

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA ADAMIČ

IDENTIFIKACIJA IN POMEN RAZLIČNIH  
ENDOGENIH CD4<sup>+</sup>-T CELIČNIH DEJAVNIKOV PRI  
NASTANKU Th17 CELIC

IDENTIFICATION AND EVALUATION OF DIFFERENT  
ENDOGENOUS CD4<sup>+</sup> Th17-DRIVING FACTORS

Ljubljana, 2012

Diplomsko naloge sem opravljala na Inštitutu Jožef Stefan pod mentorstvom doc. dr. Nataše Obermajer, mag. farm. Eksperimentalno delo sem opravljala v biotehnološkem in celičnem laboratoriju odseka za biotehnologijo B3 na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani, kjer smo tudi izvedli vse meritve.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložje samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nataše Obermajer, mag. farm.

Tanja Adamič

## ZAHVALA

*Rada bi se zahvalila mentorici doc. dr. Nataši Obermajer za ves trud, potrpežljivost in znanje, ki mi ga je posredovala. Hvala za natančno in hitro popravljanje diplomske naloge. Cenim tudi to, da smo pri delu uspeli vzpostaviti sproščeno vzdušje.*

*Hvala Klemnu, za vse nasvete, razumevanje in spodbudo tekom študija. Da lahko vedno računam nate, je neprecenljivo.*

*Velika zahvala gre tudi družini, še posebej staršema. Podpora in nasveti so mi omogočili doseči veliko.*

*Hvala sošolcu Jerneju za podporo in vso pomoč, tako pri delu kot pri pisanju diplomske naloge.*

*Na koncu pa tudi hvala članoma komisije, doc. dr. Marku Anderluhu in prof. dr. Odonu Planinšku, za pregled in popravo diplomske naloge.*

# KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE .....	4
KAZALO SLIK .....	6
KAZALO PREGLEDNIC .....	8
POVZETEK .....	9
ABSTRACT .....	10
SEZNAM OKRAJŠAV .....	11
1. TEORETIČNI UVOD .....	13
CELICE IMUNSKEGA SISTEMA IN IMUNSKI ODZIV .....	13
Lmfociti T pomagalke .....	13
Regulatorni lmfociti T .....	14
Th17 celice .....	15
Antigen predstavitevne celice .....	15
Aktivacija lmfocitov T z antigen predstavitevnimi celicami .....	16
DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA DIFERENCIACIJO IN RAZMNOŽITEV CELIC Th17 .....	18
PLASTIČNOST Th17 CELIC .....	20
VPLIV MDSC NA Th17 CELICE .....	22
Arginaza 1 in iNOS .....	23
Indolamin-2,3-dioksigenaza oz. IDO .....	23
Prostaglandin E <sub>2</sub> .....	23
2. HIPOTEZA IN NAMEN DELA .....	26
3. MATERIALI IN METODE .....	27
3.1. MATERIALI .....	27
Reagenti in mediji .....	27
Aparature in oprema .....	29

3.2. METODE.....	30
4. REZULTATI.....	37
PGE <sub>2</sub> inducira nastanek MDSC in nadzoruje njihovo imunosupresivno delovanje ....	37
Endogeni PGE <sub>2</sub> nadzira proizvodnjo Th17 polarizirajočih citokinov v človeških rakavih MDSC.....	38
Indukcija in namnožitev celic Th17 je odvisna od COX2/PGE <sub>2</sub> in EP2&EP4 signalizacije.....	41
Preko COX2/PGE <sub>2</sub> regulirani Th17 polarizirajoči faktorji iz MDSC inducirajo CD4 <sup>+</sup> celično endogeno COX2/PGE <sub>2</sub> povratno zanko, ki ohranja Th17 fenotip.....	43
Indukcija in namnožitev celic Th17 je odvisna od NOS2/NO, ta pa regulirana preko PGE <sub>2</sub> .....	45
Th17 diferenciacija, tako z MDSC kot citokinsko inducirana, je odvisna od indukcije endogene NOS2 na humanih celicah T in njihove proizvodnje NO.....	47
5. RAZPRAVA .....	52
6. SKLEP.....	57
7. LITERATURA.....	58

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1A:</b> PGE <sub>2</sub> , ki je prisoten v tumorskem okolju, spodbuja produkcijo endogenega PGE <sub>2</sub> v MDSC.....	38
<b>Slika 2:</b> Vpliv PGE <sub>2</sub> na relativno izražanje citokinov IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23p19 in TGF- $\beta$ <sub>1</sub> iz MDSC.....	39
<b>Slika 3:</b> Prisotnost inhibitorja COX2 celekoksiba zmanjša izločanje dejavnikov TGF- $\beta$ <sub>1</sub> , IL-6, IL-10 in IL-1 $\beta$ iz MDSC. ....	39
<b>Slika 4:</b> Producija IL-23 iz MDSC, ki se sproži po stimulaciji s CD40L, se ustavi ob prisotnosti celekoksiba (na sliki krajšano celek.). ..	40
<b>Slika 5:</b> PGE <sub>2</sub> in IL-6 spodbujata izločanje IL-23 iz MDSC.....	40
<b>Slika 6:</b> Delež IL-17A $^{+}$ in IFN- $\gamma$ $^{+}$ celic med TIL (levo) ter producija IL-17A v CD3/CD28-aktiviranih naivnih CD4 $^{+}$ celicah in TIL (desno), ki jih inducirajo MDSC in MDSC, tretirane s celekoksibom.....	41
<b>Slika 7:</b> Relativno izražanje transkripcijskih dejavnikov v CD3/CD28-aktiviranih naivnih CD4 $^{+}$ celicah v prisotnosti/odsotnosti kontrolnih CD11b $^{+}$ celic ali MDSC, ne/tretiranih s celekoksibom. ....	42
<b>Slika 8:</b> Vpliv celekoksiba in antagonistov posameznih EP receptorjev (AH6809 in AH23848 sta antagonist EP2 in EP4, L798106 pa je inhibitor EP3) na izločanje IL-17A iz TIL v prisotnosti MDSC.....	42
<b>Slika 9:</b> Producija IL-6 v CD3/CD28 aktiviranih naivnih CD4 $^{+}$ celicah v odsotnosti in prisotnosti Th17-polarizirajočih citokinov IL-1 $\beta$ in IL-23/(TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ).....	43
<b>Slika 10:</b> Medsebojni vpliv IL-1 $\beta$ , NO ter PGE <sub>2</sub> uravnava produkcijo IL-17 v naivnih CD4 $^{+}$ celicah.....	44
<b>Slika 11:</b> Vpliv PGE <sub>2</sub> , NOS in IL-6 inhibicije na indukcijo IL-17 $^{+}$ CD4 $^{+}$ celic ob CD3/CD28 aktivaciji naivnih CD4 $^{+}$ celic (levo) oz. TIL (desno) v kokulturi z MDSC in kombinaciji citokinov IL-1 $\beta$ , IL-6 in IL-23. ....	45
<b>Slika 12:</b> Medsebojni vpliv PGE <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ ter IL-6 pri uravnavanju izražanja NOS2 v kontrolnih CD11b $^{+}$ celicah in MDSC.....	46
<b>Slika 13:</b> Vpliv eksogenega NO (NO-donor/NO iz MDSC) na produkcijo IL-17A v TIL oz. naivnih CD4 $^{+}$ celicah.....	47

<b>Slika 14:</b> Relativno izražanje IL-17A in ROR $\gamma$ t (levo) ter produkcija IL-17A (desno) v CD3/CD28 aktiviranih naivnih in spominskih celicah T v odsotnosti/prisotnosti Th17-usmerjajočih citokinov ter različnih koncentracij eksogenega NO.....	48
<b>Slika 15:</b> Relativno izražanje transkripcijskih dejavnikov ROR $\gamma$ t, GATA3, FoxP3, T-bet in citokinov IL-17A, IL-17F ter receptorjev IL-23R, IL-12R $\beta$ <sub>1</sub> in IL2R v CD3/CD28 aktiviranih naivnih CD4 $^{+}$ celicah T v prisotnosti/odsotnosti Th17-usmerjajočih citokinov ter različnih koncentracij eksogenega NO.....	48
<b>Slika 16:</b> Relativno izražanje NOS2 in IL-17 v CD3/CD28 aktiviranih naivnih celicah CD4 $^{+}$ v odsotnosti/prisotnosti posameznih/kombinacije Th17-usmerjajočih citokinov in različnih koncentracij eksogenega NO .....	49
<b>Slika 17:</b> Relativno izražanje NOS1 (pod mejo detekcije), NOS2, NOS3 in IL-17A v CD4 $^{+}$ celicah T v prisotnosti IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 in TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ter kombinacijah teh citokinov.....	50
<b>Slika 18:</b> Relativno izražanje IL-17A, IL-17F, ROR $\gamma$ t in IL-23R v CD3/CD28 aktiviranih spominskih CD4 $^{+}$ celicah T v odsotnosti/prisotnosti Th17-usmerjajočih dejavnikov in inhibitorjev NOS (ADMA, L-NMMA). ....	51
<b>Slika 19:</b> Producija IL-17A v CD3/CD28 stimuliranih naivnih CD4 $^{+}$ celicami T v odsotnosti/prisotnosti Th17-usmerjajočih citokinov, NOS inhibitorja/NO donorja in kombinaciji le-teh.....	51

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Mediji, reagenti, citokini in protitelesa, ki smo jih uporabljali pri delu, ter njihov proizvajalec.	27
<b>Preglednica II:</b> Aparature in oprema, ki smo jih uporabljali pri delu.	29

## **POVZETEK**

Th17 celice so nedavno odkrita podvrsta limfocitov T pomagalk, za katere sta značilna citokina interlevkin (IL) 17A in IL-17F, poleg tega pa izločajo tudi citokina IL-21 in IL-22. Normalno predstavljajo 1% populacije CD4<sup>+</sup> celic. Nahajajo se predvsem na površinah sluznic, njihova naloga pa je obramba pred zunajceličnimi bakterijami in glivami. Ob določenih patoloških stanjih, kot so rak, transplantacije organov in kostnega mozga, avtoimune bolezni in alergije, se aktivirajo, njihovo število se poveča. Posledica je vnetje, saj IL-17 deluje na stromalne celice, endotelijalne celice, ter podvrsto monocitov, ki nato še sami začnejo izločati provnetne dejavnike, ki aktivirajo nevtrofilce in nasploh uravnavajo potek akutne okužbe. Medtem ko akutno vnetje omogoča odstranitev povzročiteljev vnetja, pa v posameznih primerih lahko vodi v kronično fazo, za katero je značilna stalna prisotnost provnetnih dejavnikov in ki lahko vodi k nastanku mnogih bolezni, med drugim raka in obolenj. Med dejavniki, ki povzročijo kronično vnetje, značilno prispeva prisotnost supresorskih celic. Za tumorsko okolje so med drugim značilne supresorske celice mieloidnega izvora, ki v svojo okolico izločajo različne dejavnike in preko njih vplivajo na diferenciacijo ter funkcijo ostalih celic imunskega sistema, ter na splošno zavirajo imunski odgovor.

Supresorske celice mieloidnega izvora preprečujejo ustrezni imunski odziv, ki bi vodil do uspešne eliminacije tumorja iz telesa. Med pomembnejšimi dejavniki, ki jih izločajo te celice in tako onemogočajo ustrezni imunski odziv, so se izkazali indolamin oksigenaza 1 (IDO1), arginaza 1, inducibilna NO sintaza (iNOS), IL-10 in prostaglandin E<sub>2</sub>. Z uporabo različnih tehnik, kot so encimski imunski test ELISA, verižna reakcija polimeraze v realnem času (rtPCR) in pretočna citometrija smo ugotovili, da nekateri izmed teh dejavnikov vplivajo na nastanek Th17 celic. Še zlasti to velja za prostaglandin E<sub>2</sub> in dušikov oksid, ki oba direktno vplivata na CD4<sup>+</sup> celice in usmerita njihovo diferenciacijo v Th17 fenotip, obenem pa tudi avtokrino delujeta na same supresorske celice mieloidnega izvora ter spodbudita njihovo izločanje dejavnikov, kot so IL-23, IL-6 in IL-1β, ki pa so že znani induktorji Th17 diferenciacije.

Supresorske celice mieloidnega izvora smo izolirali iz ascitesne tekočine pacientk z rakom jajčnikov, mononuklearne celice pa iz periferne krvi zdravih prostovoljcev.

## ABSTRACT

Recently discovered helper T cell subtype, helper T cells 17 (Th17), produce specific set of cytokines, in particular interleukin (IL) 17A, IL-17F, and also IL-21 and IL-22. In healthy individuals Th17 cells represent approximately 1% of T cell population in peripheral blood. They are abundant at mucosal surfaces, where they play important role in clearance of extracellular bacteria and fungi. Besides, they are activated and proliferate in certain pathological conditions such as cancer, organ and bone marrow transplantations, autoimmune diseases and allergies. This results in inflammation, since IL-17 acts on stromal cells, endothelial cells and also on subtype of monocytes, which all start to secrete inflammatory factors. These factors activate neutrophils and regulate acute inflammation, comprising host's defensive response against infection. In some cases acute inflammation can lead to chronic inflammation, which has been associated with the initiation and progression of many types of diseases, including cancer. Important producers of the factors that promote chronic inflammation are the suppressor cells. Common tumor-associated suppressor cells are myeloid derived suppressor cells (MDSC). MDSC secrete immunosuppressive factors and have potent ability to suppress immune responses by regulating differentiation and function of immune cells.

MDSC suppress proper immune response and disable effective tumor elimination. The most important factors in this process are indoleamine oxygenase 1 (IDO1), arginase 1, inducible NO synthase (iNOS), IL-10 and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). While some of these factors, in particular PGE<sub>2</sub> and NO, are known inducers of Th17 CD4<sup>+</sup> cells, they also influence MDSC in autocrine manner and promote their production of Th17-driving factors: IL-23, IL-6 and IL-1 $\beta$ .

We used several different techniques: ELISA, real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) and flow cytometry. Myeloid-derived suppressor cells were isolated from ascitic fluid of ovarian cancer patients, mononuclear cells were isolated from peripheral blood of healthy donors.

