsti DC sta imeli tudi podobno sposobnost izdelovanja IFN- $\gamma$  (50).

### 1.3 IMUNSKA TERAPIJA RAKA Z DC

Dendritične celice, pripravljene iz monocitov (moDC), se vse pogosteje uporabljajo za imunsko terapijo raka. Glavni namen tovrstnega, za enkrat še eksperimentalnega zdravljenja, je aktivacija specifičnega protitumorskega imunskega odziva, zlasti z nastankom bolnikovih efektorskih limfocitov T, ki lahko zmanjšajo velikost tumorske mase, in nato s pojavom tumorsko specifičnih spominskih limfocitov T (51). Možnost uporabe DC kot celičnih cepiv za imunsko terapijo raka so do sedaj preizkusili v številnih kliničnih študijah, največkrat v fazah I in II. Ugotovili so, da je uporaba tovrstnih cepiv varna in da DC učinkovito

predstavljajo TAA, kar izzove bolj ali manj obsežne, klinično potencialno protitumorske imunske odzive. Še vedno pa obstaja preveč dejavnikov, ki zaenkrat onemogočajo njihovo uvedbo v redno klinično prakso. Zato bo potrebno opraviti še vrsto dodatnih, razvojno-raziskovalno usmerjenih predkliničnih in kliničnih študij s ciljem, da se ugotovi kateri podtip DC je najučinkovitejši in kakšni so optimalni pogoji in aktivacijski signali za njihovo pripravo. Poleg tega bo potrebno določiti tudi najboljši način aplikacije tovrstnih cepiv, optimalno količino DC v posameznem odmerku ter število in pogostost injiciranj. V splošnem pa lahko že zdaj trdimo, da je uporaba DC za predstavljanje tumorskih antigenov in aktivacijo specifičnih klonov limfocitov T, ki jih specifično prepoznavajo, varna in klinično potencialno učinkovita (52). Zaradi učinkovitejše oziroma popolnejše aktivacije imunskega odziva se pri pripravi DC osredotočamo na zrele DC, saj nezrele DC zaradi šibkejšega izražanja molekul HLA, CD80 in CD86, v večji meri izzovejo nasproten učinek, torej imunsko toleranco (53).

### 1.3.1 UGOTAVLJANJE IMUNSKEGA ODZIVA PO APLIKACIJI DC

Tako v številnih raziskavah *in vitro* kot tudi v kliničnih študijah so večino pozornosti usmerili v proučevanje odziva limfocitov T na zrele DC, opremljene s TAA, še zlasti v nastanek protitumorskih efektorskih CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocitov T (CTL). Na splošno lahko odzive celic T razdelimo v zgodnje, srednje in pozne. Za njihov zgodnji odziv sta značilna zvišana znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup> ionov in fosforilacija signalnih proteinov. Temu sledijo degranulacija znotrajceličnih granul ter celično posredovana citotoksičnost in izločanje citokinov. V poznem odzivu pa pride do proliferacije oziroma klonske ekspanzije limfocitov T, njihove apoptoze in z aktivacijo povezane celične smrti. Še najbolj zanimivo je preučevanje procesov srednjega odziva. Vrsta citokinov, ki jih proizvajajo limfociti T, je namreč odvisna od stopnje njihove diferenciacije. Tako je določanje koncentracij IFN- $\gamma$  postalo nekakšen standard za potrditev specifičnega protitumorskega imunskega odziva limfocitov T po aplikaciji cepiv, pripravljenih na osnovi DC (54). Tako aktivirani limfociti CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> kakor tudi celice NK, izločajo IFN- $\gamma$ , kar posledično sproži aktivacijo makrofagov ter celic NK ter preprečuje nastanek imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>2. Ker je IFN- $\gamma$  osrednji provnetni citokin, ki ga izdelujejo efektorski limfociti T, je njegovo določanje nedvomno pomembno za

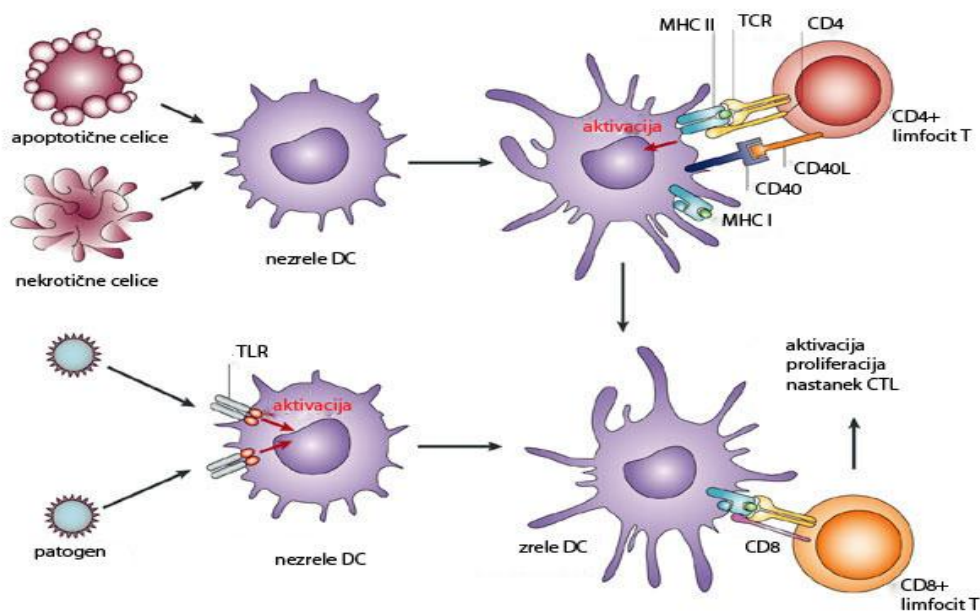
spremljanje obsega antigensko specifičnega celičnega imunskega odziva. Koncentracije IFN- $\gamma$  najpogosteje ugotavljamo v celičnih kulturah s testom ELISPOT (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay*), lahko pa jih izmerimo tudi v supernatantu celičnih kultur s pomočjo testa ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (55).

Pri terapiji z DC je še posebej pomembno vrednotenje protitumorskega imunskega odziva med in po koncu tovrstnega zdravljenja. Poleg določanja IFN- $\gamma$  običajno spremljajo tudi obseg nastanka antigensko specifičnih efektorskih CTL. V primerih, ko za zdravljenje kot antigene uporabijo znane, za tumorje značilne peptide ali proteine, lahko nastanek in količino zanje specifičnih klonov CTL določijo s pretočno citometrijo, potem, ko se na njihove TCR specifično vežejo fluorescenčno označeni tetrameri oziroma multimeri definiranih molekul HLA. Gre za polimere istovrstnih molekul HLA, na katere se dobro veže izbrani antigenski peptid. Medtem ko je interakcija med monomernimi molekulmi HLA in TCR premalo stabilna, pa je vezava fluorescenčno označenih multimerov HLA dolgotrajna in omogoča analizo antigensko specifičnih limfocitov T s pretočnim citometrom. S tem pristopom lahko torej ugotavljamo tudi prisotnost ustreznih klonov naivnih limfocitov T, za razliko od postopkov določanja IFN- $\gamma$ , ki ga lahko zaznamo le v primeru predhodno antigensko aktiviranih efektorskih in spominskih limfocitih T (56).

### 1.3.2 NASTANEK EFEKTORSKIH CD8<sup>+</sup> CITOTOKSIČNIH LIMFOCITOV T (CTL)

Kloni naivnih CD8<sup>+</sup> limfocitov T se po ustrezni antigensko specifični aktivaciji diferencirajo v efektorske CTL. V celično posredovanem imunskem odzivu so nepogrešljivi tako pri odstranjevanju celic, ki so okužene z znotrajceličnimi patogeni, kot tudi tistih, ki so tumorsko spremenjene. Zaenkrat še ni povsem jasno, v kolikšni meri je aktivacija CTL odvisna od prisotnosti efektorskih CD4<sup>+</sup> limfocitov T. Vemo pa, da imata pri tem velik pomen stopnja zrelosti in polarizacija DC kot APC (57). S poskusi *in vivo* so pokazali, da je pri tistih oblikah raka, kjer vnetje ni prisotno, za učinkovito aktivacijo CTL nujno potrebno, da obe vrsti limfocitov T (CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup>) prepoznata antigenske epitope v kontekstu molekul HLA razredov II in I sočasno, na isti APC. Dendritične celice predstavljajo CD4<sup>+</sup> limfocitom T fagocitirane antigene, ki izvirajo iz nekrotičnih ali apoptotičnih tumorskih celic. Tiste DC, ki

se pri tem aktivirajo preko interakcije s CD40L, izraženimi na CD4<sup>+</sup> celicah T, pa nato spodbudijo antigensko specifični odziv CD8<sup>+</sup> limfocitov T, kar vodi v nastanek efektorskih CTL in spominskih celic T. Nasprotno pa potreba po prisotnosti CD4<sup>+</sup> limfocitov T ni nujna takrat, ko DC neposredno aktivirajo tisti patogeni, ki vsebujejo ligande za vezavo na TLR ali pa sproščajo vnetne citokine, kot so IL-1 ali interferoni tipa I. Ne glede na mikrookolje, v katerem se nahajajo DC, pa je uspešen oziroma popoln odziv na nivoju CTL vedno odvisen od pomoči CD4<sup>+</sup> limfocitov T, saj brez te ne pride do nastanka funkcionalnih spominskih celic CD8<sup>+</sup> celic z dolgo življenjsko dobo, ki se lahko zelo hitro odzovejo na ponovno srečanje z enakim antigenom (58).



**Slika 4:** Aktivacija CTL v prisotnosti oziroma odsotnosti CD4<sup>+</sup> limfocitov T (58).

Za uspešno diferenciacijo v efektorske CTL je potrebna določena mejna koncentracija IL-2. Ugotovili so, da IL-2 v neoptimalni koncentraciji in IL-15 sicer spodbujata proliferacijo CD8<sup>+</sup> limfocitov T in njihovo izdelovanje IFN- $\gamma$ , vendar pa nista sposobna izzvati njihove popolne diferenciacije v funkcionalne efektorske CTL. Fenotip takšnih celic je podoben sistemu, ki je značilen za spominske CD8<sup>+</sup> limfocite T. Za nastanek efektorskih CTL naj bi



bila bistvena neposredna interakcija med CD8<sup>+</sup> limfociti T in kostimulacijskimi molekulami, CD80 ali CD86, izraženimi na APC, kar so ugotovili v živalskem modelu *in vivo* (24).

Število efektorskih CTL, ki nastanejo po antigenski aktivaciji, je pomemben dejavnik, saj bi lahko njihov presežek namesto odstranitve antigenov, povzročil neželene kolateralne poškodbe tkiv. Naraščanje števila efektorskih CD8<sup>+</sup> celic T povezujejo s količino prisotnega antigena in številom APC, ki ga predstavljajo (59, 60).

### 1.3.3 PRIPRAVA CEPIV NA OSNOVI DC

Za doseganje želenih kliničnih učinkov je pri pripravi optimalnih cepiv na osnovi DC za zdravljenje raka potrebno izbrati tudi primerne, za tumorje značilne antigene (TAA). Tumorske celice lahko namreč izražajo raznolik nabor TAA, ki pa niso vsi enako imunogeni in stabilni (61). Za pripravo DC, ki na svojih površinah predstavljajo TAA, je na voljo več pristopov. V velikem številu do sedaj izvedenih kliničnih študij so uporabili TAA v obliki dobro definiranih kratkih peptidov, sestavljenih iz 8-10 aminokislin, ki pa se lahko z veliko afiniteto neposredno vežejo le na točno določene alelske različice molekul HLA razreda I. Ker so odkrili že veliko imunogenih tumorskih epitopov, omogoča tak pristop poceni in hitro pripravo sinteznih antigenskih peptidov, ki jih lahko po potrebi tudi modificiramo. Njihova uporaba pa je seveda omejena na zdravljenje tistih rakavih obolenj, kjer so TAA dobro definirani. Poleg tega vsi tumorji ne izražajo takšnih TAA, ki bi vsebovali ustrezne kratke peptide, ki bi se lahko učinkovito vezali in so zato primerni za uporabo le pri tistih bolnikih, ki imajo ustrezen nabor specifičnih alelskih različic molekul HLA. Namesto kratkih peptidov lahko kot vir tumorskih antigenov uporabimo tudi daljše peptide (> 25 aminokislin) ali kar cele tumorske proteine. Slednji vsebujejo epitope, ki jih lahko prepoznajo tako CD4<sup>+</sup> kot CD8<sup>+</sup> limfociti T, potem ko jih DC predelajo v krajše peptide in jih, vezane na ustrezne molekule HLA predstavijo na svojih površinah. Tak pristop zagotavlja podaljšano navzkrižno predstavljanje peptidov, to pa omogoča uspešnejšo interakcijo DC s protitumorsko specifičnimi kloni limfocitov T (62).

V kolikor želimo bolj obširen imunski odziv na številne TAA, še posebej pa takrat, ko tumorskih antigenov ne poznamo, lahko za njihov vir uporabimo kar same tumorske celice

(TC) oziroma njihove lizate ali pa s fuzijo DC in TC pripravimo imunohibridome (63). Ob tem, da lahko ustrezno aktivirane DC tako opremimo s celotnim možnim naborom specifičnih TAA, pa obstaja tudi velika verjetnost, da bodo poleg teh, limfocitom T predstavljale tudi običajne, normalne, telesu lastne antigene. Zato v takšnih primerih vedno obstaja povečana verjetnost za nastanek kakšne avtoimunske reakcije (64). V zadnjem času se kot vir TAA pri izdelavi protitumorskih cepiv na osnovi DC vse pogosteje uporabljajo tudi iz tumorskih celic osamljene molekule DNA in RNA. Po njihovi transfekciji se v DC začnejo sintetizirati proteini, ki se nato v obliki peptidov preferenčno vežejo na molekule HLA razreda I, kar omogoča nastanek specifičnih protitumorskih CTL tako *in vitro* kot *in vivo*. Osamljeno celokupno tumorsko RNA lahko v ta namen uporabimo neposredno, lahko pa jo pred tem specifično pomnožimo, še posebej takrat, ko je tumorskega tkiva premalo za pripravo imunohibridomov ali lizatov TC (65). Vnos mRNA v DC lahko izvedemo na več načinov, zelo učinkovita pa je celična elektroporacija (66). Met in sod. so ugotovili, da je postopek transfekcije tumorske mRNA učinkovit tako v primeru nezrelih kot zrelih DC, pri čemer pa je bil po koncu postopka delež živih celic večji v suspenziji zrelih DC. Poleg tega pa so, pričakovano, transficirane zrele DC, v primerjavi z nezrelimi DC bistveno močnejše spodbudile specifični protitumorski T-celični imunski odziv (67).

Pri pripravi cepiv na osnovi DC je potrebno upoštevati tudi druge parametre. V večini primerov o katerih so poročali, so posamezni odmerki cepiv vsebovali približno  $10^7$  s TAA opremljenih DC. To seveda zahteva pripravo velikega začetnega števila DC (vsaj  $10^8$ ). Celice nato lahko zamrznemo v ustreznih alikvotih, ki ustrezajo posameznim odmerkom cepiva, po odmrznitvi pa jih mora ostati najmanj 75% živih (68).

#### 1.3.4 UPORABA DC ZA IMUNSKO ZDRAVLJENJE RAKA

Cilj imunske terapije je uporabiti oziroma ponovno aktivirati bolnikov imunski odziv za doseganje terapevtskih koristi. Imunska terapija je lahko pasivna, pri čemer uporabljamo predhodno, v pogojih *ex vivo*, pripravljene antigensko specifične efektorske limfocite T, ali pa pa aktivna, v obliki cepiv na osnovi DC. S pasivno imunoterapijo dosegajo dokaj dobre klinične rezultate, vendar s tem pristopom ne moremo preprečiti metastatskega širjenja

tumorskega tkiva, saj ne zagotavlja nastanka spominskih protitumorskih limfocitov T z dolgo življenjsko dobo. Za razliko od pasivne imunske terapije pa cepiva z DC uspešno izzovejo nastanek tako efektorskih kot tudi spominskih limfocitov T (69). Prvič so cepiva na osnovi DC na ljudeh uporabili leta 1996, in sicer z namenom zdravljenja B-celičnega limfoma (70). Od tedaj pa do danes so izvedli veliko število kliničnih študij, v katerih so tovrstna cepiva uporabili pri različnih vrstah raka: malignem melanomu, multiplem mielomu, ne-Hodgkinovem limfomu, raku ledvic in mehurja, raku prostate, raku jajčnikov, raku dojk, kolorektalnem raku in drugih (71).

Do sedaj so se za imunsko terapijo v glavnem uporabljale avtologne DC, v zadnjem času pa vse bolj preučujejo možnosti uporabe alogenskih DC. Prednost uporabe slednjih, ki jih lahko pripravimo iz monocitov nesorodnih zdravih oseb, je, da lahko enostavneje zagotovimo njihove večje količine in s tem tudi aplikacijo na večjem številu pacientov (72). Alogenske DC so bile zaradi tega, ker ne izražajo vseh z bolnikovimi skladnih alelskih različic molekul HLA, do sedaj praviloma manj učinkovite pri proženju protitumorskih imunskih odzivov od avtolognih. Zagotovo pa bi lahko z uporabo za vsakega bolnika skrbneje izbranih, z njim v pogledu HLA načrtno delno usklajenih DC nesorodnih darovalcev ali celo haploidentičnih sorodnikov, močno izboljšali predstavljanje TAA, ob tem pa ohranili njihov izjemen aloimunski potencial.