## SEZNAM OKRAJŠAV

15-PGDH	15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza
APC	Antigen predstavitevne celice
BSA	Goveji serumski albumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalcijevi ioni
CD	Angl. cluster of differentiation; diferenciacijska skupina
CHS	Kontaktna preobčutljivost
COX2	Ciklooksigenaza tipa 2
CTL	Citotoksični limfociti T
DC	Dendritične celice
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
EAE	Eksperimentalni avtoimunski encefalomielitis
ELISA	Encimski imunski test na trdni podlagi
EP	Receptor za prostaglandin
FoxP3	Angl. forkhead transcription factor; transkripcijski dejavnik
G-MDSC	Granulocitna podvrsta supresorskih celic mieloidnega izvora
GM-CSF	Granulocitno makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
HPRT1	Hipoksantin fosforiboziltransferaza 1
IDO	Indolamin dioksigenaza
IFN-γ	Interferon γ (gama)
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovega oksida
IL	Interlevkin
IL-R	Receptor za interlevkin
iMC	Angl. immature myeloid cells, nezrele mieloidne celice
mAb	Monoklonsko protitelo
mRNK	Informacijska ribonukleinska kislina
M-CSF	Makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
M-MDSC	Monocitna podvrsta supresorskih celic mieloidnega izvora
NK	Naravne celice ubijalke
NO	Angl. nitric oxide; dušikov oksid
NOS	Angl. nitric oxide synthase, sintaza dušikovega oksida
OvCa	Angl. ovarian cancer; rak jajčnikov
PBMC	Angl. peripheral blood mononuclear cells; mononuklearne celice
PBS	Fosfatni pufer
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PHK	Poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PMA	Angl. phorbol-12-myristate-13-acetate; forbol-12-miristat-13-acetat

RA	Retinojska kislina
ROR $\gamma$ t	Angl. retinoid-related orphan receptor; transkripcijski dejavnik
ROS	Reaktivne kisikove spojine
SCF	Rastni dejavnik matičnih celic
Stat	Angl. signal transducers and activators of transcription;
Tc	Celica T ubijalka
TCR	T celični receptor
TGF- $\beta$	Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$
Th	Celice T pomagalke
TLR	Angl. toll like receptors
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF- $\alpha$	Dejavnik tumorske nekroze
Treg	Regulatorne celice T
UKCLJ	Univerzitetni klinični center, Ljubljana
VEGF	Žilni endotelijski rastni dejavnik

# 1. TEORETIČNI UVOD

## CELICE IMUNSKEGA SISTEMA IN IMUNSKI ODZIV

Kronično vnetje je povezano z začetkom in napredovanjem več vrst raka. [1, 2] V tumorskem mikrookolju se nahajajo celice imunskega sistema s protitumorsko aktivnostjo, ki predstavljajo gostiteljevo obrambo pri nadzoru rasti in razvoja tumorja, ter ubijajo tumorske celice. [3, 4] Pomembno skupino celic imunskega sistema predstavljajo limfociti T, ki se delijo na efektorske limfocite T (to so limfociti pomagalke in citotoksični limfociti T) ter na regulatorne limfocite T. Za celice pomagalke (angl. T helper cells; Th) je značilen membranski kazalec glikoprotein CD4, citotoksični limfociti (angl. cytotoxic T cells; Tc) pa imajo membranski glikoprotein CD8. [5]

### Limfociti T pomagalke

CD4<sup>+</sup> limfociti T (celice pomagalke) se delijo na celice T pomagalke 1 (Th1) in T pomagalke 2 (Th2), odvisno od značilnih citokinov, ki jih izločajo. Limfociti Th1 izločajo IFN $\gamma$  (interferon gama) in naj bi sodelovali pri obrambi pri znotrajceličnih okužbah; limfociti Th2, ki proizvajajo citokine IL-4, IL-5 in IL-13, pa naj bi posredovali pri humoralni imunosti pri okužbah s paraziti, pri avtoimunih boleznih ter alergijah. [6] Poleg teh dveh vrst celic pomagalk pa so nedavno odkrili novo podvrsto celic T pomagalk, ki so jo poimenovali Th17 – zaradi značilnega citokina IL-17, ki ga izločajo. Sicer Th17 celice izločajo citokine IL-17, IL-17F, IL-21 in IL-22. [7] Manj znani podvrsti celic pomagalk sta še celice Th9 in Th10. Limfociti Th9 izločajo IL-9 in IL-10 [8], limfociti Th10 pa izločajo IL-10 in so po svoji imunoregulatorni vlogi sorodne regulatornim celicam T (Treg). [9]

Heterogena skupina celic CD4<sup>+</sup> se razlikuje po funkcijah posameznih celic in tudi po poteh njihove aktivacije. Pri tem imajo pomembno vlogo transkripcijski dejavniki – to so proteini, ki se specifično vežejo na del deoksiribonukleinske kisline (DNK) in nadzirajo prepis z DNK v informacijsko (angl. messenger) ribonukleinsko kislino (mRNK) – lahko kot promotorji ali zaviralci. Posamezni citokini sprožijo njihovo aktivacijo, ki povzroči diferenciacijo v določen celični podtip. [10] Polarizacijo v podvrsto Th1 povzročita IL-12

in IFN- $\gamma$ , ki ju sproščajo celice prirojenega imunskega sistema (IL-12) ter celice ubijalke NK (angl.natural killer cells) in T celice (IFN- $\gamma$ ). Diferenciacija poteka preko aktivacije transkripcijskih dejavnikov Stat4, Stat1 (angl. za signal transducers and activators of transcription) in T-bet. Za diferenciacijo v Th2 celice je potrebna aktivacija GATA3 in Stat6, ter prisotnost IL-4 v okoliškem mediju.

Za nastanek človeških Th17 celic sta odgovorni dve poti: IL-1 $\beta$  v kombinaciji s provnetnima citokinoma IL-6 in IL-21 aktivira transkripcijski dejavnik ROR $\gamma$ t (angl. retinoid-related orphan receptor), druga pot pa vključuje je aktivacijo Stat3 z IL-23. [11, 12] Aktivacijo transkripcijskega dejavnika ROR $\gamma$ t oz. Stat3 in diferenciacijo v Th17 fenotip pri miših inducira TGF- $\beta$ , prav tako v kombinaciji s provnetnima citokinoma IL-6 in IL-21. [13] Pri ljudeh TGF- $\beta$  ni ključen citokin za Th17 diferenciacijo, temveč jo dejansko zavira, ne glede na prisotnost ostalih Th17 polarizirajočih citokinov.[14]

Za Th17celice je značilen tudi membranski označevalec CD161, in sicer je gen za CD161 eden od najbolj izraženih genov v Th17 celicah v primerjavi s celicami Th1 in Th2. Naivne CD161 $^+$  celice ne morejo diferencirati v Th17celice. [15]

## **Regulatorni limfociti T**

Poleg limfocitov Th in Tc poznamo tudi regulatorne limfocite T oz. Treg. Glavna vloga Treg je ohranjanje imunske homeostaze – regulacija odzivov efektorskih limfocitov T in preprečevanje njihovih potencialno patogenih učinkov. Za Treg je značilna aktivacija transkripcijskega faktorja Foxp3 (angl. forkhead transcription factor). Obstajata dve glavni skupini regulatornih limfocitov T: naravno prisotni (nTreg, CD4 $^+$ CD25 $^+$ ), ki nastajajo v timusu, ter s TGF- $\beta$  inducirani Treg (iTreg), ki nastajajo v periferiji. Obe podvrsti sodelujeta v ohranjanju periferne tolerance in preprečevanju avtoimunosti preko zaviranja aktivnosti limfocitov Th1 in Th2. Miši, ki imajo pomanjkljivo število Treg celic, prekomerno izražajo Th1 in Th2 citokine in izkazujejo povečano število avtoimunih bolezni. [16, 17] Manj jasno je, kakšen vpliv imajo Treg na delovanje Th17 celic.

Diferenciacija Th17 in iTreg pri miših sta povezani, saj je pri obeh potreben TGF- $\beta$ . V odgovor na stimulacijo TCR v prisotnosti TGF- $\beta$  se lahko naivne CD4 $^+$  celice diferencirajo tako v Th17 kot v Treg celice, odvisno od dodatnih citokinov v okolini. Tako lahko na

diferenciacijo Th17 vplivajo tudi Treg z izločanjem TGF- $\beta$ , ki v prisotnosti provnetnih citokinov povzroči nastanek Th17 celic. [18]

### **Th17 celice**

Th17 celice imajo pomembno vlogo pri številnih boleznih: avtoimunih boleznih, alergijah, raku ter pri transplantacijah organov in kostnega mozga. Udeležene so pri obrambi pred zunajceličnimi bakterijami in glivami, še posebej na površinah sluznic. Pri zdravih posameznikih predstavlja približno 1% CD4 $^{+}$  celic, pri raku in avtoimunih boleznih pa lahko v patološkem mikrookolju njihovo število skupaj s IL-17 $^{+}$ CD8 $^{+}$  (Tc17) drastično naraste, pri tem obe vrsti izločata velike količine IL-17, ki povzroči migracijo dodatnih Th17 celic na patološko mesto. Pri tem procesu igrata pomembno vlogo kemokinski receptor CCR6 in integrin CD49. [19, 20] Tarča IL-17 so stromalne in endotelijalne celice, ter podvrsta monocitov, ki nato začnejo izločati provnetne dejavnike, ki aktivirajo nevtrofilce in nasploh uravnavajo potek akutne okužbe. [21]

### **Antigen predstavljivne celice**

IL-23, ki inducira limfocite Th17, večinoma izločajo makrofagi in dendritične celice (angl. dendritic cells, DC) kot odgovor na signale iz okolja pri okužbi oz. po CD40:CD40L stiku s celicami T. [22-24] Vloga dendritičnih celic pri imunski obrambi je zelo pomembna, saj predstavljajo prvo linijo obrambe ob okužbah z različnimi patogeni kot so bakterije in virusi. [25] Poznamo več vrst dendritičnih celic, med pomembnejše spadajo intersticijske DC in DC vrinjenke. Celice vrinjenke se nahajajo v bezgavkah, vranici in limfatičnem tkivu sluznic, imajo dolge izrastke, ki segajo med druge celice, njihova naloga pa je skupaj z makrofagi in folikularnimi DC predstavljanje antigenov v limfatičnih tkivih. Sorodne so mononuklearnim fagocitom, čeprav so same slabo fagocitne. Intersticijske DC pa se nahajajo v intersticiju večine organov ter v T-limfocitnem področju vranice in bezgavk. Tudi zanje so značilni dolgi izrastki.

DC med kroženjem po perifernem krvnem obtoku naletijo na antigene, se aktivirajo in potujejo v bezgavke, kjer aktivirajo določeno skupino limfocitov T. Aktivirani limfociti T se namnožijo, potujejo na mesto okužbe in eliminirajo patogen. Po uspešni eliminaciji večina celic v roku 1 tedna pogine, nekatere pa preživijo, ostanejo v sekundarnih

limfatičnih organih, ob ponovnem stiku pa sprožijo močnejši in hitrejši sekundarni odziv na antigen. Te celice se imenujejo spominski limfociti T. Poleg hitrejše aktivacije je zanje značilno tudi izločanje večjih količin citokinov in večja gostota izražanja adhezijskih molekul, kar jim omogoči učinkovitejše sodelovanje z antigen predstavitvenimi celicami (APC). [26]

DC predstavljajo vezni člen med naravno in specifično imunostjo. Poleg predstavitev antigena celicam T pa na mestu okužbe ustvarijo tudi ustrezen lokalni ali sistemski medij, ki pripomore k ustreznemu aktivaciji preostalih DC, limfocitov T in tudi okrepi odziv limfocitov T. [25] Ker je njihova primarna naloga zaznati patogene, ki so iz različnih taksonomskih skupin in so zato njihovi antigeni zelo heterogena skupina glede na svojo zgradbo, imajo na svoji površini in v citoplazmi ustrezne receptorske sisteme, ki zaznavajo te antigene, npr. t.i. toll-like receptorji (angl. toll like receptors, TLR). [27]

Humane DC lahko po aktivaciji CD40 izločajo visoke ravni IL-23, in sicer tudi v odsotnosti dodatnih dražljajev, kot so virusni oz. bakterijski antigeni. [28] IL-23 je heterodimerni citokin, sestavljen iz manjše enote p19 in večje enote p40. Manjša enota p19 je specifična za IL-23, p40 pa je tudi del strukturno sorodnega citokina IL-12. [29] IL-23 je udeležen tudi v rakavih obolenjih, saj se v večini človeških tumorskih vzorcev njegova koncentracija močno poveča v primerjavi z normalnim tkivom, ki se ne nahaja v neposredni bližini tumorja. [30]

### **Aktivacija limfocitov T z antigen predstavitvenimi celicami**

DC torej skupaj z makrofagi in limfociti B spadajo med antigen predstavitvene celice. Da lahko DC opravljajo to funkcijo, morajo po prepoznavi tujega proteinskega antigena letično razgraditi in dele njegovega aminokislinskega zaporedja predstaviti na svoji površini. Antigeni so sicer lahko tudi neproteinski (najpogosteje polisaharidi, zelo pogosto bakterijskega izvora), vendar lahko samo proteini sprožijo popoln imunski odziv – edini lahko aktivirajo limfocite T, ki so potrebni za imunski spomin. Antigeni se ne delijo le glede na svojo zgradbo, ampak tudi glede na pot vstopa v celico. Endogeni antigeni so znotrajceličnega izvora, npr. virusni proteini, proteini iz rakavih celic ali proteini bakterij, ki živijo v citosolu; eksogeni antigeni pa so zunanjega izvora, v celice pa vstopajo z endocitozo ali fagocitozo. Celice antigen razgradijo na fragmente in jih predstavijo na svoji

površini, vezane na kompleks membranskih molekul, ki se imenuje poglavitni histokompatibilnostni kompleks (PHK). Medtem ko se molekule PHK I nahajajo na vseh celicah z jedri, so molekule PHK II prisotne le na APC. Antigen prepoznači limfociti T kadar je le-ta vezan na molekule PHK. Antigene, vezane na PHK I, prepoznači limfociti Tc in uničijo okuženo/rakavo celico. Antigene, vezane na PHK II, pa prepoznači limfociti Th, ki vzpostavijo ustrezeno citokinsko okolje, ki pomaga pri odstranitvi antiga – aktivirajo druge celice imunskega sistema, npr. spodbudijo izločanje protiteles iz limfocitov B, spodbudijo makrofage k razkroju patogenov v svojih mešičkih in povzročijo diferenciacijo različnih podvrst limfocitov Th. Molekule PHK niso antigen specifične, to lastnost imajo samo protitelesa in T-celični receptor. Sicer obstaja več variacij v aminokislinskem zaporedju zunanjih delov kompleksa (kamor se veže antigen), kar omogoča različno specifičnost v smislu strukturnih skupin antigenov.

Da se sproži ustrezen T-celični odziv, mora poleg APC svojo vlogo opraviti tudi T-celični receptor (TCR). TCR je kompleks iz več integralnih proteinov plazemske membrane. Glikoprotein CD3 je značilen za vse limfocite T, njegova funkcija pa je prenos signala v notranjost celice – aktivacija različnih encimov, kateremu sledijo genski prepisi in funkcionalni odgovor limfocitov T. Poznamo 2 oblike TCR:  $\alpha\beta$  in  $\gamma\delta$ . [31]. CD4 in CD8 molekuli sta koreceptorja in olajšata stik limfocitov T z APC (v primeru  $CD4^+$  Th) oz. tarčnimi celicami (v primeru  $CD8^+$  Tc).

Poleg TCR so za aktivacijo in delovanje limfocitov T pomembne tudi kostimulacijske molekule. Medtem ko efektorske celice lahko opravijo svojo funkcijo po vezavi kompleksa antigen-PHK tudi brez kostimulacijskih signalov, naivni limfociti T v njihovi odsotnosti ne morejo diferencirati, se razmnoževati in posledično opraviti svoje funkcije.

Kostimulacijske molekule so integralne membranske molekule, ki so hkrati tudi koristni površinski označevalci limfocitov T. Ligande na površinah drugih celic (npr. na APC, okuženih celicah) vežejo specifično, zaradi tega tudi povečajo trdnost adhezije med celicami T in APC. So nepolimorfne, nespremenljive ter istovetne na vseh celicah T v vseh predstavnikih določene vrste. Najpomembnejša kostimulacijska molekula je glikoprotein CD28.