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

### Namen dela:

Alogenske dendritične celice (DC), pripravljene iz monocitov nesorodnih zdravih oseb, predstavljajo pomemben potencialni vir antigene predstavljajočih celic (APC) za imunsko terapijo, zlasti rakavih obolenj. Ker pa je za to potrebno veliko število istovrstih DC, moramo v ta namen pripraviti, ovrednotiti in zamrzniti osnovno uniformirano celično banko, iz katere nato jemljemo enake odmerke celic.

V diplomskem delu smo v mešanih celičnih kulturah v pogojih *in vitro* želeli spremljati in ovrednotiti medsebojne vplive alogenskih DC, pripravljenih iz monocitov štirih različnih nesorodnih darovalcev. Namen našega dela je bil, da bi v omenjenih pogojih z ustreznimi eksperimentalnimi pristopi preučili njihovo morebitno medsebojno (ne)reaktivnost, potencialne fenotipske in apoptotične spremembe ter njihovo celokupno preživetje. Prav tako smo si zadali tudi cilj, da bomo z izvedbo funkcijskih imunskih testov ugotovili, kako kokulture alogenskih nezrelih in zrelih DC vplivajo na njihovo sposobnost aktivacije limfocitov T *in vitro*.

### Hipoteze:

- ⇒ Predvidevamo, da lahko alogenske dendritične celice (DC), pripravljene iz monocitov nesorodnih prostovoljnih zdravih krvodajalcev, obstajajo v mešani kokulturi brez izrazitih medsebojnih vplivov, ki bi spremenili njihove imunske funkcije.
- ⇒ Domnevamo tudi, da lahko alogenske DC v mešanih kokulturah obstajajo daljše obdobje (do 72 ur) v nezreli obliki (steady-state), ne da bi se pri tem medsebojno aktivirale.
- ⇒ Pričakujemo, da v daljšem obdobju gojenja alogenskih DC, tako v njihovih monokulturah kot mešanih kokulturah, ne bomo opazili statistično značilnega povečanja deleža apoptotičnih in mrtvih celic.

- ⇒ Domnevamo, da lahko v mešanih alogenskih kokulturah vzdržujemo stabilen obstoj tako nezrelih kot tudi popolnoma aktiviranih oziroma zrelih DC, in sicer v smislu ohranjanja zanje značilnih fenotipov, citokinskih profilov in alostimulacijskih sposobnosti.
  
- ⇒ Predvidevamo tudi, da bodo mešane alogenske kokulture DC zaradi večjega nabora različnih molekul HLA razreda II sposobne zelo učinkovito sprožiti imunske odzive limfocitov T, vrste T<sub>H</sub>1.

### 3 MATERIALI IN METODE

Vse opisane postopke smo izvajali v aseptičnih pogojih, pri sobni temperaturi, v komori z laminarnim pretokom zraka (Heraeus). Celične kulture smo gojili v inkubatorju (Heraeus) v vlažni atmosferi, s 5% CO<sub>2</sub> v zraku, pri temperaturi 37 °C. Vsi uporabljeni reagenti, gojišča in laboratorijski material so bili sterilni. Celice smo gojili v plastičnih gojilnih posodah z navojnim pokrovčkom s filtrom in površino 75 cm<sup>2</sup> (Falcon), s čimer smo zagotovili tudi zadostno površino za začetno adhezijo monocitov, iz katerih smo nato pripravili dendritične celice. Za ostale eksperimente z gojenimi DC smo uporabili sterilne plastične plošče z 12 vdolbinami (Falcon).

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI

Mononuklearne celice (MNC) smo osamili iz 50-75 ml levkocitnih koncentratov (BC; ang. *Buffy Coat*) 4 naključno izbranih zdravih krvodajalcev, ki so jih pripravili na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Prejeli smo jih v vrečkah za kri, na katerih so bili poleg volumna pripravka navedeni tudi šifra krvodajalca, podatki o njegovi krvni skupini, datum odvzema krvi in vrsta uporabljenega antikoagulanta.

##### 3.1.2 GOJIŠČA

Reagenti:

- gojišče RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (Cambrex, Charles City, IA, ZDA)
- fetalni goveji serum (FBS) (Cambrex, Charles City, IA, ZDA)
- gentamicin (50 µg/ml) (Gibco, Paisley, UK)

Celice smo spirali z gojiščem RPMI 1640, ki je že vsebovalo L-glutamin (300 mg/L) in pufer Hepes (*N*-2-hidroksietil-piperazin-*N'*-2-etansulfonska kislina, C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), dodali pa smo mu še gentamicin (50 µg/ml). V nadaljevanju bomo za to gojišče uporabljali izraz »osnovno gojišče«. Z dodatkom 10% (v/v) FBS osnovnemu, smo pripravili »popolno gojišče«, ki smo ga uporabljali za gojenje celic.

Osnovno gojišče	Popolno gojišče
- RPMI 1640	- Osnovno gojišče
- Gentamicin (50 µg/ml)	- 10% (v/v) FBS

Raztopina za osamitev MNC na gostotnem gradientu:

- sterilna raztopina fikola s specifično gostoto 1,0770 (5,64% polisukroze 400 in 9,65% natrijevega diatrizoata): Lympholyte®-H, sterile solution (Cedarlane Laboratories, Ontario, Kanada)

### 3.1.3 TOPNI DEJAVNIKI

**Preglednica 1:** Osnovne koncentracije topnih dejavnikov in namen njihove uporabe.

citokina in dejavnik zorenja	koncentracija v gojišču	namen uporabe	proizvajalec
rhGM-CSF	800 U/ml	priprava nezrelih DC, zorenje DC	Peprtech EC, London
rhIL-4	1000 U/ml	priprava nezrelih DC	Peprtech EC, London
poli(I:C)	20 µg/ml	zorenje DC	Invivogen, San Diego, CA, ZDA

Legenda: U (enote; Units); rhGM-CSF (rekombinantni človeški granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik); rhIL-4 (rekombinantni človeški interleukin-4)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 OSAMITEV MONOCITOV Z GRADIENTNIM CENTRIFUGIRANJEM

#### 3.2.1.1 Osamitev mononuklearnih celic (MNC) iz levkocitnega koncentrata

Reagenti:

- raztopina fikola s specifično gostoto 1,0770
- fosfatni pufer PBS (DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Cambrex, Belgija)
- osnovno gojišče

Mononuklearne celice smo izolirali iz levkocitnih koncentratov s centrifugiranjem na gostotnem gradientu. Vsebino vrečke za kri smo previdno izlili v plastični vsebnik (200 ml) z navojnim zamaškom in jo razredčili s PBS do končnega volumna 150 ml. Po 25 ml razredčene krvi smo s pipeto počasi in previdno nanесли na 12,5 ml raztopine fikola v ustrezno število 50 ml centrifugirk. Dobro zaprte centrifugirke smo nato centrifugirali 15 minut pri 2300 obratih  $\text{min}^{-1}$ , brez zaviranja. Plasti MNC, ki so se zbrale na meji med razredčeno plazmo in fikolom, smo iz po dveh centrifugirk, s pomočjo pasteurjeve pipete prenesli v novo 50 ml centrifugirko. Pri tem smo pazili, da nismo posrkali spodnje plasti, v kateri se nahajajo eritrociti in granulociti. Nato smo celice trikrat sprali s pufrom PBS, z namenom da bi odstranili čimveč trombocitov, ostanke plazme in fikola. Po vsakem spiranju, 8 minut pri 1200 obratov  $\text{min}^{-1}$ , smo odlili supernatant in celice resuspendirali v svežem PBS. Na koncu smo MNC resuspendirali v osnovnem gojišču in jih s pomočjo svetlobnega mikroskopa prešteli v Bürker-Türkovi komori. Z dodatkom osnovnega gojišča smo nato pripravili ustrezno koncentracijo celične suspenzije ( $0,5 \times 10^6$  celic/ml).

#### 3.2.1.2 Osamitev monocitov iz suspenzije mononuklearnih celic

Reagenti:

- popolno gojišče
- fosfatni pufer PBS



Osamitev monocitov iz suspenzij MNC smo izvedli s postopkom adherence. Najprej smo 20 ml suspenzije MNC s koncentracijo ( $0,5 \times 10^6$  celic/ml) razredčili s popolnim gojiščem do končnega volumna 75 ml. Po 15 ml tako pripravljene suspenzije smo nato razporedili v ustrezno število gojilnih posod s površino  $75 \text{ cm}^2$  in jih za 2 uri postavili v inkubator s temperaturo  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in atmosfero  $5\% \text{ CO}_2$  v zraku. Po inkubaciji smo celične suspenzije nad pritrjenimi monociti iz vsake od posod previdno odpipetirali. Posode smo nato trikrat sprali z RPMI 1640, da smo odstranili vse nepritrjene celice. Na koncu smo v vsako od gojilnih posod dodali 15 ml PBS (brez  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  ionov) in tako omogočili, da so se monociti čez čas odlepili od podlage in smo jih lahko prešteli.

### 3.2.2 PRIPRAVA DENDRITIČNIH CELIC

#### 3.2.2.1 Priprava nezrelih dendritičnih celic

Reagenti:

- popolno gojišče
- rhGM-CSF (v liofilizirani obliki)
- rhIL-4 (v liofilizirani obliki)

Potem, ko smo jih prešteli, smo monocite vsakega od štirih krvodajalcev resuspendirali v popolnem gojišču do končne koncentracije  $0,5 \times 10^6$  celic/ml in jim dodali citokina rhGM-CSF (800 U/ml) in IL-4 (1000 U/ml). Za pripravo nezrelih DC smo uporabili izključno sveže izolirane monocite. Tretji dan gojenja v inkubatorju smo celičnim kulturam zamenjali polovico gojišča s svežim, ki smo mu dodali enako količino citokinov kot na začetku. Od 3. dne dalje so bile celice v kulturi večinoma nepritrjene in nepravilnih oblik. Popolnoma diferencirane nezrele DC vsakega od štirih nesorodnih darovalcev smo peti dan diferenciacije zbrali in uporabili za nadaljno gojenje, in sicer tako v obliki monokultur kot mešanih alogenskih kokultur z enakim deležem DC vsake nesorodne osebe.

### 3.2.2.2 Priprava zrelih dendritičnih celic

#### Reagenti:

- popolno gojišče
- rhGM-CSF (v liofilizirani obliki)
- poli(I:C) (v liofilizirani obliki)

Nezrele DC smo resuspendirali v popolnem gojišču, v koncentraciji  $0,5 \times 10^6$  celic/ml in dodali rhGM-CSF (800 U/ml) ter  $20 \mu\text{g/ml}$  dejavnika zorenja, poli(I:C). Celice smo inkubirali 2 dni, in sicer brez menjave gojišča. Zrele DC smo nato zbrali in jih pogledali pod svetlobnim mikroskopom. Bile so okrogle in nepritrjene, s številnimi kratkimi izrastki.

### 3.2.3 PRIPRAVA SUSPENZIJ $\text{CD4}^+$ LIMFOCITOV T

#### Reagenti:

- imunomagnetne kroglice  $\text{CD4}$  (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija)
- fosfatni pufer PBS
- serum FBS

Iz levkocitnega koncentrata smo osamili tudi  $\text{CD4}^+$  limfocite T, in sicer s pozitivno imunomagnetno selekcijo, skladno s protokolom proizvajalca (Miltenyi Biotec, Nemčija).

Celični suspenziji osamljenih MNC smo dodali magnetne kroglice  $\text{CD4}$ , jih inkubirali in nanegli na kolono, vstavljeno v magnetno enoto na stojalu. Celice, ki se niso vezale na anti- $\text{CD4}$  protitelesa na magnetnih mikrokroglicah, so potovale skozi kolono, ostale je magnetno polje zadržalo na koloni. Zadržane celice smo nato trikrat sprali s pufrom PBS, brez  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  ionov. Po spiranju smo kolono odstranili iz magnetnega polja in celice z mikrokroglic sprostili s pomočjo priloženega bata. Čistost osamljene populacije  $\text{CD4}^+$  limfocitov T, ki je bila vedno nad 95%, smo določili s pretočnim citometrom (Becton Dickinson, Inc., ZDA). Frakcije celokupnih  $\text{CD4}^+$  limfocitov T smo nato zamrznili in jih kasneje kot odzivne celice uporabili v mešanih limfocitnih reakcijah (MLR).

Naivne CD4<sup>+</sup> limfocite T CD45RA<sup>+</sup> smo osamili z uporabo izolacijskega sestava, skladno s protokolom proizvajalca Miltenyi Biotec, pri čemer je bila njihova čistost v vseh primerih več kot 98%. Naivne CD4<sup>+</sup> limfocite T smo zamrznili do kasnejše uporabe v testih polarizacijske sposobnosti DC.

### 3.2.4 OSTALI POSTOPKI PRI DELU S CELIČNIMI KULTURAMI

#### 3.2.4.1 Štetje celic

Reagenti:

- raztopina tripanskega modrila (Sigma, ZDA)

Število celic smo določali v Bürker Türkovi komori (Brand, Nemčija), s pomočjo navadnega svetlobnega mikroskopa. Za štetje svežih MNC po osamitvi iz levkocitnih koncentratov in štetje monocitov smo uporabili tripansko modrilo, ki vstopa izključno v mrtve celice in jih zato obarva modro, zaradi česar jih lahko pod mikroskopom ločimo od neobarvanih živih celic.

Pred štetjem smo 20 µl celične suspenzije dodali raztopino barvila v razmerju 1:5 (80 µl barvila) ali 1:10 (180 µl barvila), odvisno od gostote celic v suspenziji. Čez Bürker Türkovo komoro smo na predel s števno mrežo položili krovno stekelce in v vmesni prostor iztisnili približno 10 µl obarvane suspenzije. Nato smo pod 25-kratno povečavo z navadnim svetlobnim mikroskopom prešteli celice v 25-ih kvadratih števne mreže.

Za izračun skupnega števila celic v suspenziji smo uporabili naslednjo formulo:

$$N = n * R * V * 10^6$$

N – skupno število celic v suspenziji

n – povprečno število celic, prešteti v kvadratih

R – faktor redčenja zaradi mešanja s tripanskim modrilom

V – volumen celične suspenzije, iz katere smo vzeli vzorec (ml)

#### 3.2.4.2 Spremljanje morfoloških značilnosti celic

Morfologijo dendritičnih in ostalih celic smo opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom (Nikon, Japonska), s tehniko Nomarski. Fotomikrografije smo posneli z digitalnim fotoaparatom Nikon E4500 (Nikon, Japonska).

#### 3.2.4.3 Zamrzovanje in odmrzovanje celic

##### Zamrzovanje

Celice smo ob dodatku 10% krioprotektanta dimetil sulfoksida (DMSO) shranjevali do 2 mesecev pri temperaturi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za zamrzovanje smo uporabljali sterilne 2 ml krioepruvete, ki smo jih pred tem ustrezno označili in jih za najmanj 30 minut izpostavili temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Volumen celične suspenzije smo prilagodili tako, da največja koncentracija celic v njej ni presegala  $20 \times 10^6$  celic/ml. Za zamrzovanje smo pripravili količino zamrzovalnega medija, ki je bila enaka volumnu zamrzovane celične suspenzije. Zamrzovalni medij smo pripravili iz 50% RPMI 1640, 30% FBS in 20% DMSO. Pred zamrzovanjem smo dali celično suspenzijo in zamrzovalni medij za 20 minut na temperaturo  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nato smo s pasteurjevo pipeto po kapljicah in med stalnim stresanjem celični suspenziji dodali zamrzovalni medij. Celično suspenzijo smo razdelili v krioepruvete in jih prenesli v zamrzovalnik (Sanyo, Japonska) na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### Odmrzovanje

Pred odmrzovanjem smo v 50 ml centrifugirki pripravili odmrzovalni medij: RPMI 1640 z 20-30% FBS. Količina uporabljenega odmrzovalnega medija je bila enaka najmanj 2-kratni količini volumna celične suspenzije, ki smo jo nameravali odmrzniti. Pred odmrzovanjem celic smo odmrzovalni medij ohladili na ledeni kopeli. Po prenosu krioepruвет iz zamrzovalnika ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) smo jih na hitro odtalili v vodni kopeli ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Nato smo jih nemudoma prenesli na led in njihovo vsebino prenesli v predhodno ohlajene 50 ml

centrifugirke. V celično suspenzijo smo po kapljicah dodali ohlajeni odmrzovalni medij, zatem pa celice dvakrat sprali s PBS (1400 obratov  $\text{min}^{-1}$ , 7 minut) in jih resuspendirali v ustreznem delovnem mediju za izvedbo načrtovanih eksperimentov.

### 3.2.5 SPREMLJANJE APOPTOZE DC

Po petih dneh gojenja izhodnih monocitov smo popolnoma diferencirane DC štirih zdravih nesorodnih oseb zbrali in jih gojili še nadaljnih 72 ur, in sicer v obliki monokultur ali pa v mešanih kokulturah z enakimi deleži DC od vsakega posameznika. Takšne kulture smo v omenjenem časovnem intervalu gojili bodisi z ali brez aktivacijskega dejavnika poli(I:C) (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nato smo DC iz posamičnih kultur zbrali ter določili odstotek apoptotičnih in mrtvih celic, in sicer s pretočno citometrijo po barvanju na Annexin V (AV) in s propidijevim jodidom (PI). Točkovni diagrami so razdeljeni na štiri kvadrante. Levo spodaj so AV in PI negativne celice, ki predstavljajo žive celice. Desno spodaj so AV pozitivne in PI negativne celice, ki predstavljajo apoptotične celice, kvadrant levo zgoraj pa zajema s PI obarvane mrtve celice. Tudi kvadrant, z dvojno obarvanimi celicami (AV in PI), predstavlja mrtve DC.

### 3.2.6 UGOTAVLJANJE CELIČNIH FENOTIPOV NA RAZLIČNIH STOPNJAH PRIPRAVE DC

Diferenciranost DC smo ocenjevali z analizo njihovih površinskih molekul (fenotipa), s pretočno citometrijo.

#### 3.2.6.1 Označevanje celic s specifičnimi monoklonskimi protitelesi

Nezrele oziroma zrele DC tako iz monokultur kot mešanih alogenskih kokultur smo označili s specifičnimi, fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi (mAb), ki specifično prepoznavajo posamezne vrste molekul, izražene na njihovih površinah.

## Reagenti:

- specifična mAb označena s fluorescenčnimi barvili (Preglednica 2)
- kontrolna izotipska protitelesa FITC-IgG1 in R-PE-IgG2a (Biolegend, CA, ZDA)
- fosfatni pufer PBS
- 2% raztopina paraformaldehida

**Preglednica 2:** *Specifična monoklonska protitelesa (mAb) za pretočno citometrijo, ki smo jih uporabili za označevanje površinskih molekul, izraženih na nezrelih in zrelih DC.*

specifično mAb	fluorescenčno barvilo	proizvajalec	namen označevaja	delovni volumen/1x10 <sup>5</sup> celic
anti-CD80	FITC	Biolegend, CA, ZDA	kostimulacijske molekule na APC	2 µl
anti-CD86	FITC	DakoCytomation, Danska	kostimulacijske molekule na APC	1 µl
anti-CCR7	Alexa Flour 488	Biolegend, CA, ZDA	kemokinski receptor, ki usmerja DC v sekundarne limfatične organe	1 µl
anti-HLA-DR	R-PE	Exalpha Biologicals Inc., MA, ZDA	molekule HLA razreda II	1 µl

Legenda: FITC (fluorescein izotiocianat – zelena fluorescenca); R-PE (fikoeritrin R – rdeča fluorescenca)

Po pripravi ustreznih kultur DC smo v posamezno epruveto za pretočno citometrijo prenesli po 1x10<sup>5</sup> nezrelih oziroma zrelih DC, za vsako posamezno označevalno molekulo. Nato smo jim dodali bodisi 1 µl ali 2 µl specifičnih mAb, odvisno od njihove koncentracije. Celične suspenzije smo dobro premešali in jih v temi inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Potem smo jih dvakrat sprali s PBS in resuspendirali v 2% raztopini paraformaldehida in jih analizirali s pretočnim citometrom, pri čemer smo jih za negativno kontrolo označili s kontrolnimi izotipskimi protitelesi.

### 3.2.6.2 Določanje fenotipa DC s pretočnim citometrom

Nivoje izražanja molekul CD80, CD86, CCR7 in HLA-DR na površini DC smo določili s pomočjo pretočnega citometra. Vzorce smo najprej analizirali v okviru parametrov FSC

(ang. *Forward Scatter*) in SSC (ang. *Side Scatter*), ki sta sorazmerna velikosti in granuliranosti celic. Potem smo na histogramih izbrali tiste populacije celic, pri katerih smo lahko zanesljivo preučili intenzitete njihove fluorescence, pri valovni dolžini, ki je bila značilna za vsak uporabljeni fluorokrom. Podatke smo analizirali s programom CellQuest (Becton Dickinson, Inc., ZDA). Rezultate smo podali v obliki grafov, ki prikazujejo posamezne krivulje v odvisnosti od števila dogodkov (ordinatna os) in intenzitete fluorescence (abscisna os).

### 3.2.7 MERJENJE CITOKINOV V SUPERNATANTIH CELIČNIH KULTUR S TEHNIKO ELISA

Nezrele DC posameznih darovalcev smo peti dan diferenciacije *in vitro* zbrali in jih še nadalje gojili 48 ur bodisi v obliki monokulture ali pa mešane alogenske kokulture, ki je vsebovala enake deleže DC vseh štirih darovalcev. Omenjene kulture smo gojili tako v prisotnosti samega rhGM-CSF kot tudi rhGM-CSF in poli(I:C). Po 48 urah smo zbrali supernatante vseh različnih kultur in v njih določili prisotnost citokinov IL-10 ter IL-12p70 s testom ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Set (Biolegend, CA, ZDA).

### 3.2.8 MEŠANA LIMFOCITNA REAKCIJA (MLR)

#### 3.2.8.1 Gojenje mešanih kultur in merjenje proliferacijskega odziva

Reagenti:

- osnovno gojišče
- mitomicin C v liofilizirani obliki (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)
- <sup>3</sup>H-timidin (Perkin Elmer, Boston, ZDA)

Dražilno sposobnost DC v alogenskem imunskem odzivu smo preučevali v mešanih kulturah (MLR; ang. *Mixed Lymphocyte Reaction*) s CD4<sup>+</sup> limfociti T kot odzivnimi celicami (R; *Responding cells*). Nezrele in zrele DC iz monokultur in mešanih alogenskih kokultur smo uporabili kot dražilne celice (S; ang. *Stimulating cells*). Pred uporabo smo jih 25 minut inkubirali z raztopino mitomicina C (0,1 mg/ml) in jih nato še dvakrat sprali z osnovnim

gojiščem. S tem smo preprečili morebitno proliferacijo DC in tako zagotovili, da smo v poskusu izmerili le obseg delitve odzivnih celic. Mikrokulture MLR smo pripravili v vdolbinicah z zaobljenim dnom na mikrotitrski ploščici. Pri tem smo različne DC v razmerju 1:10 dodali k CD4<sup>+</sup> limfocitom T ( $1 \times 10^4$  DC in  $1 \times 10^5$  limfocitov T). Končni volumen gojišča v vsaki mikrokulturi je bil 200  $\mu$ l. Mikrotitrne plošče smo prenesli v inkubator (T=37 °C, 5% CO<sub>2</sub> v zraku). Po štirih dneh smo v vsako mikrokulturo dodali <sup>3</sup>H- timidin (1  $\mu$ Ci/vdolbinico) in jih inkubirali še 18 ur. Nato smo z uporabo scintilacijskega števca izmerili obseg vgradnje <sup>3</sup>H-timidina v hčerinsko DNA proliferirajočih limfocitov T. Rezultate smo izrazili v obliki vrednosti cpm (ang. *counts per minute*).

### 3.2.9 POLARIZACIJSKA STIMULACIJSKA SPOSOBNOST RAZLIČNO GOJENIH DC

Citokinski profil efektorskih celic T, nastalih iz frakcije naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T CD45RA<sup>+</sup>, po stimulaciji z različnimi DC, smo določili z intracelularnim označevanjem različnih citokinov in pretočno citometrijo.

#### Reagenti:

- specifična mAb označena s fluorescenčnimi barvili (Preglednica 3)
- fosfatni pufer PBS
- 0,1% raztopina Triton X-100 (Sigma Aldrich)
- popolno gojišče
- 4% raztopina paraformaldehida
- 3% goveji serumski albumin

Pripravili smo alogenske kokulture z osamljenimi naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T in različnimi DC in jih 10 dni gojili v popolnem gojišču. Nato smo iz kultur zbrali nastale efektorske limfocite T in jih dvakrat sprali s PBS. Osamljene celice smo nespecifično stimulirali s forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) in ionomicinom, v koncentracijah 50 ng/ml oziroma 500 ng/ml. Po 3 urah pa smo jim za nadaljne 3 ure dodali še brefeldin A (10  $\mu$ g/ml). Brefeldin A je inhibitor proteinskega transporta in smo ga dodali zato, da smo na ta



način omogočili znotrajcelično označevanje citokinov. Po stimulaciji smo limfocite T 45 minut fiksirali s 4% raztopino paraformaldehida in jih 10 minut permeabilizirali z 0,1% raztopino Tritona X-100. Sledila je 30-minutna inkubacija v PBS, ki je vseboval 3% goveji serumski albumin (BSA; ang. *Bovine Serum Albumin*), s katerim smo preprečili nespecifično vezavo protiteles. Celice smo namreč znotrajcelično označili s protitelesi, ki prepoznajo IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 in IL-10, nato pa vzorce analizirali s pomočjo pretočne citometrije.

**Preglednica 3:** *Specifična protitelesa za pretočno citometrijo, ki smo jih uporabili za detekcijo različnih citokinov v limfocitih T.*

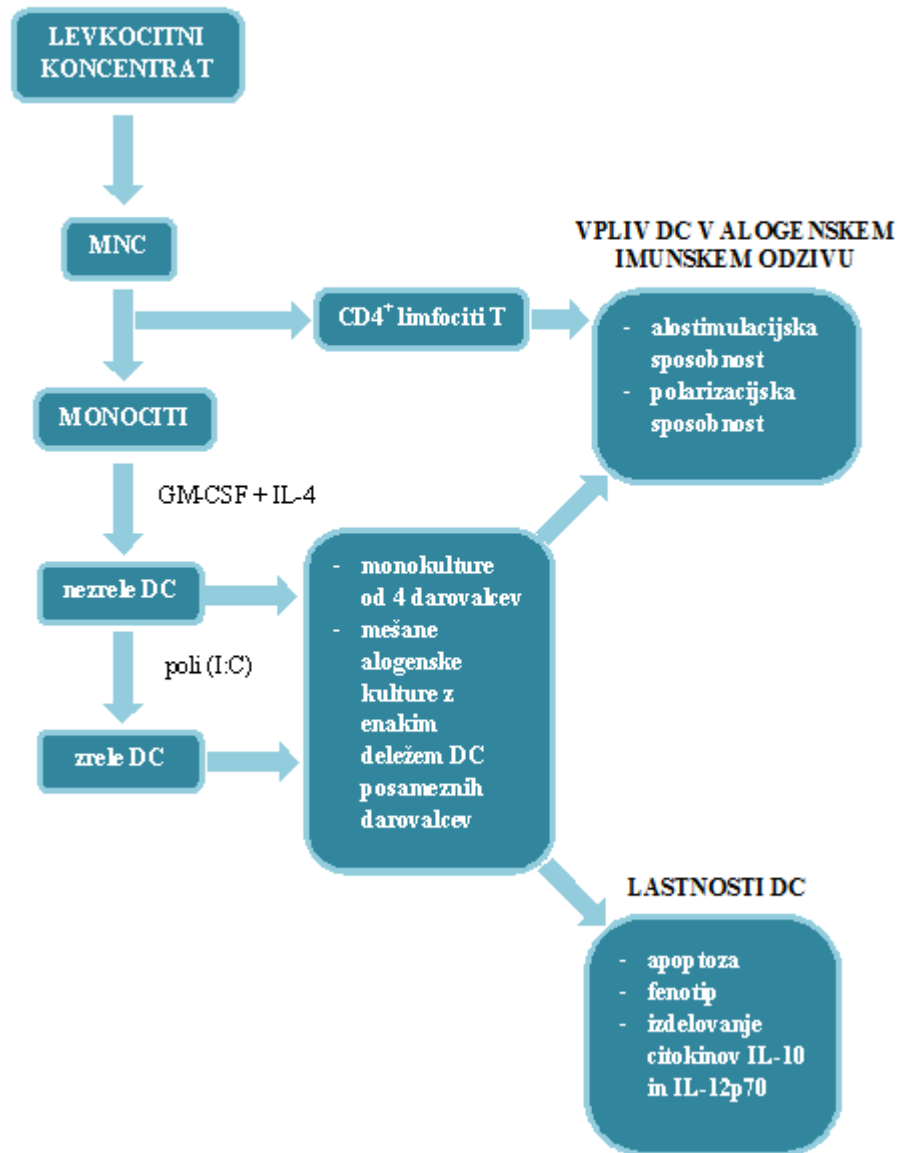
specifično mAb	fluorescenčno barvilo	proizvajalec	namen označevanja	koncentracija
anti-IFN- $\gamma$	FITC	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA	odziv vrste T <sub>H</sub> 1	10 $\mu$ g/ml
anti-IL-2	R-PE	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA	odziv vrste T <sub>H</sub> 1	10 $\mu$ g/ml
anti-IL-4	R-PE	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA	odziv vrste T <sub>H</sub> 2	10 $\mu$ g/ml
anti IL-10	R-PE	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA	odziv vrste T <sub>H</sub> 2	10 $\mu$ g/ml

Legenda: FITC (fluorescein izotiocianat – zelena fluorescenca); R-PE (fikoeritrin R – rdeča fluorescenca)

### 3.2.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program SPSS, verzija 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ZDA). Statistično signifikantnost razlik med posameznimi pari spremenljivk smo določili s pomočjo Studentovega t-testa ( $p < 0,05$ :\*,  $p < 0,01$ : \*\*,  $p < 0,001$ :\*\*\*).

## 3.2.11 NAČRT DELA



Slika 5: Načrt dela

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRIPRAVA DC IZ MONOCITOV *in vitro*

Mononuklearne celice smo osamili na gostotnem gradientu fikola iz razredčenih levkocitnih koncentratov štirih nesorodnih zdravih krvodajalcev. S pomočjo svetlobnega mikroskopa smo v Bürker Türkovi komori prešteli število izoliranih celic, ki je bilo v povprečju  $450 \times 10^6$ . Nato smo s postopkom adherence na plastično površino osamili monocite. Njihovo število se je med posameznimi alikvoti vzorcev razlikovalo, in sicer od  $6 \times 10^6$  do  $10 \times 10^6$ , kar pa je v vseh primerih zadostovalo za nadaljno pripravo DC. Nezrele DC smo pripravili v plastičnih gojilnih posodah z dodanima citokinoma GM-CSF in IL-4. Iz posameznih vzorcev smo za nadaljne preskuse pripravili mešano alogensko kokulturo, ki je vsebovala enake deleže nezrelih DC vsakega posameznega darovalca. Peti dan smo celicam dodali poli(I:C) in jih zoreli še 48 ur. Za vsak poskus smo tako uporabili po 5 različnih vzorcev z nezrelimi in 5 z zreli DC.

S pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa smo spremljali morfologijo nezrelih in zrelih DC v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah. V kulturah z GM-CSF in IL-4 smo po menjavi gojišča opazili, da so se iz okroglih monocitov razvile celice podolgovatih in nepravilnih oblik, ki so po petih dneh postale nekoliko večje in zaobljene in so bile v suspenziji večinoma nepritrjene. Kmalu po aktivaciji s poli(I:C) smo opazili, da se je večina celic prilepila na dno gojilne posode, vendar so se nato tekom dozorevanja odlepile od podlage in je večina DC ostala nepritrjenih. Po koncu zorenja so dobile tudi značilno obliko zrelih DC, s številnimi a kratkimi izrastki, neenakomerno razporejemi po površini celic. Zrele DC so se združevale v skupke, ki pa jih je bilo več v mešanih alogenskih kokulturah.

## 4.2 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI DC V MONOKULTURAH IN MEŠANIH ALOGENSKIH KOKULTURAH

### 4.2.1 DOLOČANJE OBSEGA APOPTOZE

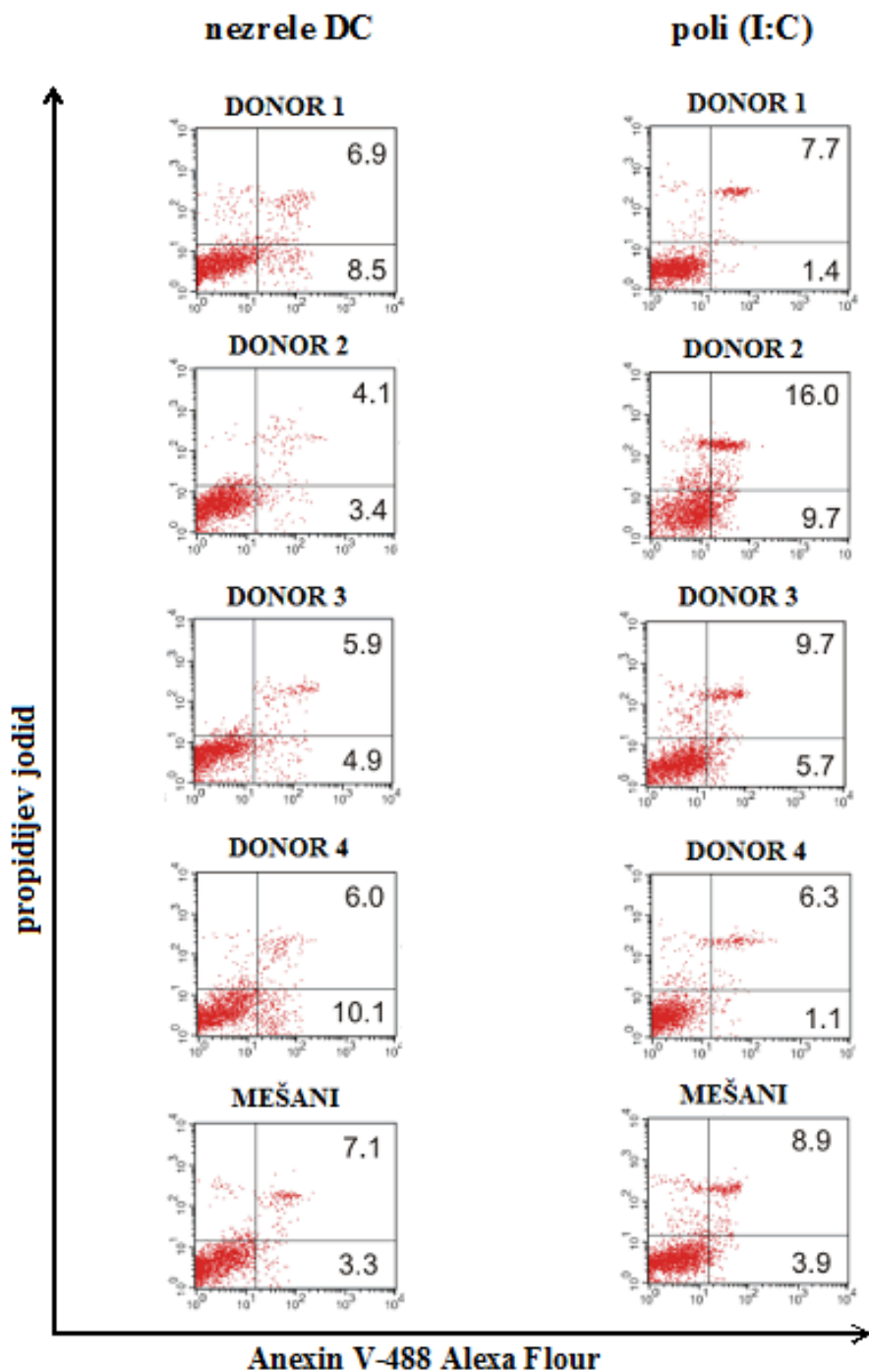
Da bi ugotovili, kako mešane alogenske kokulture DC štirih nesorodnih zdravih oseb vplivajo na kakovost celic, smo s pomočjo pretočne citometrije spremljali deleže apoptotičnih in mrtvih DC. V ta namen smo tako monokulture kot mešane alogenske kokulture DC po petih dneh diferenciacije gojili še nadaljnih 72 ur, in sicer bodisi v odsotnosti (nezrele DC) ali v prisotnosti dejavnika njihovega zorenja (poli(I:C)). Opravili smo 2 neodvisni meritvi, reprezentativne rezultate pa smo prikazali v obliki relativnih deležev apoptotičnih in mrtvih celic v ustreznih histogramih na Sliki 6.