V procesu imunskega odgovora pa imajo pomembno vlogo tudi mnogi citokini ter dejavniki, ki so prisotni v okolju ob interakciji limfocitov T ter APC.

V imunskega odgovora ima pomembno vlogo tudi dušikov oksid. Dušikov oksid oz. NO (angl. nitric oxide) je majhna molekula s številnimi povsem različnimi vlogami v imunskemu sistemu, sodeluje pri regulaciji imunskega odziva in ima vlogo v avtoimunosti. [32] Sintetizirajo ga encimi iz družine NO sintaz (angl. nitric oxide synthase, NOS; iNOS, nNOS, eNOS), zanj specifičen receptor pa ne obstaja. [33] NOS se nahajajo v mnogih celicah imunskega sistema (makrofagih, celicah NK, DC,...) in tudi drugih celicah (endotelijskih celicah, gladko mišičje žilja...). [34] Predvideva se, da ima vlogo pri selekciji limfocitov T v timusu. [38] NO spodbuja vnetje [35, 36] in ga po drugi strani tudi zavira, saj neselektivno zavira različne imunske celice, med drugimi tudi limfocite T, njegov vpliv pa je odvisen tudi od koncentracije NO. [37] NO ima mikrobicidno in tumoricidno aktivnost; tumoricidno aktivnost preko NO izvajajo aktivirani makrofagi, smrt tumorske celice pa lahko povzroči tudi NO, ki ga sintetizira iNOS v sami tumorski celici, ki jo inducirata IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$  iz CTL. [38] NO proizvajajo tudi v tumorskem okolju prisotne MDSC [39], vpliv česar bo opisan kasneje.

## **DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA DIFERENCIACIJO IN RAZMNOŽITEV CELIC Th17**

Na proces diferenciacije Th17 celic ter njihove proliferacije imajo vpliv številni biološki dejavniki. Skupno vsem celicam Th17 je, da izločajo značilne citokine IL-17, IL-17F in IL-22, kljub temu pa so Th17 celice zelo heterogena skupina z dinamičnimi fenotipskimi in/ali funkcionalnimi lastnostmi, ki so podvržene različnim pogojem v okolju. Medtem ko pri mišjih celicah visoke koncentracije TGF- $\beta$  lahko zavrejo izločanje IL-22, ne vplivajo na izločanje IL-17. [40] TGF- $\beta$  in IL-6 polarizirata glodalske celice v Th17 celice, ki v odsotnosti IL-23 v manjši meri kažejo patogeni vnetnega značaj, predvsem zaradi izločanja IL-10, ki zavira vnetne procese. V prisotnosti IL-23 se razvoj namesto v zaščitne Th17 celice spreobrne v Th17 celice, ki izločajo provnetne citokine, ne pa tudi IL-10 in imajo patogene učinke. [41]

Kot kaže, ima na diferenciacijo Th17 celic vpliv tudi moč aktivacije T celičnega receptorja (TCR). Šibkejša T-celična stimulacija deluje ugodnejše za nastanek Th17 celic. V primeru šibkejšega stimulusa se sproži Th17 odziv, medtem ko večja intenziteta T-celične stimulacije navkljub ugodnemu citokinskemu okolju za Th17 diferenciacijo ne vodi v

razvoj celic Th17. Razlog za to je verjetno to, da se ob močni stimulaciji ne inducira vezava NFATc1 na promotor IL-17. NFATc1 naj bi bil ključni transkripcijski dejavnik pri regulaciji aktivnosti promotorja IL-17 po TCR signalizaciji. Možno je, da pri intenzivni stimulaciji NFATc1 interagira z drugimi transkripcijskimi dejavniki. Poleg tega vpliva tudi nivo znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ , saj se pri različni intenziteti T-celične aktivacije koncentracije znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  spreminja. Povečanje koncentracije znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  ob nizkih stimulacijskih pogojih zavre Th17 usmerjeni učinek, kar kaže na to, da so za usmeritev v Th17 fenotip potrebne nizke koncentracije znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ . Hkrati pogoji močne stimulacije povzročijo izražanje Foxp3.

Ti rezultati pomagajo razložiti dejstvo, da imajo pri avtoimunih boleznih prisotne avto-reaktivne limfocite T, ki uidejo negativni selekciji v priželjcu, nizkoafiniteten TCR. [42]

Za Th17 diferenciacijo je poleg nizke moči aktivacije potrebno tudi ustrezno okolje. Fiziološki pomen tega bi lahko bil varnostni mehanizem, ki bi v primeru pojava avto-reaktivnih limfocitov T z nizko tendenco oz. afiniteto preprečil nastanek patoloških celic Th17, ki bi se aktivirale tudi brez nevarnih polarizirajočih signalov. [43]

Tudi  $\text{PGE}_2$  vpliva na celice Th17, in sicer preko prostaglandinskih receptorjev EP2 in EP4, kar je bilo dokazano na modelih EAE (eksperimentalni avtoimunski encefalomielitis, model za multiplo sklerozo) in CHS (angl. contact hypersensitivity oz. kontaktna hipersenzitivnost, model za kožno alergijo). [44]  $\text{PGE}_2$  pa vpliva tudi na diferenciacijo DC in s tem tudi posredno vpliva na celice Th17: zavira proizvodnjo Th17-zavirajočega IL-12p70 in spodbuja nastajanje IL-23. [45]  $\text{PGE}_2$  skupaj z IL-23 in brez ostalih Th17 citokinov pomaga pri ohranjanju Th17 fenotipa, saj sicer število celic Th17 upade, če je v okolju prisoten samo IL-23. Vpliv  $\text{PGE}_2$  na Th17 je koncentracijsko odvisen.

## PLASTIČNOST Th17 CELIC

Ko je telo izpostavljeno mikroorganizmom, se sproži kaskada reakcij imunskega sistema. Prvotnemu dvigu populacije efektorskih celic sledi povečanje števila regulatornih celic (Treg), ki preprečujejo prekomerno aktivnost efektorskih celic in s tem poškodbo tkiva. Pokazalo se je, da imajo določene CD4<sup>+</sup> celice zmožnost preusmeritve njihove funkcionalnosti, tako vplivajo na ravnotežje med regulatornimi celicami T in efektorskimi celicami T, vplivajo pa tudi na ravnotežje citokinskih profilov efektorskih celic.

Da je obramba učinkovita in po drugi strani da ne pride do avtoimunosti in drugih imunopatoloških pojavov, je namreč potrebno odzive efektorskih limfocitov T tesno regulirati. Avtoimunost je posledica prevelike aktivnosti Th1 in Th17 celic, prekomerna aktivnost Th2 celic pa je glavni krivec za alergije in astmo. [46]

Ko se naivne celice razvijejo v podvrsto Th1 ali Th2, se njihov fenotip ne more ponovno spremeniti, celice ne morejo preiti v druge podvrste – tudi če so podvržene drugim polarizirajočim pogojem. [47] Diferenciacija v podvrsto Th1 oz. Th2 se med seboj izključuje: citokin IL-4 iz limfocitov Th2 zavira signalizacijo IL-12 preko zaviranja izražanja IL-12R $\beta$ 2 [48], obratno pa tudi citokini limfocitov Th1 zavirajo razvoj v podvrsto Th2. [49, 50] Podobna navzkrižna regulacija kot med Th1 in Th2 celicami verjetno obstaja tudi med Th17 in Th1 oz. Th2 celicami. Oba značilna citokina, IFN- $\gamma$  in IL-4, inhibirata diferenciacijo v podvrsto Th17. [51]

IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> celice so prisotne pod homeostatskimi in vnetnimi pogoji, kar kaže na neko povezavo med Th1 in Th17 celičnim programom, vendar Th17 celice ne izvirajo iz Th1 celic, saj izražajo ROR $\gamma$ t in za svoj razvoj ne potrebujejo aktivacije T-bet oz. Stat4.[52, 53]

V nasprotju se Treg celice (še posebej v bolezenskih pogojih) lahko spremenijo v limfocite Th17, ki proizvajajo provnetne citokine. [54, 55], kar lahko dodatno obremeniti bolezensko vnetje. Temu pa nasprotujejo IL-103<sup>+</sup> dendritične celice, ki izločajo retinojsko kislino (retinoic acid, angl., RA) in s tem spodbujajo izražanje Foxp3 ter diferenciacijo v Treg. [56-58] RA poveča delež Foxp3<sup>+</sup> celic (induciranih s TGF- $\beta$  *in vitro*) in stabilizira izražanje Foxp3 *in vivo* pod vnetnimi pogoji. [59] Vloga RA je tako verjetno stabilizacija oz. spodbujanje Treg celičnega odziva in preprečitev vnetja.

V regulacijo ravnotežja Foxp3 – ROR $\gamma$ t med diferenciacijo celic T pomagalk je vpleteneh več transkripcijskih dejavnikov:

- IRF4 je ključen za diferenciacijo Th17 celic, tako *in vitro* kot *in vivo*. [60] Njegova odsotnost v miših povzroči upad izražanja ROR $\gamma$ t in povečanje izražanja Foxp3, prenehanje izločanja IL-17 in zaščito pred eksperimentalnim avtoimunim encefalomielitisom (EAE).
- Runx1 tvori kompleks z ROR $\gamma$ t in skupaj spodbujata Th17 diferenciacijo. [61] Interakcija Runx1 in Foxp3 v Treg pa je potrebna za zaviranje izločanja IL-2 in IFN- $\gamma$ , za povečanje števila molekul, povezanih s Treg in za njihovo zavirajočo aktivnost. [62] Runx1 je nujno potreben tudi za vzdrževanje izražanja Foxp3 pri obeh podvrstah Treg. Funkcionalna plastičnost celic, ki izražajo ROR $\gamma$ t in Foxp3, bi lahko bila nadzorovana preko Runx1, ki ima sposobnost interagiranja z obema transkripcijskima dejavnikoma.
- Stat3 je transkripcijski dejavnik, značilen za signalne poti IL-6, IL-21 in IL-23 in prav tako bistven za Th17 diferenciacijo. Veže se na *Il17* lokus in v povezavi z ROR $\gamma$ t usmeri njegovo transkripcijo. [63] Poleg tega je izražanje Foxp3, ki ga sproži TGF- $\beta$ , inhibirano s provnetnimi citokini preko signalizacije Stat3.

Ni znano, zakaj nekatere IL-17 $^+$  celice med diferenciacijo izražajo Foxp3. Bodisi je med uveljavljivijo Th17 celičnega programa aktivacija Foxp3 *stohastična*, ali pa je izražanje Foxp3 znak za drugačno pot diferenciacije. Tudi vprašanje, ali obstajajo funkcionalne razlike med Th17 celicami, ki so diferencirale z oz. brez ekspresije Foxp3, ostaja nepojasnjeno.

Plastičnost Th17 celic ima velik biološki in terapevtski pomen. Možnost pretvorbe Treg celic v Th17 celice bi omogočila omejitev okužb s patogeni [64], in hkrati omogočila zaščito gostitelja pri kroničnih okužbah s patogeni. Nenazadnje bi ustrezna regulacija plastičnosti Treg in Th17 omogočila nadzor avtoimunih bolezni ter prekomernih imunskeih odgovorov pri presaditvah, kot tudi neustreznega imunskega odgovora pri rakavih obolenjih.

## VPLIV MDSC NA Th17 CELICE

Supresorske celice mieloidnega izvora oz. MDSC (angl. myeloid-derived suppressor cells) so heterogena skupina celic z enako biološko aktivnostjo, ki se močno namnoži pri raznih bolezenskih stanjih kot so rak, okužbe in vnetje. MDSC imajo sposobnost zatreti T-celični odgovor, ki se normalno sproži ob takih stanjih. Skupino sestavljajo mieloidne matične celice in nezrele mieloidne celice oz. IMC (immature myeloid cells), morfološko granulocitne ali monocitne. Pri zdravih posameznikih v kostnem mozgu nastale nezrele mieloidne celice oz. IMC (immature myeloid cells) hitro zorijo v zrele granulocite, makrofage ali DC, v bolezenskih stanjih pa se diferenciacija in zorenje blokira, delež nezrelih celic se močno poveča, poveča pa se tudi izražanje imunosupresivnih faktorjev, kot so arginaza 1, NO in reaktivne kisikove spojine (ROS). MDSC ne izražajo specifičnih celičnih kazalcev, ki so značilni za posamezne podvrste mieloidnih celic. [65] Pri človeku lahko MDSC najpogosteje opredelimo kot CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. [66, 67]

Skupno vsem MDSC je mieloidno poreklo, nezrelost in močno zaviranje T celičnega odziva, opazili pa so tudi sposobnost regulacije prirojenega imunskega sistema preko modulacije citokinskega profila makrofagov. [68] Imajo tudi določene neimunološke naloge kot je npr. spodbujanje tumorske angiogeneze in metastaziranja. [69]

Dejavniki, ki sprožijo nastanek MDSC, vplivajo na proliferacijo in aktivacijo MDSC. Med te dejavnike štejemo COX2/PGE<sub>2</sub> [70-72], SCF [70], M-CSF, IL-6 [73], GM-CSF [72] in VEGF[74], IFN- $\gamma$ , ligandi za TLR, IL-4, IL-13 in TGF- $\beta$ . Stat3 je glavni transkripcijski dejavnik, ki uravnava diferenciacijo MDSC. [75]

Imunosupresivno delovanje MDSC vključuje direktni celični stik, kar pomeni, da MDSC delujejo preko receptorjev na celični površini in/ali delovanje preko kratkoživečih topnih mediatorjev [76], kot tudi posredno delovanje preko izločanja topnih mediatorjev. [77]

Za imunosupresivne učinke MDSC so odgovorni dejavniki arginaza, dušikov oksid (angl. nitric oxide, NO), indolamin dioksigenaza (IDO) in reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species, ROS). [76, 78, 79], COX2/PGE<sub>2</sub> [80], TGF- $\beta$  [81, 82], kot tudi izčrpanje zalog glutationa [83] in zmanjšanje izražanja L-selektina na celicah T [84] ter indukcija Treg [70-72]. Glede na granulocitno (G-MDSC) ali monocitno podvrsto (M-

MDSC) je vpliv teh posameznih dejavnikov različen. G-MDSC naj bi delovale predvsem preko ROS, M-MDSC pa preko iNOS (inducibilna NO sintaza), arginaze in imunosupresivnih citokinov. G-MDSC naj bi delovale antigen specifično, saj so ROS nestabilne spojine in delujejo na kratke razdalje, za kar so potrebni tesni celični stiki. [85] V nasprotju pa naj bi M-MDSC delovale antigen nespecifično, saj za delovanje encimov in citokinov tesni celični stiki niso potrebni. So bolj učinkovite kot G-MDSC. [86-89] Večino MDSC v perifernih limfatičnih organih v tumorskih modelih predstavljajo G-MDSC [65], medtem ko v tumorjih prevladujejo M-MDSC. [90]

### **Arginaza 1 in iNOS**

L-arginin je substrat encimoma arginaza 1 in iNOS (iNOS proizvaja NO, arginaza pa pretvarja L-arginin v ureo in L-ornitin). Ker MDSC proizvajajo večje koncentracije teh encimov, je koncentracija L-arginina v okolini manjša, njegova razpoložljivost pa je povezana regulacijo proliferacije limfocitov T. [66, 67] Primanjkljaj L-arginina zavira proliferacijo limfocitov T. Poleg porabe L-arginina pa iNOS proizvaja še NO, ki inhibira funkcijo JAK3 in Stat5 v celicah T [91], inhibira izražanje PHK II [92] in sproži apoptozo limfocitov T [93].

### **Indolamin-2,3-dioksigena oz. IDO**

IDO prizadene funkcijo limfocitov T in tudi zmanjša njihovo število. Katalizira reakcijo razgradnje triptofana, ki je za limfocite T esencialen, hkrati pa pri tem nastajajo za limfocite T toksični derivati triptofana. [94, 95]

### **Prostaglandin E<sub>2</sub>**

V procesu imunskega odgovora pa ima vlogo tudi prostaglandin E<sub>2</sub>, še posebej pri rakavih obolenjih. Za tumorske celice je značilno, da se nenadzorovano delijo. Celice z napakami v ciklusu delitve aktivirajo imunski sistem: preko vnetnih dejavnikov iz makrofagov in monocitov se sproži vnetje. Vnetni citokini stimulirajo zorenje DC in predstavljanje antigena limfocitom T, ki eliminirajo množeče tumorske celice. Te se lahko imunskemu sistemu in uničenju izognejo tako, da začnejo izločati dejavnike, ki zmotijo predstavljanje

antigena, zorenje DC pa preusmerijo v celice, ki zavirajo imunski sistem. Ko se tak obrat enkrat zgodi, vnetje ne služi več odstranjevanju patoloških celic, ampak spodbuja rast tumorja; preko zaviranja T celičnih odzivov in tudi spodbujanja angiogeneze. Eden od teh dejavnikov, ki se izločajo iz tumorskih celic, je že omenjeni prostaglandin E<sub>2</sub>.

Prostaglandin E<sub>2</sub> (v nadaljevanju PGE<sub>2</sub>) je endogeni lipidni mediator, ki se sprošča ob vnetnih pogojih. Izdelujejo ga družina encimov ciklooksigenaza oz. COX (stalno prisotna COX1, inducibilna COX2) ter prostaglandin sintaza [96], je edini od metabolitov arahidonske kisline, ki ima vlogo pri regulaciji celičnih in humorálnih imunskih odgovorov. Običajno ima vlogo zaviralca imunskega odgovora, njegova vloga je odvisna od njegove koncentracije, stanja diferenciacije tarčne celice in trajanje interakcije tarčne celice s PGE<sub>2</sub>. Nastaja v praktično vseh tkivih, razen v eritrocitih. [97, 98] Njegova koncentracija je odvisna od ravnotežja med nastanjem s COX2 in razgradnjo, ki jo izvaja encim 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza oz. 15-PGDH. [99] Delujejo preko 4 različnih prostaglandinskih receptorjev: EP1 – EP4. [98]

Njegova vloga v imunskemu odzivu je spodbujanje akutnega vnetja in nespecifičnega imunskega odgovora na mestu okužbe, hkrati pa tudi zaviranje citotoksičnega T-celičnega odgovora in preusmeritev v manj agresivne oblike imunskega odgovora in spodbujanje imunosupresivnih faktorjev, še posebej pri kroničnih vnetjih.

Kot mediator akutnega vnetja deluje na makrofage, nevtrofilce in mastocite, jih aktivira in privabi na mesto okužbe/vstopa antigena, deluje pa tudi na žilne endotelije in povzroči lokalno vazodiltacijo. [100, 101] Ne deluje pa stimulatorno na vse celice prirojenega imunskega odziva: zavira citolitično aktivnost celic naravnih ubijalk NK (natural killer, angl.) in njihovo izločanje IFN-γ, kar posledično pripomore k zaviranju Th1 in Tc celičnega odziva. [102] PGE<sub>2</sub> zavre tudi granulocite [103] in omeji aktivnost makrofagov[104, 105].

Nasploh PGE<sub>2</sub> zavira rast in razmnoževanje limfocitov T [106, 107], vendar učinki niso enaki v vseh koncentracijskih območjih. V nizkih koncentracijah preusmeri imunski odgovor s Th1 celičnega odgovora v manj agresivna Th2 in Th17 celična odgovora, saj povzročita manjše poškodbe tkiva. [108] Vpliv na limfocite Th1 pa ni samo direkten, ampak tudi posreden, saj zavre izločanje IL-12 (iz monocitov in DC), ki je za njihovo nastajanje in aktivacijo pomemben citokin. [109] Eden glavnih mehanizmov zaviranja

aktivnosti limfocitov T pa je, da PGE<sub>2</sub> zavre izločanje IL-2 in odzivnost limfocitov T nanj. [110, 111] IL-2 ima namreč zelo pomembno vlogo pri njihovi aktivaciji . Izločajo ga predvsem aktivirani limfociti T, deluje kot avto- in parakrini rastni faktor. Količina sintetiziranega IL-2 je pomembna za jakost in obseg T-celičnega imunskega odziva. [112] Aktivnost limfocitov T je onemogočena tudi preko vpliva na antigen predstavljeno funkcijo DC, saj PGE<sub>2</sub> zmanjša izražanje molekul PHK II [113], liganda CCL19 (ta povzroči migracijo limfocitov T v bezgavke), zavre se sposobnost DC, da bi privabile naivne limfocite T [114], zavre pa se tudi diferenciacija funkcionalno kompetentnih DC, ki bi sprožile ustrezni Th1 celični odgovor [115], namesto njih nastanejo imunosupresorne MDSC.

## **2. HIPOTEZA IN NAMEN DELA**

Nastanek in razvoj tumorja je proces, ki ga pogojuje več dejavnikov. Pomembno vlogo pri tem igra imunski odziv. Tumorske celice preprečujejo, da bi jih imunski sistem prepoznal in odstranil preko izločanja številnih dejavnikov in indukcije nastanka imunskih celic, ki omogočajo preživetje in širjenje tumorja. Med imunskimi celicami, ki so prisotne v tumorskem okolju, so tudi t.i. imunosupresivne celice mieloidnega izvora oz. MDSC, ki izločajo različne dejavnike in zavirajo ustrezni imunski odziv. V tumorskem mikrookolju so prisotne tudi Treg in Th17 celice, katerih vloga pri nastanku in napredovanju raka ni znana. Prav tako ni znano, kateri dejavniki in/ali celice v tumorskem okolju sprožijo njihov nastanek.

Naša hipoteza je dokazati, da sta v procesu nastanka Th17 celic pri raku udeležena dejavnika prostaglandin E<sub>2</sub> in NO iz MDSC. Namen dela je dokazati ter tudi ovrednotiti pomen PGE<sub>2</sub>, NO in nekaterih drugih dejavnikov, ki jih izločajo MDSC pri procesu nastanka Th17 celic. Identifikacija dejavnikov, ki so udeleženi v procesu vzpostavitve imunosupresivnega okolja in določitev mehanizmov njihovega delovanja pri regulaciji protitumorskega imunskega odziva ter ugotovitev vloge posameznih imunskih celic bo omogočila nove potencialne terapevtske načine pri zdravljenju raka.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

##### Reagenti in mediji

Pri delu smo uporabljali spodaj naštete medije, reagente, citokine in protitelesa:

**Preglednica I:** Mediji, reagenti, citokini in protitelesa, ki smo jih uporabljali pri delu, ter njihov proizvajalec.

Medij	Proizvajalec	
Limfocitni separacijski medij	Sigma Aldrich	
Medij AIM	Invitrogen	
Medij Histopaque	Sigma Aldrich	
Medij IMDM	Invitrogen	
Medij RPMI	Sigma Aldrich	
Reagent	Proizvajalec	
10% FCS	Gemini	/
9-cis retinojska kislina	Sigma Aldrich	10 nM
Analog cGMP Br-cGMP	Sigma Aldrich	100 µM
Brefeldin A	Sigma Aldrich	10 µg/ml
CD4 <sup>+</sup> obogatitveni koktejl	Miltenyi Biotec GmbH	/
CD4 <sup>+</sup> in CD8 <sup>+</sup> obogatitveni komplet	Miltenyi Biotec GmbH	/
CD3/CD28 beadsi za stimulacijo	Invitrogen Dynal AS	2,0 µl/ml
DETA NONOat	Cayman Chemical	/
EDTA	Invitrogen	0,5 M
GlutaMax	Invitrogen	100x

Griessov reagent (komplet)	Invitrogen	/
Inhibitor NOS2 140W	Sigma Aldrich	/
Inhibitor arginaze nor-NOHA	Cayman Chemical	200 µM
Inhibitor cGMP ODQ	Sigma Aldrich	10 µM
Inhibitor COX2 celekoksib	Sigma Aldrich	20 µM
Inhibitor NOS2 ADMA	Sigma Aldrich	200µM
Inhibitor Stat3 JSI124	Sigma Aldrich	0,1 µM
Ionomicin	Sigma Aldrich	1µg/ml
Izolacijski komplet CD14 MACS® CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec Inc.	/
Ojačevalec za ligande	Enzo Life Sciences	1 µg/ml
Označevalni komplet CFSE	Invitrogen	/
Penicilin/streptamicin	Invitrogen	/
PMA	Sigma Aldrich	50 ng/ml
Topni CD40L	Enzo Life Sciences	1 µg/ml
<b>Protitelo</b>	<b>Proizvajalec</b>	
Monoklonsko protitelo proti IL-10	R&D	
Označena protitelesa za pretočno citometrijo	BD Pharmingen in eBioscience	
Protitelo za blokado CD40L	R&D	
Protitelesi proti IFN-γ-(FITC), IL- 17-(PE)	eBioscience	
Protitelo proti Foxp3-(označeno z Alexa Fluor 488)	BioLegend	
Citokin	Proizvajalec	Koncentracija
IL-1β	Miltenyi Biotec. Inc	20 ng/ml
IL-4	Miltenyi Biotec. Inc	1000 enot/ml
IL-6	Miltenyi Biotec. Inc	50 ng/ml
IL-17	R&D	/

IL-23	R&D	10 ng/ml
GM-CSF	Miltenyi Biotec. Inc	1000 enot/ml
TGF- $\beta_1$	R&D	10 ng/ml
TNF- $\alpha$	Miltenyi Biotec. Inc	50 ng/ml

### Aparature in oprema

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in opremo:

**Preglednica II:** Aparature in oprema, ki smo jih uporabljali pri delu.

Naprava/oprema	Proizvajalec
Avtoklav Varioklav	HP Laboratory Technik Dampfsterilisatoren
Avtomatska pipeta (10, 100, 200, 1000 $\mu$ l)	Eppendorf research
Centrifuga Universal 320R	Hettich zentrifugen
Centrifugirske (15 in 50 ml)	Falcon
Hladilnik in zamrzovalnik	Gorenje
Inkubator z ogljikovim dioksidom	WTC Binder
Komora z laminarnim pretokom zraka Pio LFVP 12	Iskra
Magnetni ločevalnik za separacijsko kolono	Miltenyi Biotech
Magnetno stojalo za separacijsko kolono MACS multistand	Miltenyi Biotech
Mikrotitrská ploščica z 12 vdolbinicami	IWAKI
Mikrotitrská ploščica s 24 vdolbinicami	Corning Costar
Mikrotitrská ploščica z 96 vdolbinicami	TPP
Mini centrifuga	LMS
Multikanalna polavtomatska pipeta	Costar

Multikanalna polavtomatska pipeta	Transferette, Brand
Pipetni pripomoček (pipet-aid)	Drummond Scientific
Pretočni citometer FACSCalibur	BD Biosciences
Separacijska kolona MACS 25 LS	Miltenyi Biotech
Serološke pipete (1, 5, 10, 25 ml)	LGG (Kefo)
Skrinja -80°C MDF-53V	Sanyo
Spektrofotometer Infinite M1000	Tecan
Svetlobni mikroskop CKX41	Olympus
Tehtnica AJH 4200 CE	Tehtnica Železniki
Vakuumski filtracijski sistem (500 ml)	TPP
Vibracijski stresalnik EV-102	Tehtnica Železniki

### 3.2. METODE

#### Izolacija naivnih in spominskih CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> celic iz periferne krvi

Mononuklearne celice periferne krvi smo izolirali iz zgoščene krvi zdravih darovalcev z uporabo limfocitnega separacijskega medija. Zgoščena kri predstavlja komponento krvi, ki je bila pridobljena s centrifugiranjem enote polne krvi in vsebuje pomemben delež eritrocitov, levkocitov in trombocitov. Zgoščena kri je bila pripravljeni na Zavodu RS za transuzijsko medicino Ljubljana (dovoljenje etične komisije 21p/08/11). Limfocite T smo izolirali iz mononuklearnih celic (levkocitna frakcija) periferne krvi z negativno selekcijo. Uporabili smo CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> obogatitveni komplet v kombinaciji z CD45RO<sup>-</sup> ali CD45RA<sup>-</sup> izločitvenimi protitelesi, na koncu smo dobili enotno populacijo CD4<sup>+</sup>/8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>CD45RO<sup>+/-</sup> celic.

### **Izolacija MDSC in OvCa infiltrirajočih CD4<sup>+</sup> T celic (TIL)**

Ascitesna tekočina je bila odvzeta intraoperativno na Ginekološki kliniki v Ljubljani, UKCLJ, iz predhodno nezdravljenih patientk z napredovalim epiteljskim rakom jajčnikov v stopnji III ali IV. Pred posegom so bile patientke obveščene in so privolile k sodelovanju pri raziskavi. Razložena jim je bila narava in posledice študije. Pridobljena je bila tudi njihova pisna privolitev. Vsi vzorci so bili priskrbljeni v skladu s protokoli Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 2lp/08/11). Primarne celice, izolirane iz ascitesne tekočine rakavih bolnic, smo izolirali s centrifugiranjem. Centrifugiranju je sledila liza rdečih krvnih celic in pozitivna magnetna selekcija celic CD11b<sup>+</sup>. Izolirane celice so bile >95% čiste CD11b<sup>+</sup> in so enotno izražale CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> MDSC fenotip (v nadaljevanju OvCa MDSC). [116] Po pozitivni magnetni selekciji celic CD11b<sup>+</sup> smo pridobili celice CD4<sup>+</sup> (TIL) z negativno selekcijo, uporabili smo CD4<sup>+</sup> obogatitveni komplet. Kontrolne celice CD11b<sup>+</sup> smo izolirali iz zgoščene krvi po enakem postopku.

### **Izolacija PBMC (angl. peripheral blood mononuclear cells, mononuklearne celice periferne krvi)**

Celotno količino zgoščene krvi (cca. 45 ml) smo razdelili v 4 centrifugirke (cca. 11 ml), jim dodali enako količino medija RPMI, ter premešali. Nato smo previdno na dno vsake centrifugirke dodali medij za ločevanje celic Histopaque ( $\rho=1,077$  g/ml), ki s pomočjo gradienta gostote medija in krvi loči PBMC od trombocitov in eritrocitov. Sledilo je centrifugiranje mešanic, 25 min, 2300 obratov/min, pospešek=2m/s, pojemek=0m/s. Po centrifugiranju smo v vsaki centrifugirki zgornjo plast, ki vsebuje trombocite, odstranili, plast na meji med plazmo in medijem pa smo prenesli v novo centrifugirko. Izoliranim PBMC smo do volumna 50 ml dodali medij RPMI, vsebino premešali, ter centrifugirali 8 min pri 1600 obratov/min. Supernatant smo odlili, ter ponovno dodali medij RPMI do volumna 50 ml, premešali, ter centrifugirali 8 min pri 1300 obratov/min. Supernatant smo ponovno odlili, združili vsebino dveh centrifugirk, dodali medij RPMI do volumna 50 ml, premešali, ter centrifugirali 8 min pri 1100 obratov/min. Supernatant smo odlili, vsebino združili v eno centrifugirko, ter dodali medij AIM do volumna 50 ml. Izolirane celice smo prešeli pod mikroskopom: V primeru da so bili poleg PBMC prisotni tudi trombociti, smo slednje odstranili s centrifugiranjem pri nizkih obratih.