Med monokulturami nezrelih DC posameznih darovalcev so bile razlike v deležih mrtvih celic razmeroma majhne, prav tako pa v tem parametru ni bilo bistvenih razlik v primerjavi z mešano kokulturo nezrelih alogenskih DC. Večja nihanja v deležih nezrelih apoptotičnih DC pa smo opazili tako pri posameznih darovalcih kot tudi v primerjavi z mešano alogensko kokulturo. Pri tem je bil delež apoptotičnih celic v mešani alogenski kokulturi nezrelih DC celo nižji kot v monokulturah DC vsakega posameznega darovalca.

Mešana alogenska kokultura zrelih DC je vsebovala podoben delež mrtvih celic kot posamezna monokultura zrelih DC, z izjemo monokulture darovalca 2, v kateri smo zaznali največ mrtvih in apoptotičnih zrelih DC. V kulturi z mešanimi alogenskimi DC po zorenju ni prišlo do večjih sprememb v deležih zrelih apoptotičnih DC v primerjavi z ustreznimi monokulturami.

Dozorenje s poli(I:C) je v posameznih monokulturah celo nekoliko zmanjšalo delež apoptotičnih celic v primerjavi z ustreznimi kulturami nezrelih DC. Ob tem pa je delež mrtvih celic ostal približno enak oziroma se je povečal le v primeru darovalca 2. Ker sta deleža apoptotičnih celic v mešani alogenski kokulturi nezrelih in zrelih DC manjša od povprečnih vrednosti ustreznih monokultur, lahko ugotovimo, da sočasno gojenje večih alogenskih DC ne poveča njihove apoptoze. (Povprečen delež apoptotičnih DC pri nezrelih DC v monokulturah

je 6,73; v mešanih alogenskih kokulturah pa 3,30. Povprečen delež apoptotičnih DC pri zrelih DC v monokulturah je 9,93; v mešanih alogenskih kokulturah pa 3,90.)



**Slika 6:** Delež apoptotičnih in mrtvih celic v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah nezrelih in s poli(I:C) dozorelih DC.

#### 4.2.2 IZRAŽANJE ZNAČILNIH POVRŠINSKIH MOLEKUL NA DC

Aktivacija limfocitov T in drugih imunskih celic je v veliki meri odvisna od značilnih molekul, izraženih na površini DC. Medsebojne vplive alogenskih DC na njihov fenotip v mešani kokulturi smo ugotavljali z določanjem površinskih molekul, ki so značilne za nezrele in zrele DC in so dober pokazatelj aktivacijske sposobnosti DC, pripravljenih iz monocitov *in vitro*.

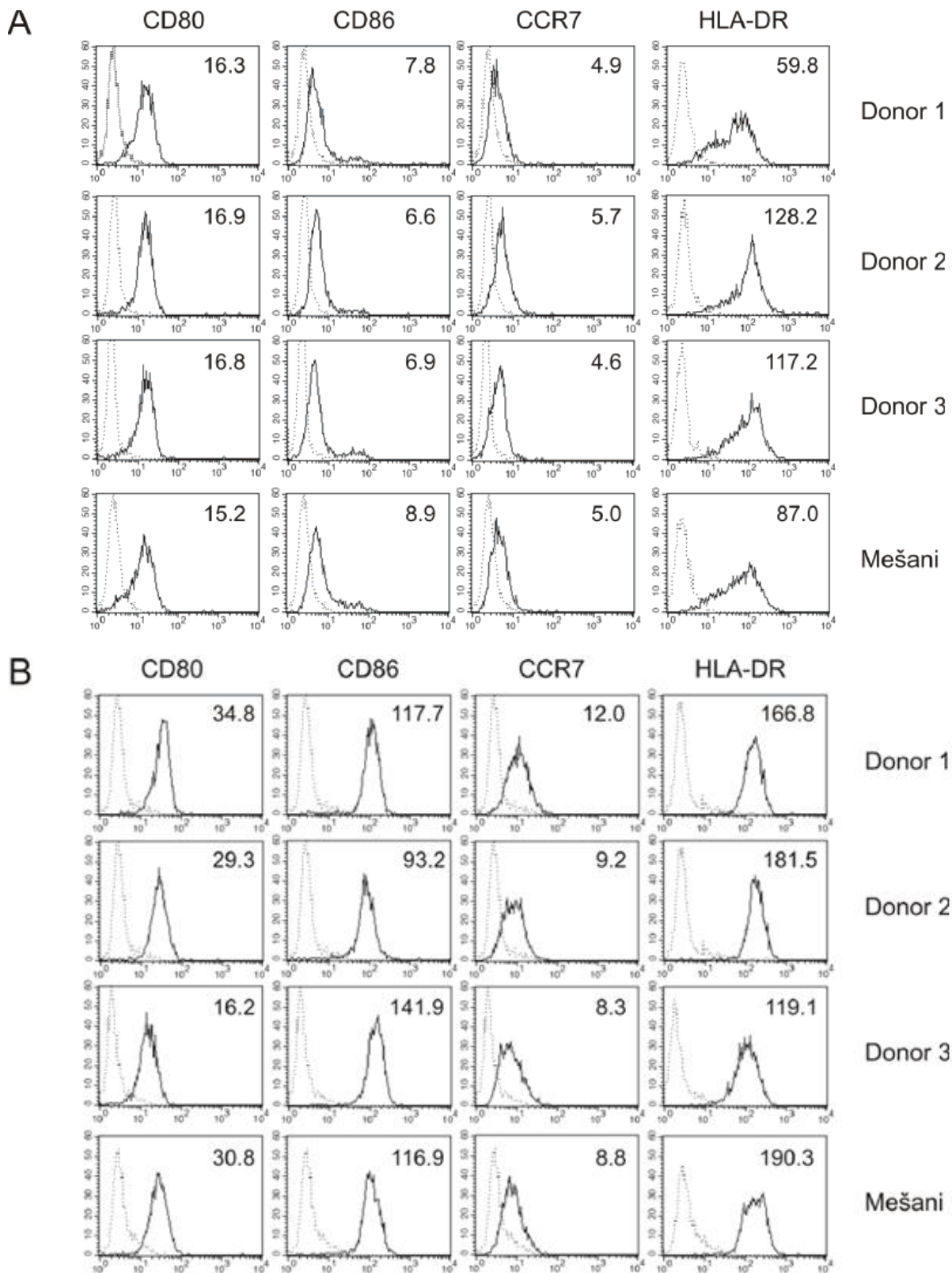
Nezrele DC štirih nesorodnih zdravih darovalcev smo peti dan diferenciacijskega gojenja zbrali in jih nadalje gojili bodisi v monokulturah ali v mešani alogenski kokulturi, ki je vsebovala enake deleže DC vsakega posameznika. Celice smo gojili 48 ur v prisotnosti samega GM-CSF ali kombinacije GM-CSF in poli(I:C). Nato smo DC iz posamičnih kultur inkubirali s fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi proti CD80, CD86, CCR7 in HLA-DR. Nivoje izražanja omenjenih molekul smo določili s pretočno citometrijo. Na Sliki 7 so prikazani reprezentativni frekvenčni histogrami za posamične površinske označevalce DC, gojenih v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah nezrelimi in zreli DC. Gostota posamezne vrste molekul na celični površini oziroma moč njihovega izražanja je prikazana v obliki povprečne intenzitete fluorescence (MFI; ang. *Mean Fluorescence Intensity*). Na ordinatah smo prikazali število dogodkov, to je število celic, ki so vezale specifično protitelo, na abscisah pa nivoje površinskih molekul, ki so izraženi z intenziteto fluorescence. Numerične vrednosti zapisane v histogramih desno zgoraj predstavljajo vrednosti MFI celic, ki smo jih označili s specifičnimi protitelesi.

V splošnem lahko ugotovimo, da zrele DC v primerjavi z nezrelimi povečajo izražanje molekul CD80, CD86, CCR7 in HLA-DR, tako v monokulturah kot tudi v mešanih alogenskih kokulturah (Slika 8). Monokulture nezrelimi DC vseh darovalcev so le šibko izražale molekule CD80, CD86 in CCR7. Obseg izražanja teh molekul se v monokulturah DC različnih darovalcev ni razlikovala od tistega v mešani alogenski kokulturi. Brez dodatnega aktivacijskega signala so nezrele DC v monokulturah najmočneje izražale molekule HLA-DR, ki so najbolj aloimunogene od vseh molekul HLA razreda II. Najmanjšo intenziteto fluorescence v monokulturah nezrelimi DC pa smo zaznali pri tistih celicah, ki smo jih označili

s protitelesi anti-CCR7. Enak fenotipski vzorec smo ugotovili tudi v mešani alogenski kokulturi nezrelih DC.

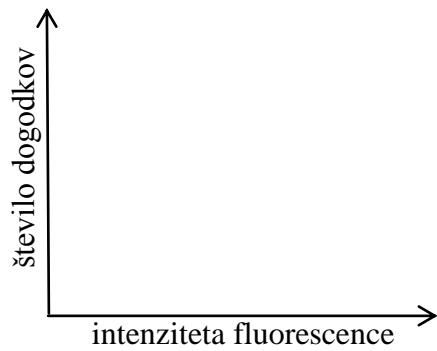
Izražanje izbranih, za DC značilnih površinskih molekul smo ugotavljali tudi na zrelih DC. Po zorenju s poli(I:C) med DC v monokulturah in v mešani alogenski kokulturi nismo opazili večjih razlik v vrednostih povprečnih intenzitet. To pomeni, da je bilo število posameznih preučevanih površinskih molekul v teh kulturah zelo podobno. Najšibkeje so zrele DC izražale kemokinski receptor CCR7. Tako kot CCR7, sta bili tudi kostimulacijski molekuli CD80 (B7-1) in CD86 (B7-2), v približno enakem obsegu prisotni na površinah zrelih DC iz monokultur in mešanih alogenskih kokultur. Izjema je bil le darovalec 3, pri katerem se koncentracija molekul CD80 kot tudi HLA-DR na površini zrelih DC v primerjavi z nezrelimi pravzaprav ni bistveno spremenila. Razen pri darovalcu 3, pa so zrele DC izmed vseh površinskih molekul najmočneje izražale molekule HLA-DR, še posebej tiste, ki smo jih vzorčili iz mešanih alogenskih kokultur.

V mešanih kokulturah alogenskih zrelih DC je bilo izražanje molekul HLA-DR in CD80 za dvakrat večje kot v enakih kulturah z nezrelimi DC. Najizraziteje je v mešanih alogenskih kokulturah 48-urno zorenje povečalo izražanje molekul CD86, in sicer za več kot 10-krat, najmanj pa je vplivalo na koncentracijo molekul CCR7. Podobne vplive aktivacijskega signala na izražanje preučevanih molekul smo zaznali tudi v posameznih monokulturah zrelih DC.

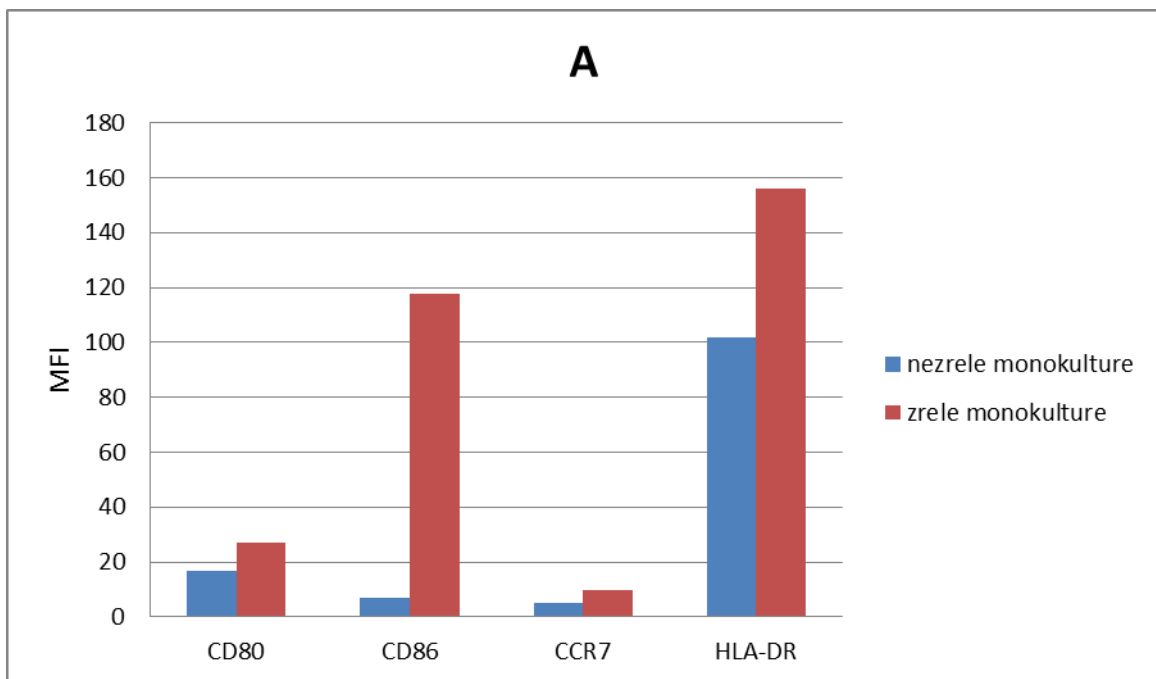


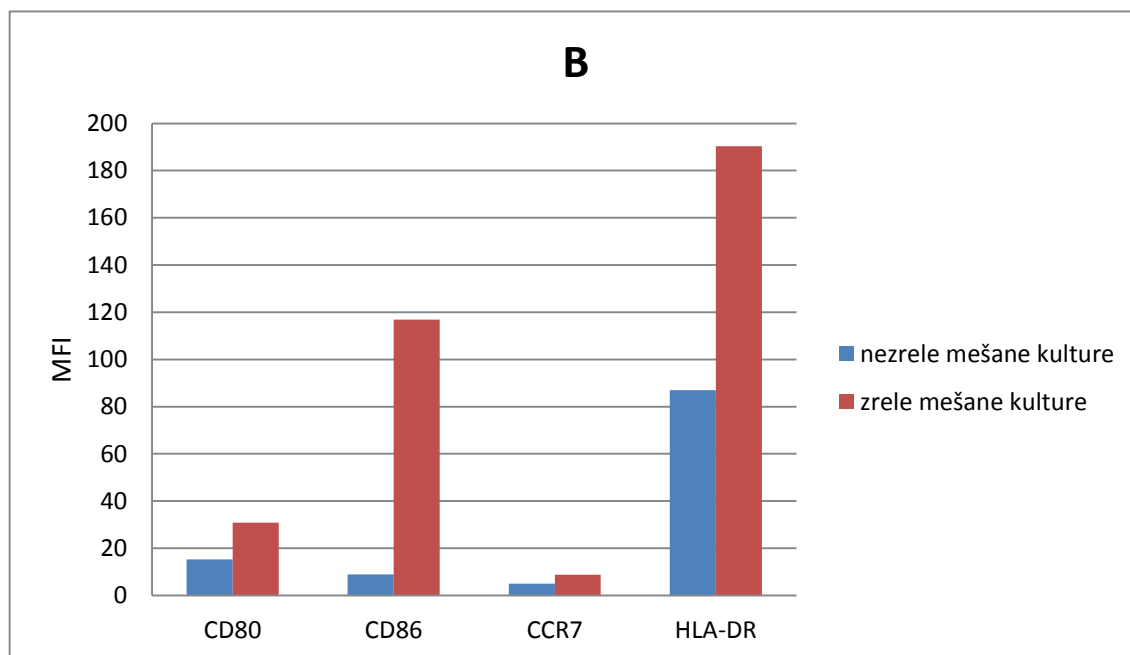
Legenda: celična kultura (—); negativna kontrola z izotipskimi protitelesi (····).





Slika 7: Fenotip celic na različnih stopnjah priprave DC; (A) nezrele DC, (B) zrele DC.