## **Pretočna citometrija**

Pretočna citometrija je tehnika, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi kapilaro pretočnega citometra, kjer jih osvetljujemo z ozkim snopom laserske svetlobe. V eni sekundi lahko analiziramo več tisoč celic, kar nam da zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnosti celic v vzorcu. Svetlobni žarek zadene ob celico, se odbije, lomi ali pa se absorbira v fluorokromih, ki jih predhodno vežemo na celice. Celica z vezanim fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine.

Analizo dvo- in tribarvnega imunskega barvanja celic smo izvedli na pretočnem citometru. Celice iz ascitesne tekočine raka jajčnikov smo označili s protitelesi CD11b-FITC, CD33-APC, CD34-PE/Cy7, HLADR-FITC, CD14-PE, CD80-FITC, CD83-PE, CD15-PE, CD8-FITC. IL-23R smo določili z IL-23R-FITC mAb. Za izotipske kontrole smo uporabili podganja IgG<sub>2a</sub>-PE, IgG<sub>2a</sub>-FITC, IgG<sub>1</sub>-FITC, IgG<sub>1</sub>-APC, IgG<sub>1</sub>-PE/Cy7 protitelesa.

## **Th17 diferenciacija**

Limfocite T smo stimulirali s CD3/CD28 v prisotnosti oz. odsotnosti OvCa MDSC in prisotnosti oz. odsotnosti kontrolnih CD11b<sup>+</sup> celic, ki so bile netretirane ali pa tretirane z inhibitorji določenih encimov, ali v prisotnosti pro-Th17 citokinskega kompleta: IL-1β, IL-23, IL-6 in/ali TGF-β. Tretiranje celic z določeno snovjo pomeni, da je bila le-ta v določeni koncentraciji prisotna v mediju, ki smo ga dodali celicam.

Limfocite T pa smo stimulirali tudi z nezreliimi ali zreliimi DC. Nezrele monocite smo izolirali s pozitivno magnetno selekcijo CD14<sup>+</sup> celic, jih 6 dni gojili v prisotnosti rekombinantnih humanih GM-CSF in IL-4 v ploščah s 24 vdolbinicami. Zrele monocite smo 48 ur zoreli s TNF-α.

Na 4.-6. dan smo namnožene limfocite T analizirali, če izražajo dejavnike, povezane s Th17 diferenciacijo (izražanje mRNK), ter če izločajo za Th17 fenotip značilne citokine (ELISA). Na 7. in 8. dan smo namnožene celice ponovno stimulirali, nato pa izvedli znotrajcelično označevanje, kot je opisano v nadaljevanju.

## **ELISA**

Encimski imunski test na trdnem nosilcu (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je ena izmed imunoloških tehnik, ki omogoča detekcijo antigenov ali protiteles. Intenziteta barvne reakcije je sorazmerna s številom kompleksov primarno protitelo-antigen-sekundarno protitelo. Število teh je odvisno od koncentracije antigena v vzorcu.

Pufri za ELISA test:

- PBS (pH 7,4)
- pufer za spiranje: 0,5% Tween v PBS
- pufer za blokado: 3% BSA v PBS
- substratni pufer (pH 6,0) za TMB-Sigma: 188,5 mL 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 121,5 mL 0,1 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O + 250 mL destilirane vode
- raztopina za prekinitev reakcije s substratom: 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Postopek izvajanja direktnega ELISA testa:

Prekrivanje mikrotitrsko ploščice: primarna protitelesa ustrezzo redčimo v PBS in v vsako vdolbinico mikrotitrsko ploščice odpipetiramo po 50 µL te raztopine ter ploščo prekrijemo s folijo.

Inkubacija poteka čez noč pri sobni temperaturi.

Spiranje in osušitev ploščice: z multikanalno pipeto ročno 3-krat speremo ploščo s pufrom za spiranje in osušimo.

Blokada: v vsako vdolbinico odpipetiramo po 150 µL pufra za blokado in pokrijemo s folijo.

Inkubacija poteka 30 minut do 2 uri na sobni temperaturi. Nato odstranimo pufer za blokado in ploščico osušimo.

Vezava antigena: za standardno krivuljo pripravimo ustrezzo razredčitveno vrsto v pufru za blokado. V vsako vdolbinico odpipetiramo po 50 µL standarda oziroma razredčitvenega vzorca. Vzorce ustrezzo redčimo s pufrom za blokado in odpipetiramo po 30 µL v vsako vdolbinico. Za kontrole odpipetiramo v vsako vdolbinico po 50 µL pufra za blokado. Ploščo nato pokrijemo s folijo.

Inkubacija poteka 2 uri pri 37°C.

Spiranje in osušitev plošče: z multikanalno pipeto ročno 3-krat speremo ploščo s pufrom za spiranje in osušimo.

Vezava sekundarnih (detekcijskih) protiteles konjugiranih s streptamicinom: sekundarna protitelesa razredčimo s pufrom za blokado in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 30 µL raztopine.

Vezava protiteles označenih z encimom (konjugat biotin-hrenova peroksidaza): protitelesa označena z encimom razredčimo s pufrom za blokado in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 100 µL raztopine.

Inkubacija poteka 2 uri pri 37°C.

Spiranje in osušitev plošče: z multikanalno pipeto ročno 3-krat speremo ploščo s pufrom za spiranje in osušimo.

Reakcija s substratom: TMB-Sigma (substrat za hrenovo peroksidazo, tetrametilbenzidin) redčimo s substratnim pufrom s pH 6,0 in odpipetiramo po 200 µL v vsako vdolbinico. Pokrijemo s folijo in pustimo na sobni temperaturi 15 minut. Nato dodamo v vsako vdolbinico po 50 µL raztopine za prekinitev reakcije in na čitalcu odčitamo absorbanco pri 450 nm.

Test smo izvajali za analizo izločanja IL-17 in IFN- $\gamma$ , ki so jih izločile limfociti T peti dan gojenja, oz. celice, sprane na 7.-8. dan in ponovno prenesene na plošče v koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/ml in ponovno stimulirane s CD3/CD28 za 24-48 ur. S pomočjo ELISA smo analizirali tudi produkcijo IL-23, ki so ga izločale OvCa MDSC iz ascitesne tekočine ali kontrolne CD11b $^+$  izolirane iz krvi, in sicer po 24 urni stimulaciji s celicami J558, ki izražajo CD40L oz. s topnim CD40L, s CD4 $^+$  celicami oz. CD8 $^+$  celicami (v prisotnosti ali odsotnosti topnega CD40L). Medij iz ascitesne tekočine OvCa MDSC oz. iz kontrolnih CD11b $^+$  celic smo 24 ur po izolaciji analizirali za IL-6, IL-10, IL-23, IL-1 $\beta$  in TGF- $\beta$ .

## **Znotrajcelično barvanje**

Za produkcijo citokinov smo stimulirali limfocite T s PMA (forbol-12-miristat-13-acetat) in z ionomicinom, po 4 urah pa smo dodali še brefeldin A, ki preprečuje znotrajcelični transport in zadrži producirane citokine znotrajcelično. Inkubacija je potekala 4-10 ur, nato smo celice zbrali, fiksirali in permeabilizirali z raztopino FoxP3 fiksirnega/permeabilizacijskega kompleta. Pri nadalnjem znotrajceličnem barvanju smo uporabili sledeča protitelesa: IFN- $\gamma$ -FITC, IL-17-PE, Foxp3-Alexa Fluor 488. Celice smo inkubirali s protitelesi 30 minut pri sobni temperaturi, nevezana protitelesa sprali in celice resuspendirali v 4% paraformaldehidu.

## **Taqman analiza izražanje mRNK**

Real time PCR (rt-PCR) oz. PCR v realnem času je tehnika za detekcijo in kvantifikacijo specifičnih genov v vzorcu. Pri tehniki TaqMan uporabljam hidrolizne vzorce, ki povečajo specifičnost rt-PCR. Ti vzorci so po svoji zgradbi oligonukleotidi, ki so komplementarni točno določenemu iskanemu genu, označeni pa so s kovalentno vezanim fluoroforom in dušilcem. Dušilec je molekula, ki preprečuje emitiranje svetlobe fluorofora, dokler je ta vezan na verigo TaqMan vzorca. Med pomnoževanjem genskega odseka encim polimeraza Taq sintetizira komplementarno verigo odseku DNK, ki se pomnožuje. Encim ima tudi eksonukleazno aktivnost, ko pride do TaqMan vzorca, vezanega na določen gen, ga razgradi, kar povzroči sprostitev fluorofora in dušilca. Fluorofor začne oddajati svetljivo določene valovne dolžine, kar detektiramo s spektrofotometrom in tudi kvantitativno ovrednotimo količino nastale DNK.

Izražanje mRNK smo analizirali pri OvCa MDSC in pri kontrolnih CD11b<sup>+</sup> celicah, izoliranih iz krvi po izolaciji oz. po 24 urah stimulacije s CD40; pri OvCa primarnih celičnih kulturah, stimuliranih s CD3/CD28 na 7.-8. dan; ter pri CD4<sup>+</sup>-TIL celicah, naivnih in spominskih celicah CD4<sup>+</sup> na 4.-6. dan. Taqman analizo smo izvajali na StepOne Plus System napravi (Applied Biosystems), pri čemer smo uporabljali sledeče primerje: ID genov: arg1:Hs00163660, cox2:Hs00153133, il10:NM\_000572, tgfb1:NM\_000660, il12p35:NM\_000882, il12/23p40:NM\_002187, il23p19:NM\_016584, il17a:Hs00174383, il17f:hs01028648, il2ra:Hs00907779, il21r:Hs00222310, il23r:Hs00332759, il12r $\beta$ 1:Hs00538167, nos2:Hs01075527, roryt:Hs01076112, tbet:Hs00203436, gata3:NM\_002051, foxp3:Hs00203958). Izražanje vsakega izmed genov smo normalizirali

na HPRT1, izražanje pa smo izrazili kot relativno izražanje, torej faktor pomnožitve ( $2^{\Delta CT}$ ), pri čemer  $\Delta CT = CT_{(\text{tarčni gen})} - CT_{(\text{HPRT1})}$ .

### **Statistična analiza**

Vse podatke smo ovrednotili s programsko opremo Prism Version 5 (GraphPad) in analizirani z obojestranskim Studentovim t-testom. Rezultate s  $P < 0,05$  smo privzeli za signifikantno različne (označeni s \*); rezultati s  $P < 0,01$  so označeni s \*\*; rezultati z oznako \*\*\* pa imajo  $P < 0,001$ . Linearno korelacijo med dvema trajajočima spremenljivkama smo testirali s koeficientom korelacije  $r^2$ .

## **4. REZULTATI**

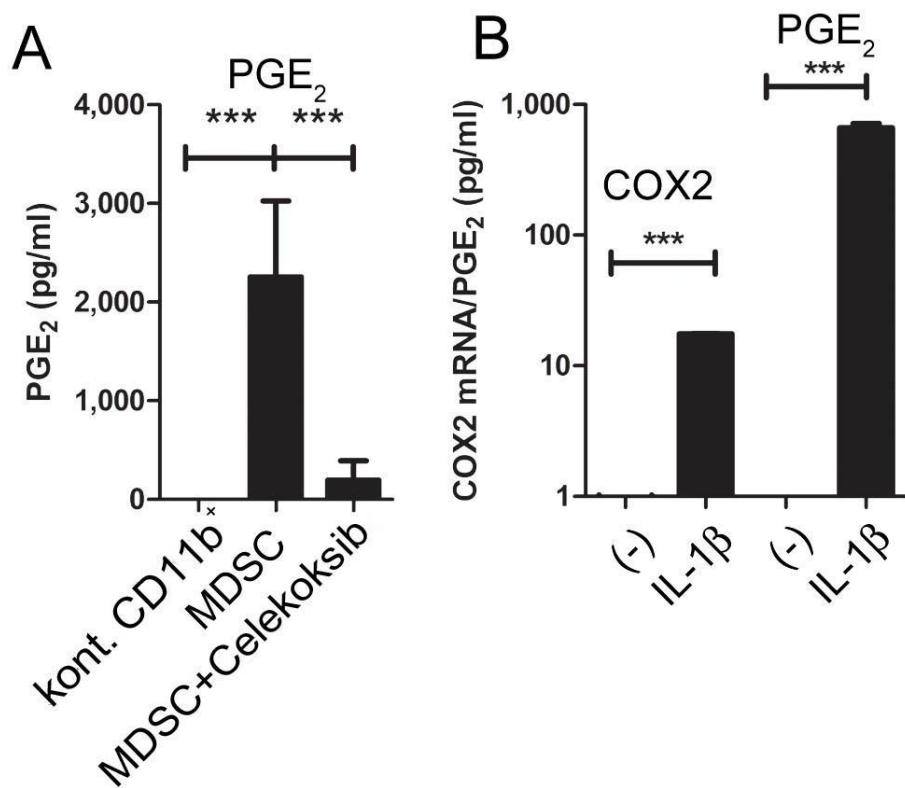
### **PGE<sub>2</sub> inducira nastanek MDSC in nadzoruje njihovo imunosupresivno delovanje**

Endogeni PGE<sub>2</sub>, katerega produkcijo smo sprožili z aktivatorji encima COX2 (LPS, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ), povzroči preusmeritev diferenciacije monocitov v MDSC (namesto v CD1a $^+$  DC). Nastale MDSC sproščajo za MDSC tipične imunosupresivne dejavnike: PGE<sub>2</sub>, IDO1, IL-4R $\alpha$ , NOS2 in IL-10. Nastanek MDSC značilnega fenotipa smo lahko sprožili tudi in vitro, če smo h kulturi monocitov s GM-SCF/IL-4 dodali eksogeni PGE<sub>2</sub>, ki ravno tako aktivira COX2 v monocitih in sproži pozitivno zanko PGE<sub>2</sub>/COX2 v MDSC, ki smo jo prekinili z dodatkom inhibitorja COX2 in z EP2/EP4 antagonisti. Naši rezultati se ujemajo z že objavljenimi rezultati. [117]