**Slika 8:** Izražanje površinskih molekul v monokulturah (A) in mešanih alogenskih kokulturah (B) nezrelih in zrelih DC. (Prikazane so povprečne vrednosti treh darovalcev in vrednosti izmerjene v mešani alogenski kokulturi)

#### 4.2.3 IZDELOVANJE IL-10 IN IL-12p70 V NEZRELIH IN ZRELIH DC

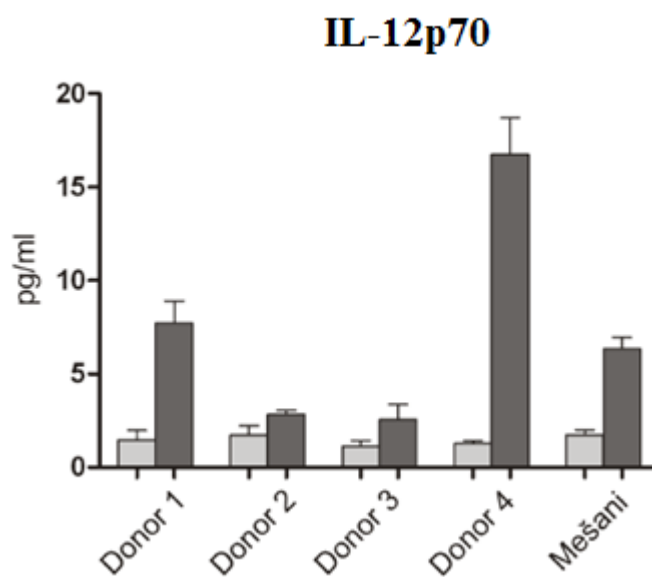
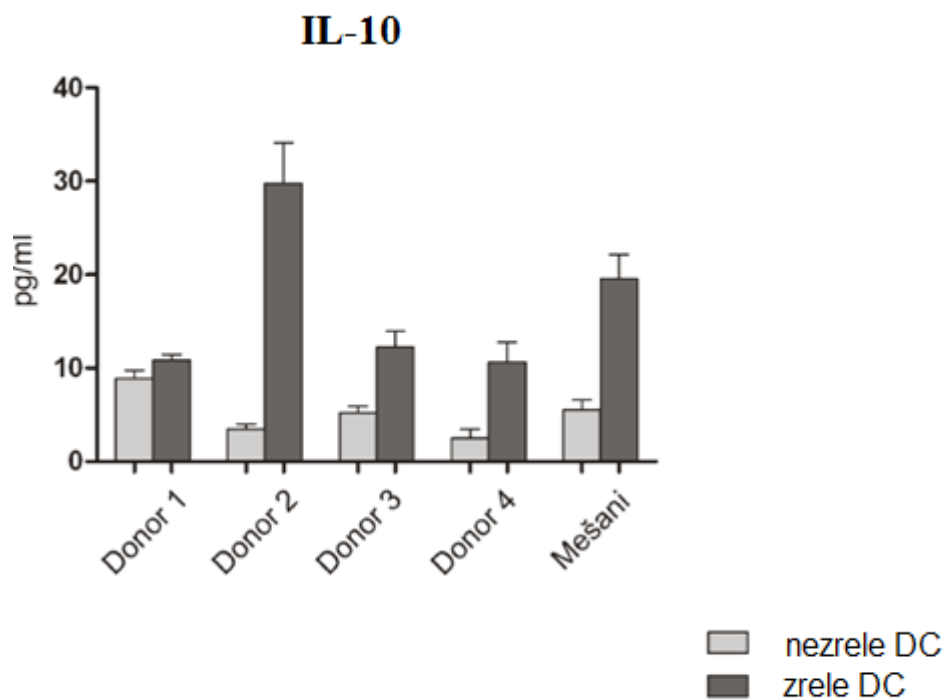
Po petih dneh diferenciacije smo iz nezrelih DC posameznih darovalcev vzpostavili monokulture ali mešane alogenske kokulture, ki smo jih gojili še 48 ur v dveh različnih gojiščih. Prvo je vsebovalo GM-CSF, drugo, aktivacijsko, pa poleg GM-CSF tudi poli (I:C). Po koncu gojenja smo s testom ELISA v supernatantih vseh kultur izmerili količine citokinov IL-10 in IL-12p70. Rezultate treh neodvisnih meritev narejenih v duplikatih prikazuje Slika 9.

Vrednosti koncentracij IL-10 v monokulturah nezrelih DC so se gibale med 3 in 9 pg/ml. V tem območju pa je bila tudi koncentracija IL-10, ki so jo proizvedle nezrele DC v mešanih alogenskih kokulturah. Zrele DC so v vseh primerih izdelovale več IL-10 kot nezrele, nivoji izločenega IL-10 po aktivaciji med posameznimi monokulturami pa so se nekoliko razlikovali. V supernatantih kultur zrelih DC, z izjemo darovalca 2, smo v monokulturah zaznali primerljive količine IL-10, v mešanih alogenskih kokulturah pa so bile v primerjavi z njimi

koncentracije malo višje. Aktivacija DC s poli(I:C) je imela največji vpliv na proizvodnjo IL-10 pri darovalcu 2, nekoliko manj v mešanih alogenskih kokulturah z enakimi deleži DC vseh štirih darovalcev, pri darovalcu 1 pa ni prišlo do bistvenega povečanja koncentracije tega citokina.

Končne vrednosti IL-12p70, biološko aktivne oblike IL-12, so bile tako v kulturah različnih darovalcev kot tudi v mešanih alogenskih kokulturah DC v gojišču brez dodanega zoritvenega dejavnika približno enake. Pravzaprav so bile koncentracije tega provnetnega citokina, ki spodbuja nastanek imunskega odziva vrste  $T_H1$ , v kulturah nezrelih DC zelo nizke, le okoli 1 pg/ml. V kulturah DC z dodanim aktivatorjem pa se izdelovanje IL-12p70 pri darovalcih 2 in 3 ni izraziteje povečalo in je bilo tudi najmanjše v primerjavi z vsemi ostalimi kulturami. Po 48 urah zorenja se je nivo IL-12 najbolj povečal v primeru darovalca 4, in sicer za več kot 10-krat. V mešanih alogenskih kokulturah zrelih DC smo zaznali povečano izdelovanje tega citokina, in sicer v podobnem obsegu kot pri darovalcu 1, ki je bil večji kot v primeru darovalcev 2 in 3 ter manjši kot pri darovalcu 4.

V supernatantih monokultur in mešanih alogenskih kokultur tako nezrelih kot zrelih DC so bile izmerjene koncentracije IL-10 večje od koncentracij IL-12p70. Poleg tega so v kulturah z višjimi nivoji IL-10 dendritične celice pričakovano izdelovale manj IL-12p70, kar je najbolj očitno v primeru zrelih monokultur DC darovalca 2, poleg tega pa tudi darovalcev 1 in 3 ter v mešanih alogenskih kokulturah dozorelih DC. Na osnovi teh opažanj lahko trdimo, da IL-10 zmanjša sposobnost DC, da izdelujejo IL-12p70. Samo v primeru darovalca 4 smo v supernatantih kultur z zreli DC, določili več IL-12p70 kot IL-10.



**Slika 9:** Citokinski profil v supernatantih monokultur in mešanih alogenskih kokultur v nezrelih in zrelih DC. Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih meritev narejenih v duplikatih.

### 4.3 SPOSOBNOST DC ZA INDUKCIJO ALOGENSKEGA IMUNSKEGA ODZIVA

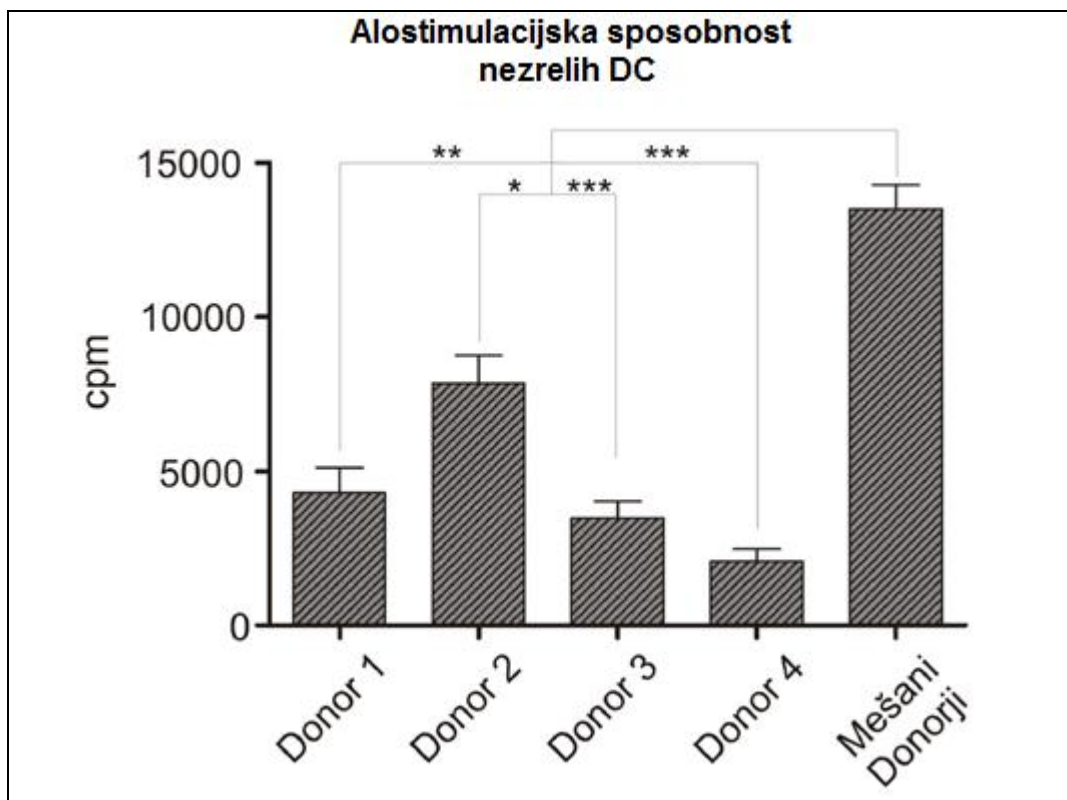
#### 4.3.1 UGOTAVLJANJE PROLIFERACIJSKIH ODZIVOV LIMFOCITOV T PO STIMULACIJI Z ALOGENSKIMI DC

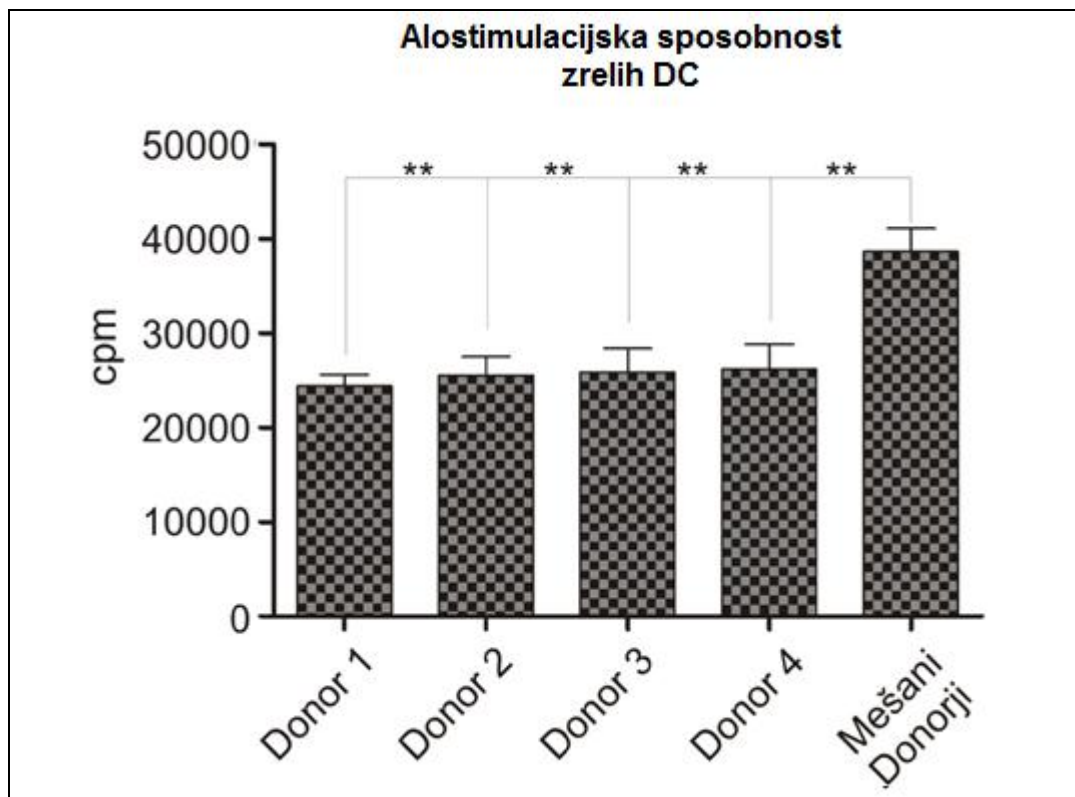
Za določitev alostimulacijskih sposobnosti alogenske mešanice DC, smo celice po petih dneh diferenciacije v gojišču z GM-CSF in IL-4 zbrali in jih po dodatnem gojenju v odsotnosti ali prisotnosti poli(I:C) uporabili kot nezrele oziroma zrele stimulatorje v mešani limfocitni reakciji (MLR). Za odzivne celice smo uporabili celokupne CD4<sup>+</sup> limfocite T, ki smo jih predhodno pripravili in do uporabe zamrznili po postopkih, opisanih v poglavju *Materiali in metode*. Razmerje med dražilnimi in odzivnimi celicami je bilo 1:10. Preden smo DC iz različnih kultur dodali k odzivnim celicam, smo jih inkubirali v prisotnosti mitomicina C in jih nato dobro sprali. V mikrokulture MLR smo peti dan gojenja dodali <sup>3</sup>H-timidin in po dodatnih 18 urah inkubacije izmerili njegovo vgradnjo v DNA delečih se alostimuliranih odzivnih celicah. Količina vgrajenega <sup>3</sup>H-timidina je proporcionalna obsegu proliferacije limfocitov T v posamezni mikrokulturi (cpm). Rezultati na Sliki 10 so predstavljeni kot srednja vrednost dveh neodvisnih meritev ±SD. Statistično pomembnost razlik med posameznimi primerljivimi pari smo določili s pomočjo Studentovega t-testa. (p< 0,05:\*, p< 0,01:\*\*, p< 0,001:\*\*\*).

Razlike v obsegu proliferacijskih odzivov, ki so jih sprožile nezrele DC v monokulturah so bile razmeroma majhne. Izjema so bile le nezrele DC darovalca 2, ki so v primerjavi z ostalimi monokulturami izkazovale enkrat večjo dražilno sposobnost. Večje so bile razlike med alostimulacijskimi sposobnostmi DC iz monokultur in mešanih alogenskih kokultur sestavljenih iz enakih deležev nezrelih DC posameznih darovalcev. Odzivi v mikrokulturah, v katerih smo kot dražilne celice uporabili mešanico nezrelih alogenskih DC, je bil namreč največji, in sicer za več kot 6-krat večji kot v primeru alostimulacije z DC darovalca 4, pri kateri so bile povprečne vrednosti cpm proliferirajočih odzivnih celic sicer najnižje.

V vseh mikrokulturah MLR z zreli DC iz monokultur je bil proliferacijski odziv CD4<sup>+</sup> limfocitov T zelo podoben. Obseg proliferirajočih odzivnih celic po stimulaciji z zreli DC iz mešanih alogenskih kokultur je bil za več kot polovico večji od tistih, ki smo jih izmerili v mikrokulturah, v katerih smo kot dražilne celice uporabili zrele DC posameznih darovalcev.

Proliferacijski odzivi alogenskih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v mikrokulturah MLR je bil ob uporabi nezrelih dražilnih DC, v primerjavi z zreliimi zelo majhen, še posebej v primeru tistih iz monokultur. Zmožnost DC iz monokultur, za sproženje proliferacijskih odzivov v alogenskih MLR, se je po njihovi aktivaciji oziroma dozoritvi v povprečju povečala za približno 4-krat. V enakem obsegu se je povečala sposobnost indukcije proliferacije CD4<sup>+</sup> limfocitov T tudi po uporabi zrelih dražilnih DC iz mešanih alogenskih kokultur.