## Endogeni PGE<sub>2</sub> nadzira proizvodnjo Th17 polarizirajočih citokinov v človeških rakavih MDSC.

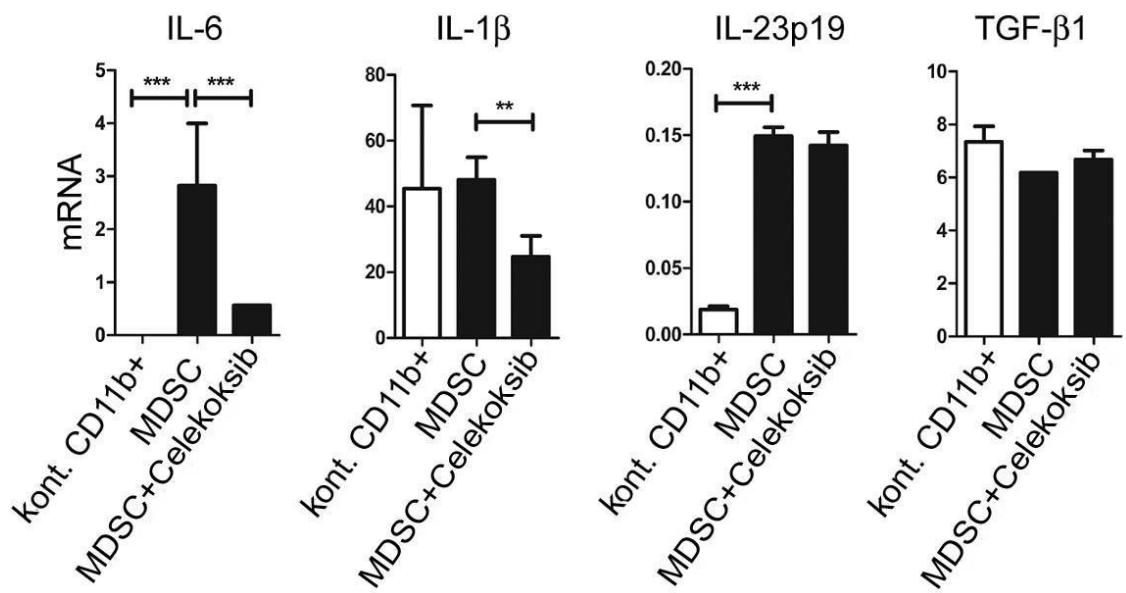
MDSC v primerjavi s kontrolnimi celicami CD11b<sup>+</sup>, izoliranimi iz krvi, močno izražajo COX2 in proizvajajo večje količine PGE<sub>2</sub>. MDSC proizvajajo tudi IL-1β, IL-6 in TGF-β, ki so že znani regulatorji izražanja Th17 fenotipa. Hkrati IL-1β inducira aktivnost COX2 (slika 1). Za razliko od produkcije naštetih citokinov je za povečano proizvodnjo IL-23 v MDSC potrebna stimulacija s CD40L. [22, 23] Inhibicija COX2 zmanjša endogeno sintezo PGE<sub>2</sub>, ter zmanjša sintezo IL-1β in IL-6 v MDSC, medtem ko endogeni PGE<sub>2</sub> ne vpliva na sintezo TGF-β (slike 2, 3 in 4).

IL-6 povzroči povečano proizvodnjo IL-23, medtem ko jo blokada IL-6 zelo zmanjša, tako v MDSC, izoliranih iz OvCa, kot pri kontrolnih celicah CD11b<sup>+</sup>, kjer smo sintezo IL-23 inducirali s PGE<sub>2</sub>. (slika 5)

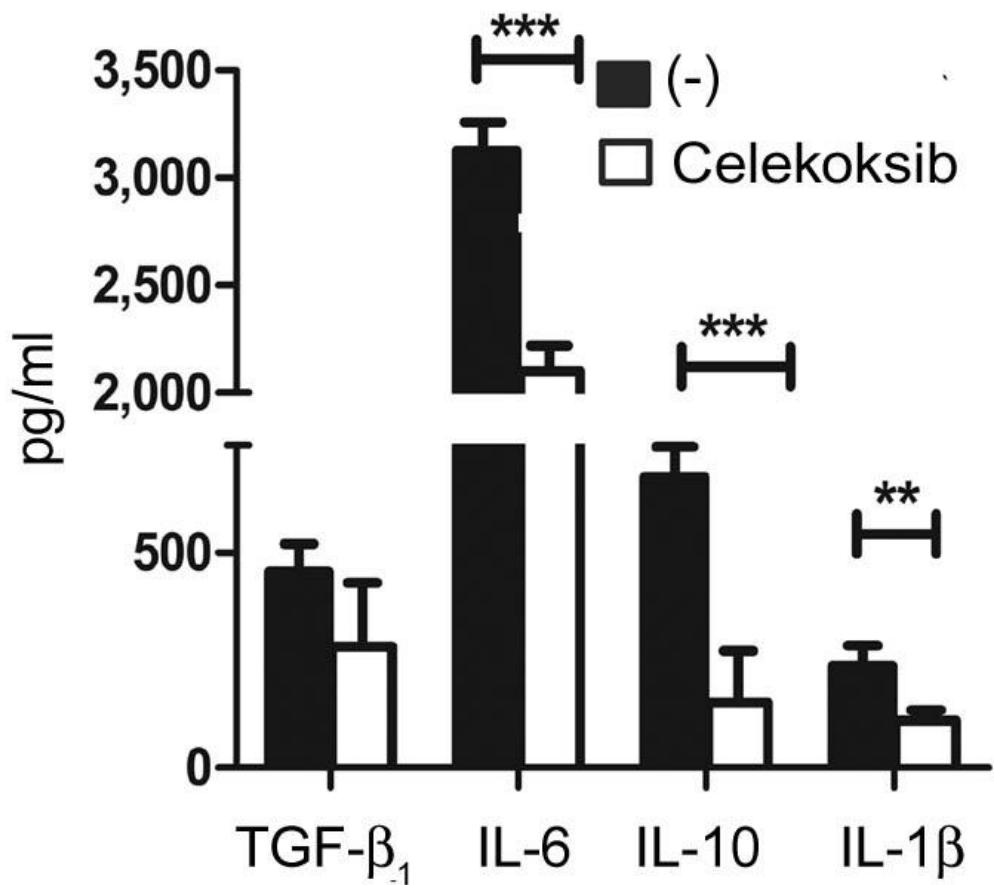


**Slika 1A:** PGE<sub>2</sub>, ki je prisoten v tumorskem okolju, spodbuja produkcijo endogenega PGE<sub>2</sub> v MDSC.

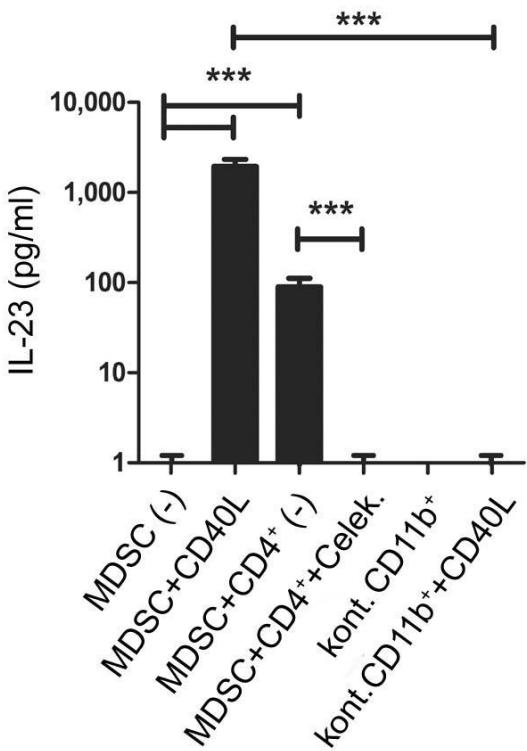
**1B:** Izražanje COX<sub>2</sub> oz. izločanje PGE<sub>2</sub> iz kontrolnih CD11b<sup>+</sup> celic v odsotnosti oz. prisotnosti IL-1β.



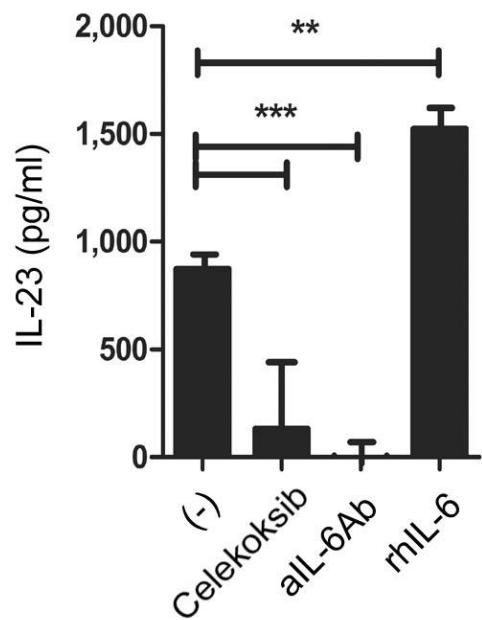
**Slika 2:** Vpliv PGE<sub>2</sub> na relativno izražanje citokinov IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23p19 in TGF- $\beta$ 1 iz MDSC.



**Slika 3:** Prisotnost inhibitorja COX2 celekoksiba zmanjša izločanje dejavnikov TGF- $\beta$ 1, IL-6, IL-10 in IL-1 $\beta$  iz MDSC.



**Slika 4:** Producija IL-23 iz MDSC, ki se sproži po stimulaciji s CD40L, se ustavi ob prisotnosti celekoksiba (na sliki krajšano celek.).



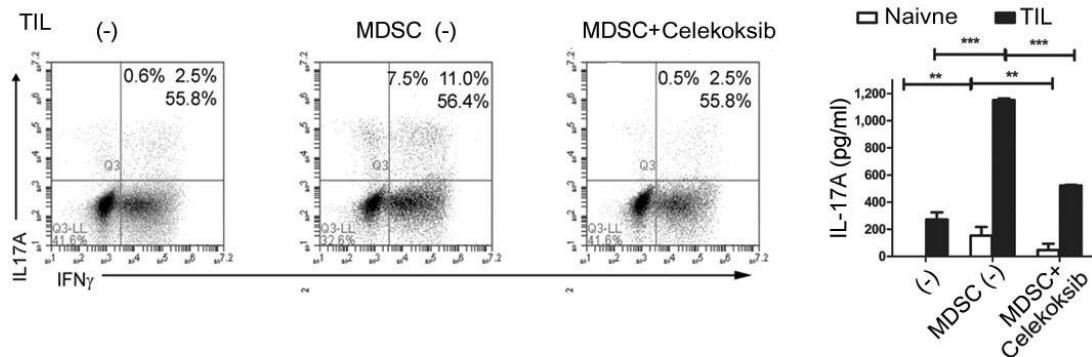
**Slika 5:** PGE<sub>2</sub> in IL-6 spodbujata izločanje IL-23 iz MDSC.

## Indukcija in namnožitev celic Th17 je odvisna od COX2/PGE<sub>2</sub> in EP2&EP4 signalizacije.

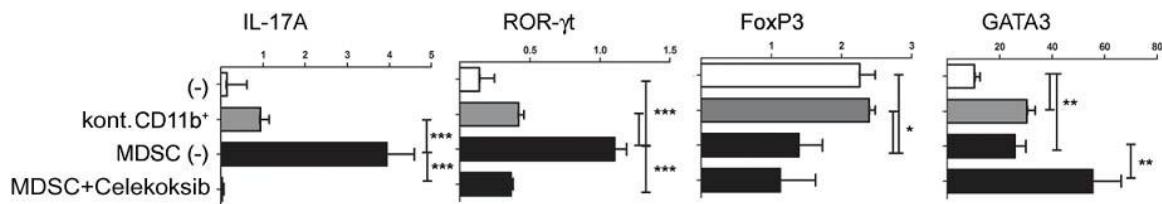
Medtem ko so MDSC supresivne in zavirajo proliferacijo CD8<sup>+</sup> TIL (tumor infiltrirajočih limfocitov), ne zavirajo proliferacije CD4<sup>+</sup> celic, temveč v kokulturah s TIL inducirajo nastanek CD4<sup>+</sup> Th17 celic, ki proizvajajo za njih značilni IL-17A (slika 6) in izražajo transkripcijski dejavnik ROR $\gamma$ t (slika 7). MDSC ne vplivajo na proizvodnjo IFN- $\gamma$  (slika 6), ter prav tako ne spremenijo izražanja FoxP3 v primerjavi s kontrolnimi CD11b<sup>+</sup> celicami. (slika 7)

Potrdili smo, da se med CD4<sup>+</sup> celicami v ascitesni tekočini OvCa nahajajo tudi Th17 celice, katerih delež se po CD3/CD28 stimulaciji v prisotnosti MDSC precej poveča v primerjavi s kokulturami s kontrolnimi CD11b<sup>+</sup> celicami. (slika 6)

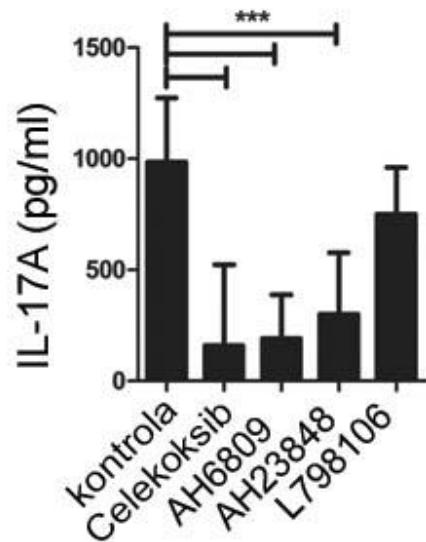
Endogeni PGE<sub>2</sub> preko svojih EP2 in EP4 [45, 118, 119] in COX2/PGE<sub>2</sub> pozitivne povratne zanke uravnava produkcijo Th17 usmerjajočih citokinov iz MDSC in vpliva na Th17 diferenciacijo. Inhibicija COX2, pa tudi zaviranje EP2 in EP4 signalizacije (z inhibitorjem AH6809 in AH23848) zmanjša proizvodnjo IL-17A – tako v naivnih CD4<sup>+</sup> celicah kot pri celicah CD4<sup>+</sup>, izoliranih iz OvCa (TIL), medtem ko blokada EP3 receptorja (inhibitor L798106) nima takšnega učinka. (slika 8)



**Slika 6:** Delež IL-17A<sup>+</sup> in IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> celic med TIL (levo) ter produkcija IL-17A v CD3/CD28-aktiviranih naivnih CD4<sup>+</sup> celicah in TIL (desno), ki jih inducirajo MDSC in MDSC, tretirane s celekoksibom.



**Slika 7:** Relativno izražanje transkripcijskih dejavnikov v CD3/CD28-aktiviranih naivnih CD4<sup>+</sup> celicah v prisotnosti/odsotnosti kontrolnih CD11b<sup>+</sup> celic ali MDSC, ne/tretiranih s celekoksibom.



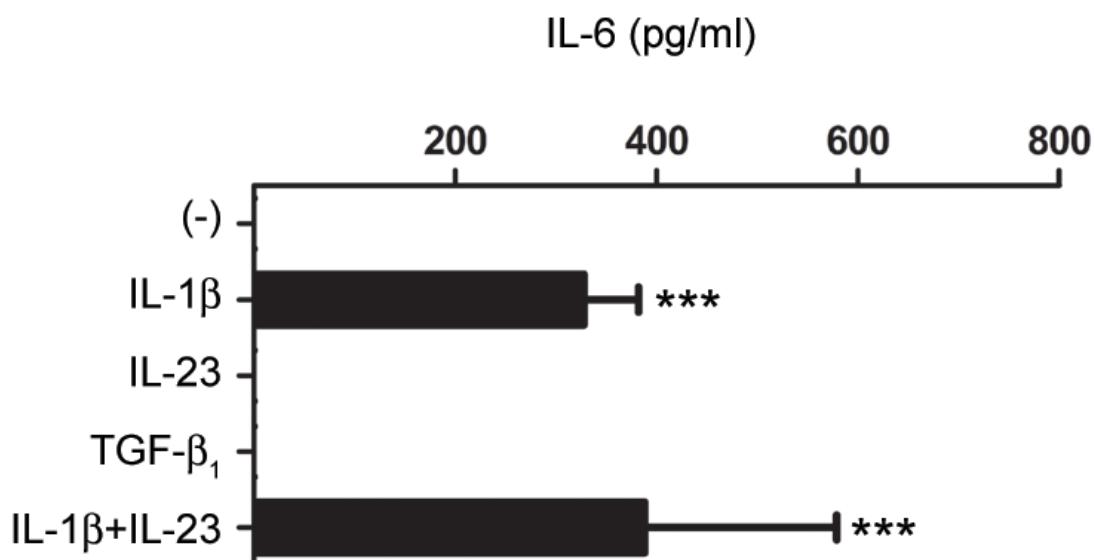
**Slika 8:** Vpliv celekoksiba in antagonistov posameznih EP receptorjev (AH6809 in AH23848 sta antagonist EP2 in EP4, L798106 pa je inhibitor EP3) na izločanje IL-17A iz TIL v prisotnosti MDSC.