**Slika 10:** Proliferacijski odziv celokupnih  $CD4^+$  limfocitov T v kulturah MLR z zrelemi in nezrelemi monokulturami oziroma mešano alogensko kokulturo DC. Prikazane so povprečne vrednosti cpm dveh neodvisnih meritev  $\pm$  3SD. Statistično značilna razlika med posameznimi darovalci in mešano alogensko kokulturo: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.3.2 INDUKCIJA EFEKTORSKIH LIMFOCITOV T VRSTE $T_H1$ IZ $CD4^+CD45RA^+$ NAIVNIH LIMFOCITOV T

Polarizacijsko sposobnost različno gojenih DC kot APC smo ovrednotili s spremljanjem citokinskega profila v nastalih efektorskih celicah T iz naivne populacije  $CD4^+CD45RA^+$  limfocitov T. Sveže osamljene naivne limfocite T smo prenesli v mikrokulture z nezrelemi oziroma zrelemi DC, predhodno gojenimi v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah. Po 10 dneh gojenja omenjenih mikrokultur v popolnem gojišču, smo nastale efektorske limfocite T zbrali, jih dodatno 3 ure aktivirali s PMA in ionomicinom, nato pa še 3 ure inkubirali v prisotnosti brefeldina A, s čimer smo inducirali izdelovanje citokinov. Po koncu

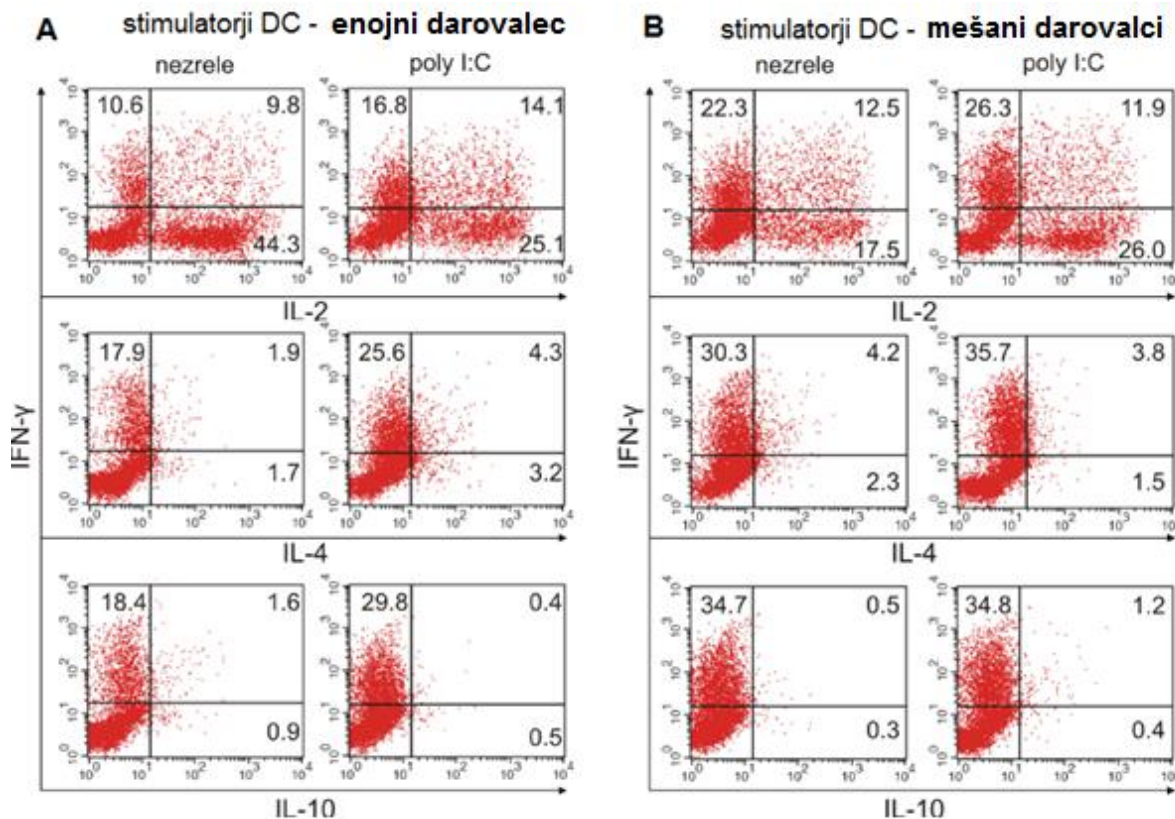
stimulacije smo limfocite T sprali, fiksirali in prepustnost njihovih celičnih membran povečali z dodatkom 0,1% raztopine Tritona X-100, da smo jih lahko intracelularno označili s fluorescenčno označenimi protitelesi anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-2, anti-IL-4 in anti-IL-10. Vzorce smo nato analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati so prikazani na Sliki 11.

Zrele DC omogočajo močno diferenciacijo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v celice vrste T<sub>H</sub>1, ki izdelujejo predvsem IFN- $\gamma$  in skoraj nič IL-10. Delež limfocitov T, ki intenzivno izdelujejo IFN- $\gamma$  je bil največji v tistih mikrokulturah, v katerih smo kot stimulatorje uporabili zrele DC iz mešanih alogenskih kultur. Prav te populacije aktiviranih naivnih limfocitov T so sočasno izdelovale tudi manj IL-4, kot tisti limfociti T, ki smo jih dražili z nezrelimi DC iz mešanih alogenskih kokultur. Sicer pa so bile tudi nezrele DC iz mešanih alogenskih kokultur sposobne stimulirati določen del naivnih limfocitov T, da so izdelovali IFN- $\gamma$ , pri čemer pa je bil njihov delež še enkrat večji kot v mikrokulturah v katerih smo kot APC uporabili nezrele DC posameznih darovalcev.

Deleži limfocitov T, ki so proizvajali IL-4 so bili izredno majhni. Zanimivo je, da se je delež celic, ki so tvorile IL-4 v mikrokulturah, stimuliranih z zreli DC posameznih darovalcev povečal, v tistih, v katerih smo kot APC uporabili zrele DC iz mešanih alogenskih kokultur pa zmanjšal, vendar ne tako izrazito.

Ne glede na prisotnost različno pripravljenih DC kot alostimulatorjev v mikrokulturah z naivnimi limfociti T, so ti poleg velikih količin IFN- $\gamma$  v odzivu na draženje izdelovali tudi velike količine IL-2. V mikrokulturah, ki so vsebovale nezrele DC posameznih darovalcev so proizvajale 2-krat več IL-2, kot v primeru, ko smo jih dražili z mešanico alogenskih nezrelih DC. Deleži limfocitov T, ki so proizvajale IL-2 v mikrokulturah, stimuliranih z zreli DC bodisi iz monokultur ali iz mešanih alogenskih kokultur, so si bili zelo podobni. Kljub temu pa je delež alostimuliranih limfocitov T, ki so izdelovali IL-2 po stimulaciji z DC posameznih darovalcev malo manjši kot v primeru draženja z DC iz mešanih alogenskih kokultur.





**Slika 11:** Sposobnosti DC, različno pripravljenih kultur, da izzovejo polarizacijo  $CD4^+CD45RA^+$  naivnih limfocitov T v smeri imunskega odziva vrste  $T_H1$ .

(A) Populacije limfocitov T in njihovi deleži (%), ki so pozitivno označeni na IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 ali IL-10, po stimulaciji z nezrelimi oziroma zreli DC, predhodno gojenimi v monokulturah

(B) Sposobnost nezrelih in zrelih DC iz mešanih alogenskih kokultur, da inducirajo nastanek različnih deležev (%) limfocitov T, ki proizvajajo IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 ali IL-10

Numerične vrednosti v kvadrantih histogramov predstavljajo odstotke  $CD4^+$  limfocitov T, ki proizvajajo določene citokine. Prikazani so reprezentativni rezultati dveh, med seboj neodvisnih eksperimentov.

## 5 RAZPRAVA

Dendritične celice (DC) so najučinkovitejše antigene predstavljajoče celice (APC) in so ključnega pomena za usklajeno delovanje celotnega imunskega sistema, saj sodelujejo tako pri prirojeni kot pridobljeni oziroma specifični imunosti. Slednja temelji na usmerjenem imunskem odzivu na točno določen antigen, ki je še zlasti pomemben v imunski terapiji rakavih obolenj. Ker so tudi DC, ki jih iz monocitov pripravimo *in vitro*, sposobne sprožiti učinkovite antigensko specifične imunske odzive, je pred njihovo uporabo v terapevtske namene pomembno, da temeljito ovrednotimo njihove fenotipske in funkcijske lastnosti (73). Za imunske terapije raka so do sedaj uporabljali predvsem avtologne, torej bolnikove lastne DC, vedno bolj pa v tem smislu postajajo zanimive alogenske DC. Obe vrsti celic imata potencialne prednosti in slabosti, kaže pa, da bi bila lahko uporaba alogenskih DC v imunski terapiji raka primernejša predvsem zato, ker izhodne celice darujejo zdrave osebe in lahko iz njih lažje pripravimo zadostno število DC *in vitro*. Poleg tega obsežen odziv prejemnikovih CD4<sup>+</sup> limfocitov T na alogenske molekule HLA, izražene na DC nesorodnih ali haploidentičnih sorodnih darovalcev, pripomore k nastanku efektorskih celic T pomagalk, ki nato ustvarijo provnetno okolje in tako sodelujejo v bolnikovem specifičnem imunskem odzivu na, za tumorje značilne antigene (TAA; ang. *Tumor Associated Antigens*) (74). Alogenske DC z izločanjem provnetnih citokinov ustvarijo učinkovito imunostimulacijo okolje, tako na mestu injiciranja kot v bezgavkah, kamor potem migrirajo, s tem pa favorizirajo nastanek efektorskih CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocitov T (CTL), učinkovitih uničevalcev tumorskih celic. Ob zagotovitvi obširnih aloimunskih reakcij pa moramo pri njihovi uporabi poskrbeti za vsaj delno ujemanje med darovalčevimi in bolnikovimi molekulami HLA razreda I, da lahko računamo na specifične imunske odzive pacientovih imunskih celic na TAA (75).

V diplomskem delu smo se osredotočili na spremljanje medsebojnih vplivov DC štirih različnih nesorodnih krvodajalcev tako, da smo jih v enakih deležih gojili v mešanih alogenskih kokulturah. Poleg njihove stabilnosti, izražanja za DC značilnih površinskih molekul in proizvodnje določenih citokinov, nas je še posebej zanimala njihova kumulativna sposobnost sproženja aloimunskega odziva *in vitro*.

V krvi predstavljajo DC razmeroma redko, maloštevilno populacijo celic, kar je dolgo časa oviralo njihovo preučevanje. Prav zato so monociti postali najpogosteje uporabljane predniške celice za pripravo njihovih večjih količin *in vitro* (76). Monocite lahko iz levkocitnega koncentrata osamimo z adhezijo, flotacijo na ustreznih gostotnih gradientih ali pa s pozitivno oziroma negativno selekcijo z imunomagnetnimi kroglicami. Najcenejša med omenjenimi postopki je adhezija, s katero, kljub manjšemu izplenu oziroma deležu monocitov v končni suspenziji, v primerjavi z ostalimi metodami, še vedno lahko zagotovimo zadostno število tovrstnih predniških celic (37, 77).

V pogojih *in vitro* lahko pripravimo tako zrele, aktivirane DC, ki izzovejo močan imunski odziv, kot tolerogene DC, ki povzročijo nastanek antigensko specifične imunske neodzivnosti. Novejše raziskave so pokazale, da z uporabljenim načinom aktivacije nezrelih DC *in vitro* specifično vplivamo na lastnosti končnega celičnega pripravka in s tem na vrsto imunskega odziva, ki ga lahko z njim izzovemo (78). V diplomski nalogi smo se usmerili v pripravo alogenskih DC v mešanih kulturah *in vitro* z namenom, da bi dokazali primernost tega pristopa za potrebe imunske terapije raka, s katero želimo izzvati nastanek čim večjega števila efektorskih CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocitov, ki lahko specifično ubijajo tarčne tumorske celice.

Z invertnim svetlobnim mikroskopom smo primerjalno spremljali morfologijo DC tako v njihovih monokulturah kot v mešanih alogenskih kokulturah, v katerih smo skupaj gojili enake deleže celic vseh štirih nesorodnih darovalcev. Morfološke značilnosti DC so namreč pogosto prvi pokazatelj uspešnosti njihove diferenciacije in stopnje njihove zrelosti (79). Opazili smo, da so bile nezrele DC v obeh vrstah celičnih kultur po koncu diferenciacije nepritrjene in nepravilnih oblik ter brez izrazitih izrastkov in večje od monocitov (rezultatov nismo prikazali). Tako kot ostali levkociti, se morajo tudi DC v fiziološkem okolju najprej pritrditi na endotelij, preden lahko migrirajo v tkiva in od tu, po morebitnem prejemu aktivacijskega signala, v sekundarne limfatične organe. V pogojih *in vitro* so se nezrele DC po dodatku zoritvenega dejavnika, poli(I:C), najprej hitro in v velikem obsegu pritrdile na površine gojilnih posod, nato pa se po določenem času sprostile in tvorile celične skupke v suspenziji, ki jih je bilo, v primerjavi z monokulturami, več v mešanih alogenskih kokulturah. Tako v primeru monokultur kot mešanih alogenskih kokultur zrelih DC nismo opazili razlik v

obsegu izražanja za te celice značilnih izrastkov, ki so bili v obeh primerih številni. Ugotovili smo torej, da gojenje DC v mešanih alogenskih kokulturah ni vplivalo na njihove morfološke lastnosti, saj so bile tako nezrele kot zrele DC v njih po izgledu povsem enake kot tiste, ki smo jih gojili v monokulturah. Na osnovi rezultatov, ki smo jih dobili pri spremljanju različno gojenih DC, izzvane proliferacije alogenskih limfocitov T in posledičnega nastanka efektorskih celic vrste  $T_H1$ , lahko sklepamo, da večja zmožnost oblikovanja skupkov v mešanih alogenskih kokulturah dozorevajočih DC ne vpliva na njihovo alostimulacijsko učinkovitost.

Na uravnavanje imunskega odziva pomembno vpliva preživetje DC, saj lahko njihova apoptoza znatno omeji prepoznavanje tarčnih celic z antigensko specifičnimi efektorskimi CTL (19). Prav zaradi tega dejstva smo se želeli prepričati ali so alogenske DC v mešanih kokulturah primerne za nadaljno manipulacijo in uporabo v različne terapevtske namene, vključno s pripravo protitumorskih vakcin *ex-vivo*. Z določanjem deležev živih, mrtvih in apoptotičnih DC smo ugotovili, da so bile mešane kokulture alogenskih DC nesorodnih darovalcev stabilne in da tovrstno gojenje ni vplivalo na obseg izmerjene apoptoze, v primerjavi z monokulturami omenjenih celic. Mešane alogenske kokulture nezrelih DC so bile popolnoma stabilne v obdobju do 72 ur, kar pomeni, da medsebojne interakcije med njimi niso bile takšne, da bi vplivale na njihov soobstoj v omenjenih pogojih gojenja *in vitro*. Deleže mrtvih in apoptotičnih DC smo spremljali tudi med njihovim zorenjem v različno pripravljenih kulturah. Po 3 dneh gojenja v prisotnosti izbranega zoritvenega dejavnika poli(I:C) je bilo preživetje DC v mešanih alogenskih kokulturah celo nekoliko večje kot v monokulturah.

Prisotnost apoptotičnih in mrtvih celic v monokulturah nezrelih DC, kjer ni aloimunskih interakcij, kaže na to, da so nekatere celice posameznih oseb manj odporne in zato lahko propadejo že med začetno usmerjeno diferenciacijo monocitov. Deleži mrtvih in apoptotičnih celic v kulturah nezrelih in zrelih DC so torej nedvomno odvisni od kakovosti izhodne celične populacije oziroma levkocitnih koncentratov, pripravljenih iz periferne krvi zdravih prostovoljcev, poleg tega pa tudi od postopkov manipulacije in gojenja celičnih kultur. Upoštevati moramo dejstvo, da lahko razlike med posameznimi celičnimi vzorci izvirajo tudi iz trenutnega zdravstvenega stanja, morda tudi stresa vsakega posameznega darovalca v času

odvzema krvi ter seveda od že omenjenih neizogibnih interindividualnih razlik v občutljivosti krvnih celic.

Pomembna procesa v življenjskem ciklu DC sta njihova diferenciacija iz celic predhodnic in aktivacija oziroma zorenje po prejemu aktivacijskih dražljajev. Za razliko od DC, ki jih najdemo v perifernih tkivih, izražajo tiste, ki jih pripravimo v prisotnosti GM-CSF in IL-4 iz monocitov *in vitro*, več HLA-DR in kostimulacijskih molekul (12). Za pripravo zrelih DC se uporabljajo različni dejavniki zorenja (80). Želeli smo ugotoviti ali se DC v alogenskih mešanih kokulturah, v prisotnosti oziroma odsotnosti aktivacijskega signala, bistveno razlikujejo od tistih, ki smo jih pod enakimi pogoji gojili v posameznih monokulturah. V ta namen smo kot zoritveni dejavnik uporabljali poli(I:C), ki je agonist receptorjev TLR3, in s katerim lahko pripravimo popolnoma zrele DC (81).

Izražanje kostimulacijskih molekul CD80 in CD86 na površinah DC, pripravljenih iz monocitov rakavih bolnikov je pogosto slabše kot v primeru istovrstnih celic zdravih oseb. Take DC zato izkazujejo nezreli fenotip, zaradi česar imajo slabšo sposobnost za stimulacijo T-celičnega imunskega odziva (82). To pa pomeni, da bi bila uporaba, v pogledu tkivnih antigenov HLA, z rakavimi bolniki vsaj delno skladnih alogenskih DC zdravih oseb, namesto avtolognih, potencialno primernejša za imunsko terapijo te hude bolezni. Eden izmed ciljev diplomske naloge je bila tudi primerjava morebitnih vplivov različnih načinov gojenja na fenotipe nezrelih in zrelih DC, saj v strokovni literaturi nismo zasledili podatkov o tem, kako nanje vplivajo mešane alogenske kokulture omenjenih celic. Izražanje površinskih molekul, ki so značilne za nezrele in zrele DC smo opredelili z analizo rezultatov pretočne citometrije.

Nezrele DC, diferencirane iz monocitov, smo po petih dneh gojenja v enakih deležih uporabili za pripravo njihovih mešanih alogenskih kokultur, ki smo jih nato, v prisotnosti oziroma odsotnosti poli(I:C), gojili še nadaljnjih 48 ur. Nezrele DC so v mešanih alogenskih kokulturah izražale majhno število kostimulacijskih molekul CD80 in CD86 ter kemokinskih receptorjev CCR7, ob tem pa povečano količino molekul HLA-DR. Sicer pa med nezrelimi DC iz monokultur in tistimi iz mešanih alogenskih kokultur nismo zaznali statistično značilnih razlik v izražanju izbranih površinskih molekul. Zato lahko trdimo, da gojenje nezrelih alogenskih DC v mešanih kokulturah ne vpliva na njihove fenotipske lastnosti.

Najizraziteje so mešane kokulture nezrelih in zrelih alogenskih DC izražale molekule HLA-DR. Aktivacija nezrelih DC je najbolj vplivala na izražanje molekul CD86, najmanj pa na obseg izraženosti kemokinskih receptorjev CCR7. Naši rezultati tako potrjujejo že objavljene izsledke o različnih profilih izražanja značilnih površinskih molekul na nezrelih in zrelih DC (4). S poli(I:C) smo v vseh eksperimentih uspeli pripraviti homogene populacije zrelih DC, pri čemer pa omenjene celice tako v monokulturah kot mešanih alogenskih kokulturah niso povečale izražanja kemokinskega receptorja (CCR7), ki je nujen za njihovo migracijo. Za migracijsko sposobnost zrelih DC v sekundarne limfatične organe samo izražanje molekul CCR7 še ne zadošča. Ta ugotovitev temelji na poskusu, ki so ga izvedli Scandella in sodelavci. Dokazali so namreč, da je v pogojih *in vivo* in *in vitro* funkcija molekul CCR7 odvisna tako od obsega kostimulacijskih signalov kot tudi od lokalnega vnetnega mikrookolja (83). Razlike v koncentracijah molekul CD80, CD86 in CCR7, ki smo jih s pretočno citometrijo določili na površinah zrelih alogenskih DC v mešanih kokulturah, so bile v primerjavi s tistimi, izmerjenimi na enaki vrsti celic iz monokultur, minimalne. Izmerjene količine molekul HLA-DR na zrelih DC v mešanih alogenskih kokulturah pa so bile večje kot na tovrstnih celicah iz vsake od njihovih monokultur. Morda lahko soobstoj zrelih alogenskih DC v isti kokulturi preko določenih mehanizmov poveča izražanje molekul HLA razreda II, ki so tudi najmočnejši aloantigeni, na njihovi površini. Sicer pa je znano, da na povečano izražanje omenjenih molekul še posebej močno vplivata citokina GM-CSF in IFN- $\gamma$ . Kakorkoli že, rezultati naših eksperimentov kažejo na to, da lahko v mešanih alogenskih kokulturah aktiviranih DC zelo uspešno vzdržujemo njihov zreli fenotip.

Najbolj je izražanje površinskih molekul, v primerjavi z ostalimi monokulturami zrelih DC, odstopalo pri darovalcu 3. Na podlagi te ugotovitve lahko trdimo, da so med celicami posameznih darovalcev prisotne pomembne razlike, na katere seveda ne moremo vplivati. Pri pripravi cepiv za imunsko terapijo, v obliki mešanih alogenskih DC, pa bi lahko že na začetku izbrali le celice tistih darovalcev, ki imajo za ta namen uporabe ugodnejši fenotip oziroma večjo ekspresijo določenih površinskih molekul.

Stopnjo zrelosti DC bi bilo smiselno potrditi še z ugotavljanjem izražanja molekul CD40, ki imajo pomembno vlogo pri polarizaciji limfocitov T, saj njihova interakcija z ligandi, molekulami CD40L, spodbudi izdelovanje IL-12 v DC (84). Tudi z določanjem

obsega izražanja površinskih molekul CD83, ki so značilne samo za zrele DC bi lahko še dodatno opredeljevali razlike v fenotipih zrelih DC, aktiviranih s poli(I:C), v njihovih mešanih alogenskih kokulturah in monokulturah. Prechtel in sod. so ugotovili, da ima izražanje molekul CD83 na površini zrelih DC velik vpliv na proliferacijo z njimi stimuliranih limfocitov T (85). To pa pomeni, da bi lahko bil v našem primeru morebiten večji obseg izražanja molekul CD83 tudi pokazatelj večje alostimulacijske sposobnosti zrelih DC, gojenih v mešanih alogenskih kokulturah.

Sposobost zrelih DC, da izdelujejo IL-12 je pomembna za nastajanje efektorskih CD4<sup>+</sup> limfocitov T, ki nato izdelujejo IFN- $\gamma$  in usmerjajo imunski odziv v smeri T<sub>H</sub>1 (80). Aktivacija DC s poli(I:C) je sicer v naših poskusih povzročila povečanje izdelovanja aktivne oblike IL-12, IL-12p70, vendar pa so bile njegove koncentracije v zelo nizkem območju (pg/ml), in to tako v mešanih alogenskih kokulturah kot v monokulturah. Ta pojav bi lahko razložili na več načinov. Ena od možnosti, čeprav malo verjetna je, da bi na to lahko vplivala starost krvodajalcev. Della Bella in sod. so namreč dokazali, da je celoten proces diferenciacije APC pri starejših osebah vsaj delno spremenjen. Poleg tega so ugotovili, da so DC starejših posameznikov, ki so bili vključeni v študijo, sicer izražale zrelejši fenotip, obenem pa imele slabšo sposobnost proizvodnje IL-12 (86). Vse meritve koncentracij IL-12p70 smo opravili tik po končanem zorenju, torej po 2 dneh gojenja nezrelih DC v prisotnosti poli(I:C). V tem času bi se dozorele DC lahko izčrpale in ne bi bile več sposobne izdelovati takih količin IL-12p70 kot na začetku zorenja. Za zanesljiv dokaz tega vzroka pa bi morali izvesti dodatne meritve v več časovnih intervalih, saj je precej verjetno, da koncentracija IL-12p70 do nekega trenutka narašča, nato pa se njegovo izdelovanje ustavi. Naše rezultate lahko primerjamo z izsledki študije, ki so jo opravili de Jong in sod. in v kateri so pri preučevanju vpliva različnih snovi mikrobnega izvora na DC ugotovili, da IL-12 ni nujno potreben za nastanek celic vrste T<sub>H</sub>1. Dendritične celice, dozorene s poli(I:C), ki je sintezni analog virusne dvoverižne RNA, so namreč spodbudile nastanek imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1, čeprav niso proizvajale večjih količin IL-12p70 (87).

Vrednosti koncentracij IL-10, ki smo jih izmerili v supernatantih različnih kultur nezrelih DC, so bile v vseh primerih nizke. Po aktivaciji s poli(I:C) pa so se koncentracije tega citokina tako v monokulturah kot mešanih kokulturah alogenskih DC sicer zvišale, a le za

nekaj pg/ml. S testom ELISA smo po zorenju DC v obeh vrstah celičnih kultur izmerili koncentracije v območju od 10 do 30 pg/ml. Te vrednosti so za okoli 1000-krat nižje kot tiste, določene v študiji, ki so jo izvedli Langenkamp in sod., a pri tem za aktivacijo DC uporabili LPS (30). Znano je, da IL-10 zavira nastajanje IL-12, s čimer preprečuje tudi imunski odziv vrste  $T_H1$  (88). Tega njegovega učinka v našem delu nismo mogli z gotovostjo potrditi, saj smo v supernatantih kultur, tako nezrelih kot zrelih DC, izmerili zelo nizke količine obeh citokinov, pri čemer pa obseg proizvodnje IL-10 ni bil bistveno večji od obsega izdelovanja IL-12p70. Furio in sod. pa so z merjenjem koncentracij obeh omenjenih citokinov v supernatantih kultur Langerhansovih celic (LC), ki so jih prav tako zoreli s poli(I:C), dobili rezultate, podobne našim (89). Kljub temu lahko potrdimo našo hipotezo, da pogoji gojenja v mešanih kokulturah, ki vsebujejo enake deleže alogenskih DC različnih oseb, ne vplivajo na koncentracijski profil IL-10 in IL-12p70, saj je bil ta povsem primerljiv s tistimi, izmerjenimi v monokulturah DC posameznih darovalcev.

Ugotovili smo, da sta v tem smislu izstopali le monokulturi DC darovalcev 2 in 4. Zrele DC prvega so, v primerjavi z ostalimi, proizvajale večje količine IL-10 in le malo IL-12p70, zato najverjetneje ne bi bile sposobne izzvati dovolj učinkovitih protitumorskih imunskih odzivov vrste  $T_H1$ . Po drugi strani pa bi bil kot vir celic za pripravo cepiv na osnovi alogenskih DC, verjetno od vseh najbolj primeren darovalec 4, saj so njegove zrele DC izdelovale največ IL-12p70 in najmanj IL-10.

Po aktivaciji se DC spremenijo morfološko, fenotipsko in tudi funkcijsko. Tesni stiki med alogenskimi DC in limfociti T omogočijo sproženje obsežne proliferacije slednjih, kar smo preverjali s funkcijskim testom MLR *in vitro*. Ta predstavlja standardni model za ocenjevanje aktivacijske sposobnosti DC in odzivnosti alogenskih limfocitov T *in vitro*. Domnevali smo, da bodo tudi DC, gojene v mešanih alogenskih kokulturah, ohranile sposobnost za učinkovito sproženje proliferacije alogenskih limfocitov T. Da bi to dokazali, smo pripravili mikrokulture MLR, v katerih smo DC in limfocite T gojili v razmerju 1:10. S tem testom smo poleg tega ugotavljali tudi stopnjo dozorelosti DC, predhodno gojenih v mešanih alogenskih kokulturah.

Z merjenjem obsega apoptoze smo ugotovili, da so bili deleži živih celic tudi po 72 urah gojenja še vedno približno 80%. To pomeni, da je uporabljeno število dražilnih DC zadoščalo



za uspešno stimulacijo in proliferacijo alogenskih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v 4-dnevnih mikrokulturah MLR. Na jakost aktivacije limfocitov T pomembno vplivajo koncentracije kostimulacijskih molekul in molekul HLA z vezanimi antigenimi peptidi ter trajanje tesnih interakcij med dražilnimi APC in odzivnimi limfociti T (90). V naših poskusih so se DC, zorene v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah, razmeroma malo razlikovale v obsegu izražanja kostimulacijskih molekul. Zrele DC iz mešanih alogenskih kokultur pa so v primerjavi z istovrstnimi celicami, gojenimi v monokulturah, izražale nekaj več molekul HLA-DR. Proliferacijski odzivi alogenskih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v mikrokulturah MLR, ki so vsebovale zrele DC iz mešanih alogenskih kokultur, v funkciji dražilnih celic, so bili večji, v primerjavi s tistimi mikrokulturami, v katerih smo kot APC uporabili zrele DC iz monokultur posameznih darovalcev (Slika 10). Ta pojav bi bil lahko vsaj delno posledica malo višjih koncentracij molekul HLA-DR, izraženih na zrelih DC, ki smo jih predhodno gojili v mešanih alogenskih kokulturah. Predvsem pa je zanj odgovorno dejstvo, da smo v omenjenih kulturah sočasno gojili DC različnih nesorodnih oseb, ki se med seboj razlikujejo v več, če že ne v vseh antigenih HLA-DR. Zaradi tega takšna mešanica DC lahko aktivira bistveno večje število klonov alogenskih CD4<sup>+</sup> limfocitov T, kot DC posameznih darovalcev. Za aloimunski odziv na tuje antigene HLA pa velja, da sodi med najobširnejše, saj lahko v njem sodeluje kar 1-10% vseh limfocitov T (72). Preučevali smo tudi ali nezrele DC, gojene v mešanih alogenskih kokulturah, v primerjavi s tistimi iz posameznih monokultur, učinkoviteje aktivirajo alogenske limfocite T. Ugotovili smo, da so v tistih mikrokulturah MLR, v katerih smo kot dražilne celice uporabili nezrele DC posameznih darovalcev, limfociti T proliferirali slabše kot v odzivu na stimulacijo z istovrstnimi APC iz mešanih alogenskih kokultur. Pri tem pa je bil seveda ta odziv precej manjši kot v primerih, ko smo kot dražilne celice uporabili različno gojene zrele alogenske DC. To je posledica znanih in dobro opisanih razlik v alostimulacijskih sposobnostih nezrelih in zrelih DC (91). Nezrele DC so tako v monokulturah kot v mešanih alogenskih kokulturah na svojih površinah izražale razmeroma majhno število kostimulacijskih molekul (CD80, CD86). Posledično je bilo manj interakcij z njihovim ligandom CD28, izraženim na odzivnih limfocitih T in zato tudi manj kostimulacijskih signalov, nujno potrebnih za učinkovit celični imunski odziv. Vse vrste kultur DC smo gojili enako dolgo, zato lahko predvidevamo, da je bila intenzivnost proliferacijskega odziva

alogenskih limfocitov T, odvisna tudi od življenjske dobe teh najučinkovitejših APC. Deleži nezrelih in zrelih apoptotičnih DC v mešanih alogenskih kokulturah so bili manjši kot v njihovih posameznih monokulturah. Zaradi tega bi lahko sklepali, da je bilo preživetje DC iz mešanih alogenskih kokultur boljše tudi v mikrokulturah MLR, kjer smo jih uporabili kot dražilne celice in so zato delno tudi na ta račun močnejše aktivirale limfocite T. Da bi to dejansko dokazali pa bi seveda morali izvesti večje število poskusov.

Za nastanek učinkovitega imunskega odziva sama proliferacija ustreznih klonov limfocitov T še ne zadošča. Po klonski ekspanziji se namreč CD4<sup>+</sup> limfociti T lahko diferencirajo v dva osnovna tipa efektorskih celic, T<sub>H</sub>1 in T<sub>H</sub>2. Te proizvajajo za vsako celično vrsto značilne citokine in na ta način vplivajo na aktivacijo efektorskih mehanizmov, ki nato na različne načine prispevajo k odstranitvi oziroma uničenju antigenov. Za preučevanje polarizacijske sposobnosti alogenskih DC, gojenih v enakih deležih v mešanih kokulturah *in vitro*, smo v z njimi stimuliranih CD4<sup>+</sup> limfocitih T, s pomočjo pretočnega citometra določali znorajcelične koncentracije najpomembnejših citokinov, značilnih za imunska odziva vrste T<sub>H</sub>1 in T<sub>H</sub>2. Medtem ko sta glavna efektorska citokina imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1, IFN- $\gamma$  in IL-2, pa odziv vrste T<sub>H</sub>2 usmerjata predvsem IL-4 in IL-10. Pri tem citokini vrste T<sub>H</sub>1 zavirajo razvoj imunskega odziva, ki ga posredujejo citokini T<sub>H</sub>2, seveda pa velja tudi obratno (29).

S postopkom znotrajceličnega določanja citokinov v naivnih CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> limfocitih T, ki smo jih stimulirali z različno pripravljenimi alogenskimi DC, smo izmerili najvišje koncentracije v primeru IFN- $\gamma$  in IL-2 in najnižje za IL-4 in IL-10. Na to niso vplivali niti način gojenja, torej monokulture ali mešane kokulture, niti uporaba bodisi nezrelih ali zrelih alogenskih DC. Ugotovili smo tudi, da so bile koncentracije IL-12p70 po zorenju v monokulturah in mešanih alogenskih kokulturah nizke, zato ne moremo trditi, da je obseg njegovega izdelovanja v zrelih DC bistveno prispeval k proizvodnji IFN- $\gamma$  v aktiviranih limfocitih T. Kljub temu pa smo s stimulacijo naivnih limfocitov T v vseh primerih uspešno izzvali nastanek imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1. Do enakih izsledkov kot mi, so prišli tudi de Jong in sod. ter z uporabo živalskega modela, v katerem so uporabili DC, pripravljene iz mielodnih progenitornih celic iz kostnega mozga mišk NOD, tudi Feili-Hariri in sod. (87, 33). V eni od naših hipotez smo predpostavili, da bodo mešane alogenske kokulture DC zaradi večjega nabora različnih molekul HLA razreda II lahko zelo učinkovito sprožile aloimunske

odzive limfocitov T. Dejansko se je izkazalo, da smo z njimi v 10 dneh, po enkratni stimulaciji alogenskih naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T, uspeli pripraviti večje število efektorskih celic, ki so proizvajale veliko IFN- $\gamma$  ter skoraj nič IL-4 in IL-10, kar je značilno za citokinski profil zelenega imunskega odziva vrste T<sub>H</sub>1. Delež takih limfocitov T pa je bil največji prav v tistih mikrokulturah, v katerih smo kot dražilne celice uporabili zrele DC, predhodno gojene v mešanih alogenskih kokulturah. Prav te so na svojih površinah, v primerjavi s tistimi iz monokultur zrelih DC posameznih darovalcev, izražale večji nabor različnih molekul HLA razreda II, s čimer smo nedvomno potrdili omenjeno hipotezo.

V naših poskusih pa so se tudi nezrele alogenske DC izkazale s svojo sposobnostjo polarizacije T-celičnih odzivov v smeri T<sub>H</sub>1, in sicer še posebej takrat, ko smo kot APC v mikrokulturah MLR uporabili tiste, predhodno gojene v mešanih kokulturah. Pri tem je bilo razmerje deležev populacij limfocitov T, ki so izdelovali IFN- $\gamma$  in tistih, ki so proizvajali IL-4 sicer pričakovano manjše kot v primeru uporabe dražilnih celic iz mešanih alogenskih kokultur zrelih DC, obenem pa celo večje kot v mikrokulturah, v katerih smo limfocite T stimulirali z zreli alogenskimi DC iz monokultur. Z metodo znotrajceličnega barvanja citokinov smo tako ugotovili, da lahko z gojenjem tako nezrelih kot zrelih DC v mešanih alogenskih kokulturah zagotovimo, da kot APC v alogenskih mikrokulturah MLR *in vitro* zelo učinkovito izzovejo imunski odziv vrste T<sub>H</sub>1, ki je ključnega pomena za nastanek efektorskih CTL.