**Preko COX2/PGE<sub>2</sub> regulirani Th17 polarizirajoči faktorji iz MDSC inducirajo CD4<sup>+</sup> celično endogeno COX2/PGE<sub>2</sub> povratno zanko, ki ohranja Th17 fenotip.**

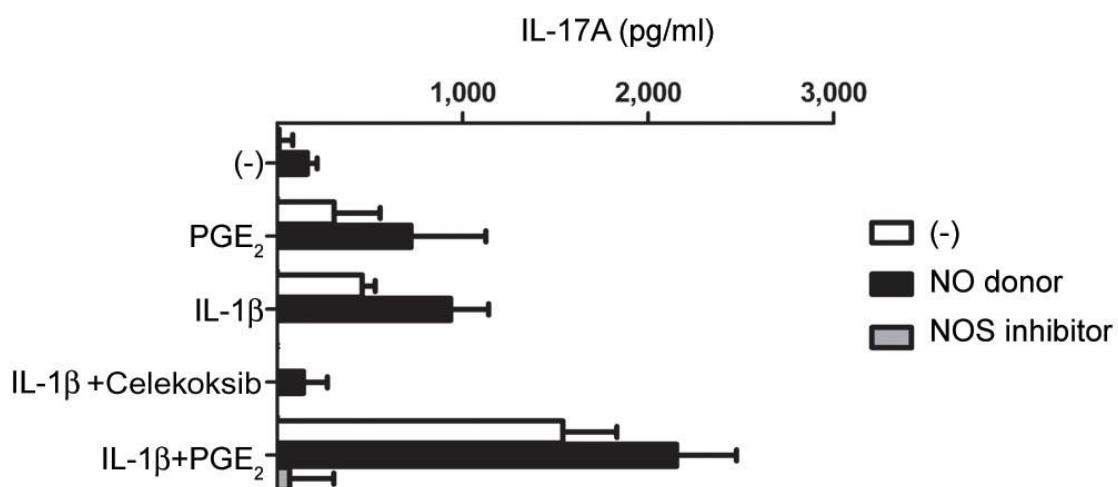
Th17-polarizirajoči dejavniki, ki jih inducira in uravnava PGE<sub>2</sub>/COX2 pozitivna povratna zanka v MDSC, delujejo na CD4<sup>+</sup> celice. Poleg tega, da sprožajo Th17 diferenciacijo, inducirajo tudi CD4<sup>+</sup> celične faktorje, ki delujejo sinergistično z MDSC stimulacijo Th17 fenotipa.

IL-1 $\beta$  sproži produkcijo IL-6 v CD4<sup>+</sup> celicah, ter sproži sintezo COX2 in proizvajanje endogenega PGE<sub>2</sub>. (slika 9)

PGE<sub>2</sub> je močan induktor NOS2 v CD4<sup>+</sup> celicah. Inhibicija NOS v CD4<sup>+</sup> celicah zaustavi tako z IL-6 kot z IL-1 $\beta$  sproženo Th17 diferenciacijo. Hkrati ob inhibiciji COX2 eksogeni NO ponovno inducira nastajanje IL-17A. (slika 10)



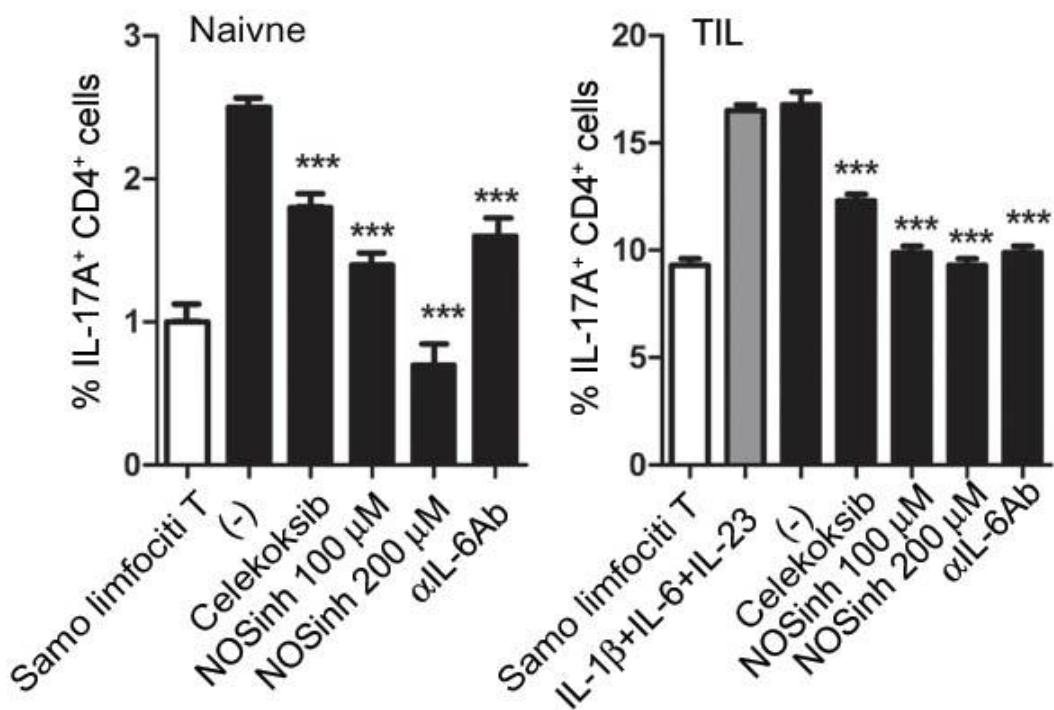
**Slika 9:** Producija IL-6 v CD3/CD28 aktiviranih naivnih CD4<sup>+</sup> celicah v odsotnosti in prisotnosti Th17-polarizirajočih citokinov IL-1 $\beta$  in IL-23/(TGF- $\beta_1$ )



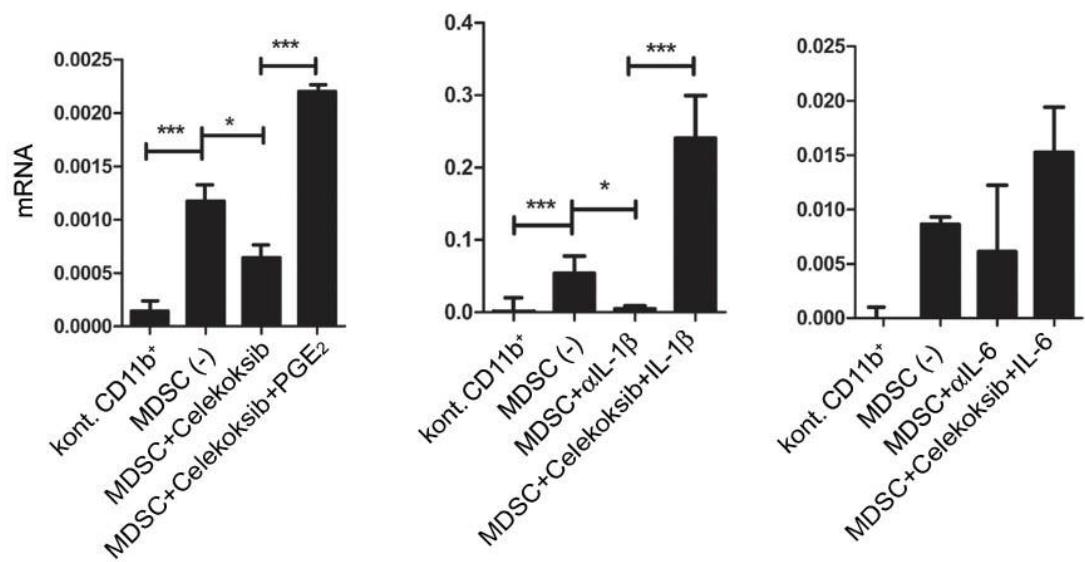
**Slika 10:** Medsebojni vpliv IL-1 $\beta$ , NO ter PGE<sub>2</sub> uravnava produkcijo IL-17 v naivnih CD4 $^{+}$  celicah.

**Indukcija in namnožitev Th17 celic je odvisna od NOS2/NO, ta pa regulirana preko PGE<sub>2</sub>.**

Kot že omenjeno, endogeni PGE<sub>2</sub> uravnava encim NOS2, ki proizvaja NO v MDSC. Izkazalo se je, da je NO eden izmed Th17 polarizirajočih dejavnikov. Medtem ko inhibicija NOS2 zavre diferenciacijo Th17 celic, ki jo povzročijo MDSC, inhibicija COX2 zavre NOS2 in s tem prepreči diferenciacijo celic Th17 iz CD4<sup>+</sup> celic. (slika 11) Izražanje NOS2 poleg PGE<sub>2</sub> uravnava tudi IL-1β, medtem ko ima IL-6 le zanemarljiv vpliv. (slika 12)



**Slika 11:** Vpliv PGE<sub>2</sub>, NOS in IL-6 inhibicije na indukcijo IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> celic ob CD3/CD28 aktivaciji naivnih CD4<sup>+</sup> celic (levo) oz. TIL (desno) v kokulturi z MDSC in kombinaciji citokinov IL-1β, IL-6 in IL-23.



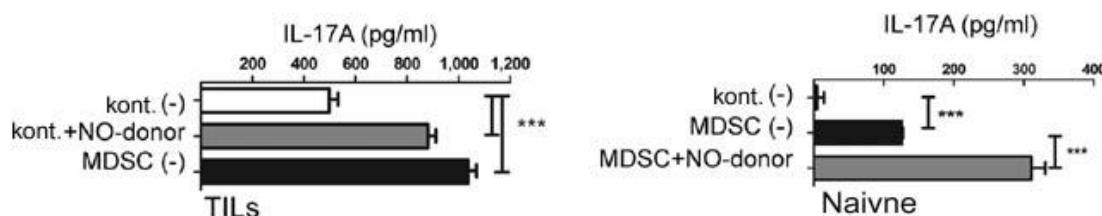
**Slika 12:** Medsebojni vpliv PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  ter IL-6 pri uravnavanju izražanja NOS2 v kontrolnih CD11b<sup>+</sup> celicah in MDSC.

**Th17 diferenciacija, tako z MDSC kot citokinsko inducirana, je odvisna od indukcije endogene NOS2 na humanih celicah T in njihove proizvodnje NO.**

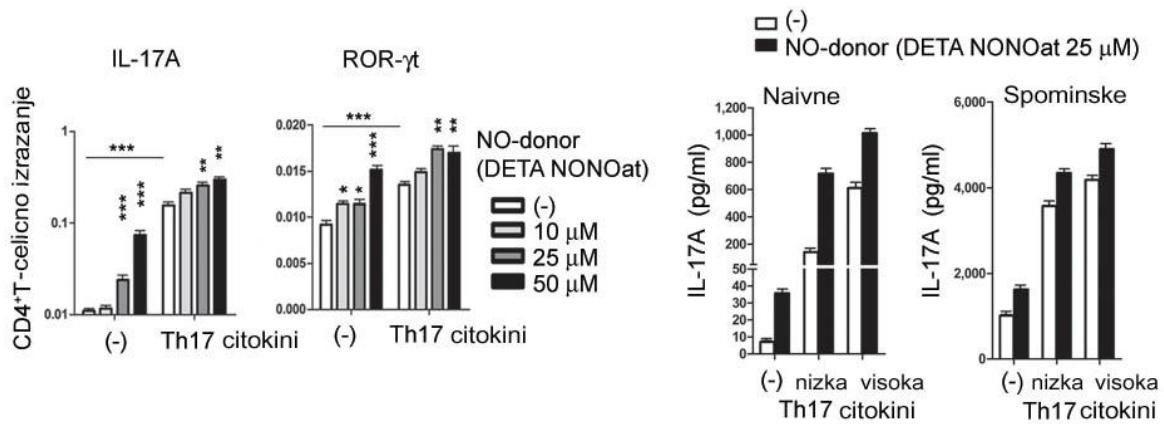
Eksogeni NO močno poveča indukcijo celic Th17 tudi v odsotnosti MDSC. (slika 13) Eksogeni NO je pri naivnih in spominskih celicah CD4<sup>+</sup> povzročil izražanje ROR $\gamma$ t in IL23R ter izločanje IL-17A in IL-17F (slika 14), ne pa tudi transkripcijskih dejavnikov, značilnih za ostale Th podvrste celic, t.j. GATA3, FoxP3 ali T-bet ali IL-2R in IL-12R $\beta$ <sub>1</sub> (slika 15). Zanimivo je, da tako NO kot Th17-polarizirajoči citokini inducira endogeno NOS2 v CD4<sup>+</sup> celicah (slika 16), pri čemer se je za indukcijo NOS2 izkazala optimalna kombinacija vseh Th17 citokinov (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23). Hkrati je izražanje NOS2, ne pa tudi NOS1 ali NOS3, sovpadalo z izražanjem IL-17A v CD4<sup>+</sup> T celicah. (slika 17)

Bistvena vloga NOS2 in NO pri Th17 diferenciaciji se je pokazala tudi ob blokadi NOS v prisotnosti Th17-polarizirajočih citokinov, ki je preprečila izločanje IL-17A in IL-17F ter izražanje ROR $\gamma$ t in IL-23R (slika 18), pri tem pa je dodatek eksogenega NO je ponovno vzpostavil Th17 fenotip. (slika 19).