Naših rezultatov sicer nismo mogli neposredno primerjati s podatki iz literature, saj so praktično vse tovrstne raziskave *in vitro* opravili z avtolognimi in ne z alogenskimi DC, poleg tega pa so pri tem za določevanje citokinov uporabljali druge metode, zlasti tiste, ki temelje na tehniki ELISA. Zaradi lažje oziroma preglednejše predstavitve rezultatov za vsakega od preiskovanih citokinov smo prikazali le reprezentativne rezultate, ki smo jih v alogenskih odzivnih limfocitih T izmerili po stimulaciji z DC posameznega izbranega darovalca, v primerjavi s tistimi, ki smo jih v omenjenih celicah določili po uporabi dražilnih DC iz mešanih kokultur. Pri tem pa se moramo zavedati, da so citokinski odzivi zdravih oseb različni in odvisni od njihove starosti in spola, trenutnega zdravstvenega stanja ter psihičnega in fizičnega stresa ob odvzemu krvi, nenazadnje pa tudi od same manipulacije krvnih vzorcev (92).

Naši izsledki predstavljajo osnovo za nadaljnje raziskave na področju preučevanja medsebojnih vplivov alogenskih DC. Ker je vrsta imunskega odziva pri malignih obolenjih zelo pomembna, si želimo, da bi z uporabo cepiv na osnovi DC v čim večjem obsegu spodbudili nastanek imunskega odziva vrste  $T_H1$ . Kljub temu, da alogenske DC v mešanih kokulturah *in vitro* niso medsebojno reagirale tako, da bi to oslabilo njihovo sposobnost stimulacije proliferacije alogenskih  $CD4^+$  limfocitov T ter nastanka celic  $T_H1$  *in vitro*, pa bi morali natančneje raziskati vplive tega načina gojenja na njihovo sposobnost izdelovanja citokinov. Dejstvo je tudi, da se osamljene celice v pogojih *in vitro* obnašajo drugače kot *in vivo*, še zlasti, če jih moramo spodbujati k izdelovanju citokinov. Poleg tega predvidevamo, da bi bili imunski odzivi po uporabi teh DC *in vivo* manjši, kot pa smo jih izmerili *in vitro*, saj v tumorskem tkivu prevladujejo številni lokalni mehanizmi, ki aktivno zavirajo delovanje imunskega sistema (93). Pred terapevtsko uporabo alogenskih DC v obliki protitumorskih cepiv bi torej morali prilagoditi postopek njihove priprave tako, da bi kar najbolj povečali njihovo učinkovitost. Danes namreč vemo, da lahko DC, ki jih na ustrezen način pripravimo *in vitro*, uspešno prekinejo neodzivnost limfocitov T na tumorske celice *in vivo* (63).

## 6 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo spremljali in vrednotili medsebojne vplive DC, pripravljenih iz monocitov štirih zdravih nesorodnih oseb. V ta namen smo jih v enakih deležih gojili v mešanih alogenskih kokulturah *in vitro* ter izsledke vseh preučevanih parametrov primerjali s tistimi, ki smo jih izmerili ob uporabi DC posameznih darovalcev, gojenih v monokulturah. Alogenske DC lahko brez medsebojnih aktivacijskih in inhibicijskih vplivov gojimo in shranjujemo v mešanica, v katerih so zastopane v enakem številu, saj so bile naše ugotovitve naslednje:

1. Gojenje DC v mešanih alogenskih kokulturah nima večjega vpliva na njihove morfološke lastnosti, saj se tako nezrele kot zrele DC v vseh spremljanih parametrih niso razlikovale od tistih, ki smo jih vzdrževali v monokulturah. Edina opaznejša razlika je bila večja sposobnost tvorbe celičnih skupkov v mešanih alogenskih kokulturah zrelih DC.
2. Mešane alogenske kokulture tako nezrelih kot zrelih DC so stabilne tudi skozi daljše časovno obdobje (72 ur).
3. V mešanih alogenskih kokulturah lahko uspešno vzdržujemo značilna fenotipa tako nezrelih kot zrelih DC, pri čemer izražajo slednje več molekul HLA razreda II kot tovrstne celice iz monokultur.
4. Nezrele in zrele DC iz mešanih alogenskih kokultur, podobno kot tiste iz posameznih monokultur, proizvajajo nekaj več IL-10 kot IL-12.
5. Tako nezrele kot zrele alogenske DC iz mešanih kokultur, v primerjavi s tistimi iz posameznih monokultur, učinkoviteje stimulirajo limfocite T *in vitro*.
6. Z znotrajceličnim določanjem citokinov v aktiviranih limfocitih T smo dokazali nastanek specifičnega imunskega odziva vrste  $T_H1$ , ki ga učinkovito sprožijo tako nezrele kot zrele alogenske DC iz mešanih kokultur. To, da so tudi nezrele DC iz mešanih kokultur uspešne pri želeni polarizaciji naivnih alogenskih limfocitov T, je najverjetneje posledica dejstva, da na svojih površinah izražajo večji obseg različnih molekul HLA razreda II.

Na osnovi določanja fenotipskih in funkcijskih lastnosti DC, gojenih v posameznih monokulturah, lahko pred izbiro darovalcev za pripravo mešanice alogenskih DC za

terapevtske namene, preverimo, kakšne so njihove individualne lastnosti. Za izdelavo protitumorskih cepiv iz alogenskih DC, moramo namreč zagotoviti, da imajo te profesionalne APC ustrezne proznetne citokinske profile, učinkovite alostimulacijske sposobnosti in da so v določenih alelskih različicah molekul HLA skladne z bolnikovimi, saj lahko le na ta način omogočimo ustrezno predstavljanje s tumorji povezanih antigenov pacientovim limfocitom T.

## 7 LITERATURA

1. Kondoh H, Okano S, Yoshida K, Yonemitsu Y, Tomita Y, Yoshikai Y, Wake N, Sueishi K. Semi-allogeneic dendritic cells injected via the intratumoural injection route show efficient antitumour effects in cooperation with host-derived professional antigen-presenting cells. *Scand J Immunol.* 2010. 72(6):476-90.
2. Becker Y. Milestones in the research on skin epidermal Langerhans/dendritic Cells (LCs/DCs) from the discovery of Paul Langerhans 1868-1989. *Virus Genes.* 2003. 26(2):131-4.
3. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterisation of human blood dendritic cell subset. *Blood.* 2002; 100(13):4512-20.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000. 18:767-811.
5. Shortman K, Liu YJ. Mouse and dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002. 2(3):151-61.
6. Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, Yuan J, Dao T, Reagan JL, Münz C, Heller G, Youn JW. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2004. 173(4): 27810-91.
7. Van Krinks CH, Matyszak MK, Hill Gaston JS. Characterization of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory arthritis synovial fluid. *Rheumatology.* 2004. 43(4):453-460.
8. Guermonperez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002. 20:621-67.
9. Gad M, Claesson MH, Pedersen AE. Dendritic cell in peripheral tolerance and immunity. *AMPIS.* 2003. 111: 766-75.
10. Bergant M. Dendritične celice transficirane s celokupno tumorsko RNA-učinkoviti aktivatorji specifičnih protitumorskih imunskih odzivov *in vitro*. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. 2006. 120 strani.
11. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000. 191(3):411-6.
12. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002. 23(9):445-9.

13. Matthews KE, Qin JS, Yang J, Hermans IF, Palmowski MJ, Cerundolo V, Ronchese F. Increasing the survival of dendritic cells *in vivo* does not replace the requirement for CD4<sup>+</sup> T cell help during primary CD8<sup>+</sup> T cell response. *J Immunol.* 2007. 179(9):5738-47.
14. Chang WL, Baumgarth N, Eberhardt MK, Lee CY, Baron CA, Gregg JP, Barry PA. Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous IL-10 during maturation determines their longevity. *J Immunol.* 2007. 178(12):7794-804.
15. Park Y, Lee SW, Sung YC. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulation cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositol-3-OH kinase pathway. *J Immunol.* 2002. 168(1):5-8.
16. Chino T, Draves KE, Clark EA. Regulation of dendritic cell survival and cytokine production by osteoprotegerin. *J Leukoc Biol.* 2009. 86(4):933-40.
17. Cremer I, Dieu-Nosjean MC, Maréchal S, Dezutter-Dambuyant C, Goddard S, Adams D, Winter N, Menetrier-Caux C, Sauntès-Fridman C, Fridman WH, Mueller CG. Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction. *Blood.* 2002. 100(10):3646-55.
18. Illario M, Giardino-Torchia ML, Sankar U, Ribar TJ, Galgani M, Vitiello L, Masci AM, Bertani FR, Ciaglia E, Astone D, Maulucci G, Cavallo A, Vitale M, Cimini V, Pastore L, Means AR, Rossi G, Racioppi L. Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. *Blood.* 2008. 111(2):723-31.
19. Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J. Regulation of the lifespan in dendritic cell subset. *Mol Immunol.* 2007. 44(10):2558-65.
20. Storni T, Bachmann MF. Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative *in vivo* comparison. *J Immunol.* 2004. 172(10):6129-35.
21. Dissanayake SK, Tuera N, Ostrand-Rosenberg S. Presentation of endogenously synthesized MHC class II-restricted epitopes by MHC class II cancer vaccines is independent of transporter associated with Ag processing and proteasome. *J Immunol.* 2005. 174:1811-1819.
22. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat Rev Immunol.* 2007. 7(7):543-55.
23. Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanism governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol.* 2004. 5(7):678-84.
24. Repnik U. Zorenje dendritičnih celic in njihov vpliv v alogenskem imunskem odzivu *in vitro*. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. 2005. 118 strani.
25. Shao JY, Yu Y, Dustin ML. A model for CD2/CD58-mediated adhesion strengthening. *Ann Biomed Eng.* 2005. 33(4):483-93.



26. Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. 107(39):16916-21.
27. Male D, Brostoff J, Roth BD, Roitt I. *Immunology*. 2006. 7th Edition. Elsevier Mosby, Philadelphia.
28. Gogolák P, Réthi B, Hajas G, Rajnavölgyi E. Targeting dendritic cells for priming cellular immune response. *J Mol Recognit*. 2003. 16(5):299-317.
29. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003. 8(3):223-46.
30. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*. 2000. 1(4):311-6.
31. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000. 1(3):199-205.
32. Yao Y, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005. 201(12): 1899-903.
33. Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2005. 78(3):656-64.
34. Dragicević A, Dzopalić T, Vasilijić S, Vučević D, Božić B, Majstorović I, Balint B, Colić M. The influence of CD40 ligation and interferon-gamma on functional properties of human monocyte-derived dendritic cells activated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Vojnosanit Pregl*. 2001. 68(4):301-8.
35. Cho TH, Chang SH, Jan YS. Dose-dependent selective priming of Th1 and Th2 immune responses is achieved only by an antigen with an affinity over a certain threshold level. *Mol Cells*. 2000. 10(6):695-704.
36. Pulendran B. Modulating TF1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogens recognition receptors. *Immunol Res*. 2004. 29(1-3):187-96.
37. Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C, Seissler J, Schott M. Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells. *Horm Metalb Res*. 2008. 40(2):99-107.
38. Wan H, Dupasquier M. Dendritic cells in vivo and in vitro. *Cell Mol Immunol*. 2005. 2:28-35.
39. Jeras M, Bergant M, Repnik U. In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells – potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. *Transpl Immunol*. 2005. 14: 231-244.

40. Santini SM, Di Pucchio T, Lapenta C, Parlato S, Logozzi M, Berladelli F. A new type I IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem Cells*. 2003. 21(3): 357-62.
41. Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online*. 2003. 5:197-203.
42. Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, Chalouni C, Pulendran B, Davoust J, Bridges G, Palucka AK, Banchereau J. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2001. 194(7):1013-20.
43. Farkas A, Kemény L. Interferon- $\alpha$  in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *Br J Dermatol*. 2011. 165(2):247-54.
44. Buelens C, Bartholomé EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K, Willems F, Goldman M. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood*. 2002. 99(3):993-8.
45. Nencioni A, Grünebach F, Schmidt SM, Müller MR, Boy D, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008. 65(3):191-9.
46. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2003. 15(2):138-47.
47. Simon T, Fonteneau JF, Grégoire M. Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions. *Immunotherapy*. 2009. 1(2):289-302.
48. Boullart AC, Aarntzen EH, Verdijk P et al.: Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol Immunother*. 2008. 57, 1589–1597.
49. Lee JJ, Foon KA, Mailliard RB, Muthuswamy R, Kalinski P. Type 1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol*. 2008. 84(1):319-25.
50. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol*. 2003. 170(8):4069-76.
51. Banchereau J, Palucka K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol*. 2005. 5:296-306.

52. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004. 10(5):475-80.
53. Liao X, Li Y, Bonini C, Nair S, Gilboa E, Greenberg PD, Yee C. Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Mol Ther.* 2004. 9(5):757-64.
54. Suni MA, Maino VC, Maecker HT. Ex vivo analysis of T-cell function. *Curr Opin Immunol.* 2005. 17(4):434-40.
55. Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik MJ. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* 2005. 6th edition. New York, Garland Science Publishing: 822 str.
56. Bakker AH, Schumacher TN. MHC multimer technology: current status and future prospects. *Curr Opin Immunol.* 2005. 17(4):428-33.
57. Schuurhuis DH, Laban S, Toes RE, Ricciardi-Castagnoli P, Kleijmeer MJ, van der Voort EI, Rea D, Offringa R, Geuze HJ, Melief CJ, Ossendorp F. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med.* 2000. 192(1):145-50.
58. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004. 4(8):595-602.
59. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol.* 2002. 3(7):619-26.
60. Bousso P, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol.* 2003. 4(6):579-85.
61. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2005. 54:187-207.
62. Nierkens S, Janssen EM. Harnessing dendritic cells for tumor antigen presentation. *Cancers.* 2011. 3(2):2195-213.
63. Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004. 53(3):240-8.
64. Gilboa E. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. *Nature Immunology.* 2001. 29:789-792.
65. Markiewicz MA, Kast WM. Progress in the development of immunotherapy of cancer using ex vivo-generated dendritic cells expressing multiple tumor antigen epitopes. *Cancer Invest.* 2004. 22(3):417-34.

66. Suso EM, Dueland S, Rasmussen AM, Vethrus T, Aamdal S, Kvalheim G, Gaudernack G. hTERT mRNA dendritic cell vaccination: complete response in a pancreatic cancer patient associated with response against several hTERT epitopes. *Cancer Immunol Immunother.* 2011. 60(6):809-18.
67. Met O, Eriksen J, Svane IM. Studies on mRNA electroporation of immature and mature dendritic cells: effects on their immunogenic potential. *Mol Biotechnol.* 2008. 40(2):151-60.
68. Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K, Bonehill A. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007. 56(10):1513-37.
69. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. Timing cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007. 220:1129-50.
70. Cerundolo V, Hermans IF, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol.* 2004. 5(1):7-10.
71. Cranmer LD, Trevor KT, Hersh EM. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2004. 53(4):275-306.
72. de Gruijl TD, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Scheper RJ. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 2008. 57(10):1569-77.
73. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007. 449(7161):419-26, Aarntzen EH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ, de Vries IJ. Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother.* 2008. 57(10):1559-68.
74. Hörtl L, Ramoner R, Zelle-Rieser C, Gander H, Putz T, Papesh C, Nussbaumer W, Falkensammer C, Bartsch G, Thurnher M. Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother.* 2005. 54(7):663-70.
75. Kondoh H, Okano S, Yoshida K, Yonemitsu Y, Tomita Y, Yoshikai Y, Wake N, Sueishi K. Semi-allogeneic dendritic cells injected via the intratumoural injection route show efficient antitumour effects in cooperation with host-derived professional antigen-presenting cells. *Scand J Immunol.* 2010. 72(6):476-90.
76. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood.* 2009. 113(15):3418-27.
77. Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K, Bonehill A. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007. 56(10):1513-37.

78. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006. 6(6):476-83.
79. Thurner B, Röder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kämpgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 1999. 223(1):1-15.
80. Kaka AS, Foster AE, Weiss HL, Rooney CM, Leen AM. Using Dendritic Cell Maturation and IL-12 Producing Capacity as Markers of Function: A Cautionary Tale. *J Immunother.* 2008. 31(4):359-69.
81. Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH, Nesselhut T, Lorenzen DR. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm.* 2009. 365(1-2):61-8.
82. Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, Gray RJ, Hernandez JL, Gendler SJ, Mukherjee P. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2004. 11(3):328-39.
83. Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002. 100(4):1354-61.
84. Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med.* 2004. 199(12):1607-18.
85. Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Steinkasserer A. CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol.* 2007. 178(9):5454-64.
86. Della Bella S, Bierti L, Presicce P, Arienti R, Valenti M, Saresella M, Vergani C, Villa ML. Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin Immunol.* 2007. 112(2):220-8.
87. de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J Immunol.* 2002. 168(4): 1704-9.
88. O'Garra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 2007. 7(6):425-8.

89. Furio L, Billard H, Valladeau J, Péguet-Navarro J, Berthier-Vergnes O. Poly(I:C)-Treated human langerhans cells promote the differentiation of CD4+ T cells producing IFN-gamma and IL-10. *J Invest Dermatol.* 2009. 129(8):1963-71.
90. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol.* 2003. 4(4):355-60.
91. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol.* 2005. 25(3):177-88.
92. Pietschmann P, Gollob E, Brosch S, Hahn P, Kudlacek S, Willheim M, Woloszczuk W, Peterlik M, Tragl KH. The effect of age and gender on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells and markers of bone metabolism. *Exp Gerontol.* 2003. 38(10):1119-27.
93. Pawelec G. Tumor escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother.* 2004. 53(3):262-74.