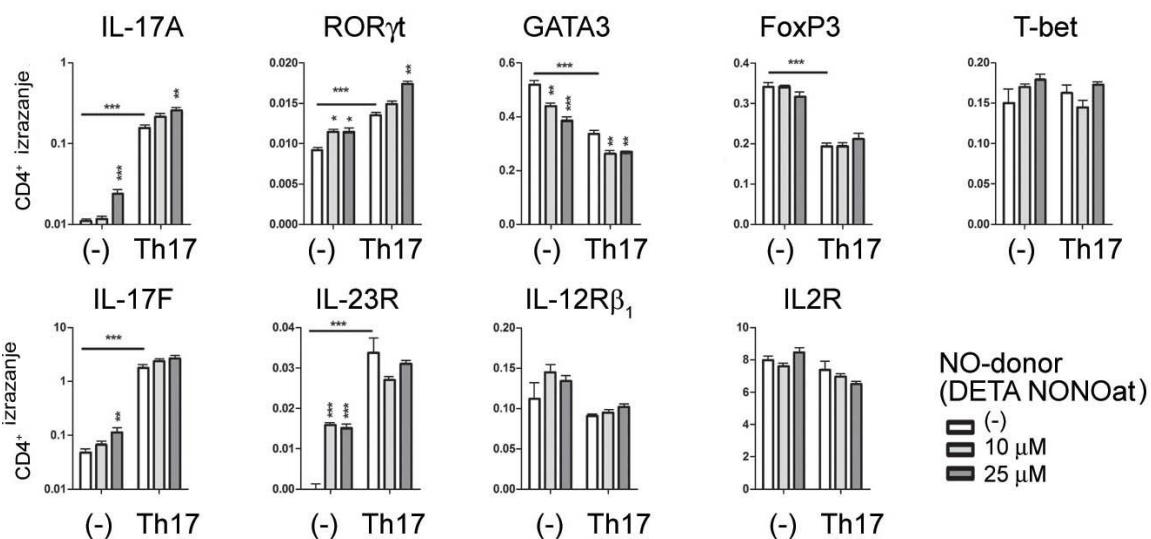
Od vseh Th17-usmerjajočih citokinov se je za najbolj učinkovitega izkazal IL-1 $\beta$ .



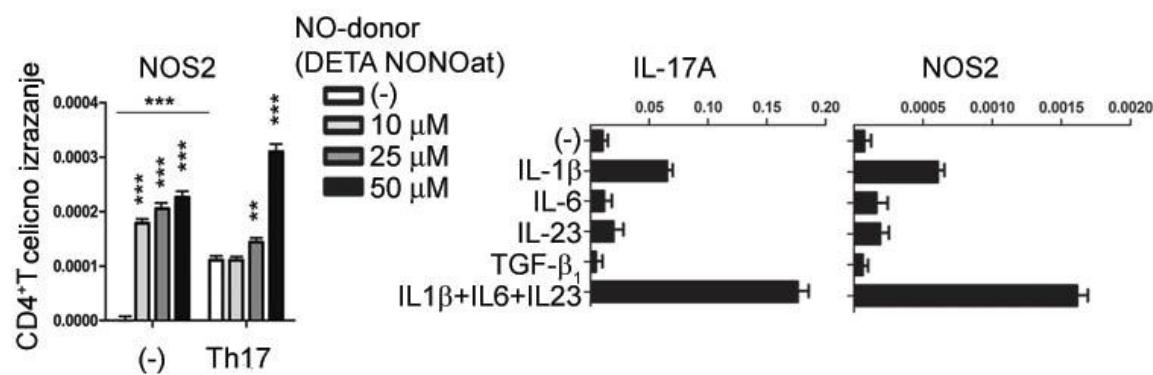
**Slika 13:** Vpliv eksogenega NO (NO-donor/NO iz MDSC) na produkcijo IL-17A v TIL oz. naivnih CD4<sup>+</sup> celicah.



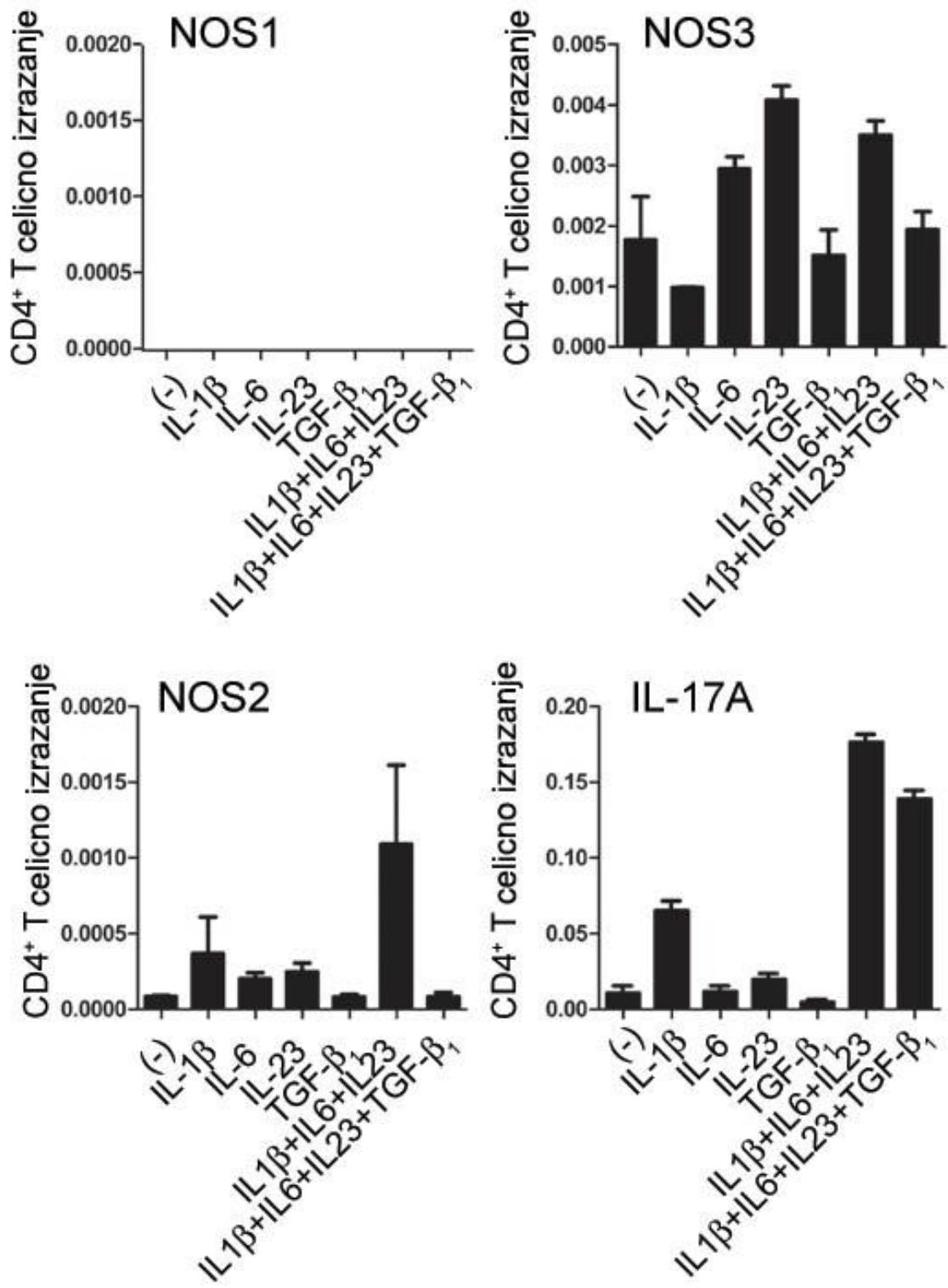
**Slika 14:** Relativno izražanje IL-17A in ROR $\gamma$ t (levo) ter produkcija IL-17A (desno) v CD3/CD28 aktiviranih naivnih in spominskih celicah T v prisotnosti/odsotnosti Th17-usmerjajočih citokinov ter različnih koncentracij eksogenega NO.



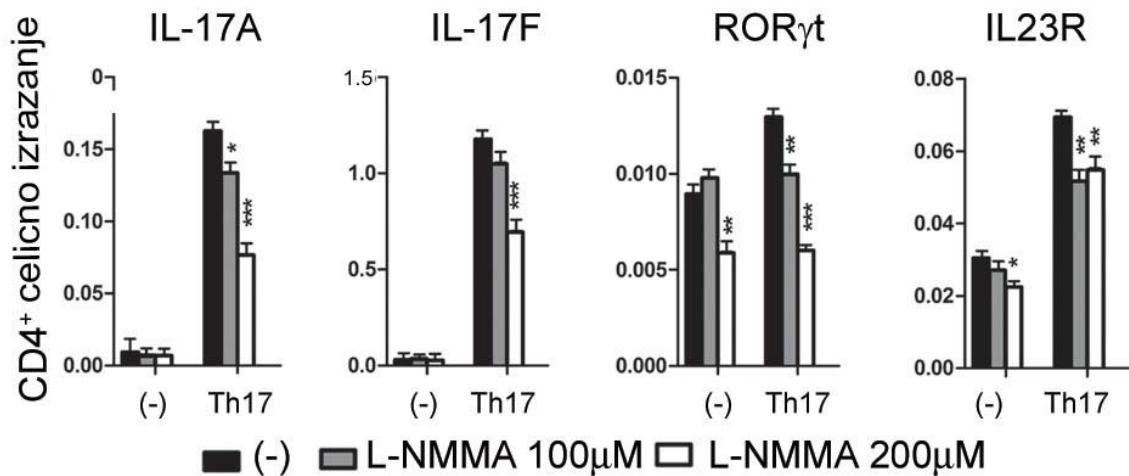
**Slika 15:** Relativno izražanje transkripcijskih dejavnikov ROR $\gamma$ t, GATA3, FoxP3, T-bet in citokinov IL-17A, IL-17F ter receptorjev IL-23R, IL-12R $\beta$ <sub>1</sub> in IL2R v CD3/CD28 aktiviranih naivnih CD4 $^{+}$  celicah T v prisotnosti/odsotnosti Th17-usmerjajočih citokinov ter različnih koncentracij eksogenega NO.



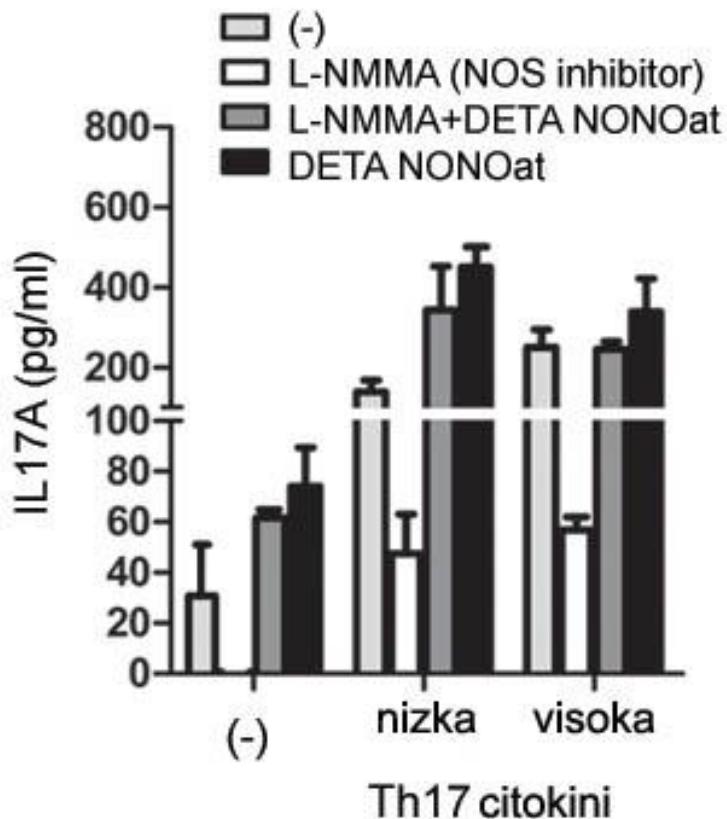
**Slika 16:** Relativno izražanje NOS2 in IL-17 v CD3/CD28 aktiviranih naivnih celicah CD4 $^{+}$  v odsotnosti/prisotnosti posameznih/kombinacije Th17-usmerjajočih citokinov in različnih koncentracij eksogenega NO



**Slika 17:** Relativno izražanje NOS1 (pod mejo detekcije), NOS2, NOS3 in IL-17A v CD4<sup>+</sup> celicah T v prisotnosti IL-1β, IL-6, IL-23 in TGF-β<sub>1</sub> ter kombinacijah teh citokinov.



**Slika 18:** Relativno izražanje IL-17A, IL-17F, ROR $\gamma$ t in IL-23R v CD3/CD28 aktiviranih spominskih CD4 $^{+}$  celicah T v odsotnosti/prisotnosti Th17-usmerjajočih dejavnikov in inhibitorjev



**Slika 19:** Producija IL-17A v CD3/CD28 stimuliranih naivnih CD4 $^{+}$  celicami T v odsotnosti/prisotnosti Th17-usmerjajočih citokinov, NOS inhibitorja/NO donorja in kombinaciji le-teh.

## 5. RAZPRAVA

Kronično vnetje je povezano s številnimi boleznimi, pojavlja se pri avtoimunskih boleznih, alergijah, astmi, bakterijskih okužbah, pa tudi pri raku. Pri raku se z imunskega vidika odvija boj med širjenjem ter rastjo tumorskega tkiva in poskusom eliminacije teh telesu antigensko tujih celic. Normalno tumorski antigeni spodbudijo imunski odziv, ki tumorske celice odstrani – citotoksični limfociti T oz. CTL te celice skupaj s celicami naravnimi ubijalkami NK (angl. natural killer) in makrofagi odstranijo iz telesa. Ko rast tumorskih celic in izogibanje eliminaciji s CTL prevlada, tumor raste, potekajo različni procesi, kot sta angiogeneza in metastaziranje. [120] Tumorske celice z izločanjem različnih dejavnikov v svoje mikrookolje spodbujajo to dejavnost: onemogočijo pravilen imunski odziv in omogočijo svojo rast in širitev v druga tkiva. Pri tem najbolj vplivajo na najpomembnejši vrsti celic imunskega sistema v boju proti celicam s tujim antigenom – na limfocite T in APC (dendritične celice oz. DC). Pri ustreznem imunskem odgovoru, limfociti Th z izločanjem citokinov podpirajo funkcijo NK celic Tc – uničenje celic s tumorskim antigenom (celični odziv) in makrofagov, vendar tumorsko okolje tak imunski odgovor na različne načine prepreči.

Nekateri od teh mehanizmov zaviranja imunskega odgovora je že pojasnjenih:

- Napake v predstavljanju antigena; tumorske celice svojega antiga ne predstavijo vedno, zmanjšano pa je tudi njihovo izražanje molekul PHK I. Celice imunskega sistema tako manj učinkovito prepoznavajo tumorske celice in posledično tudi njihova odstranitev iz gostitelja poteka manj učinkovito. [121]
- Izražanje imunosupresivnih dejavnikov; npr. PGE<sub>2</sub>, TGF-β, IL-10 in CCL22. TGF-β preprečuje razmnoževanje limfocitov B in T ter celic NK, omejuje aktivnost makrofagov in pospešuje angiogenezo. IL-10 je izrazito protivneten citokin in ima učinek predvsem na funkcije limfocitov T: preprečuje izdelovanje nekaterih provnetnih citokinov, preprečuje pa tudi sintezo ROS in NO v makrofagih. CCL22 je kemokin, ki je odgovoren za zbiranje imunosupresivnih Treg. [122]
- Povzročitev periferne tolerance; ta se doseže preko več različnih dogodkov. Najprej se sproži T-celična anergija, ko za aktivacijo limfocitov T manjka

signal kostimulatornih molekul, ki so sicer prisotne na zrelih APC, tumorsko okolje pa povzroči, da le-te ne dozorijo in niso sposobne opravljati svoje funkcije. [123] Tu imajo pomembno vlogo imunosupresivni citokini in Treg, mehanizmi pa še niso popolnoma pojasnjeni.

- K periferni toleranci prispeva tudi zmanjšanje števila limfocitov T; po konstantnem antigenskem draženju limfocitov T se sproži apoptoza. [124, 125] Zelo pomemben dejavnik pri tem pa je tudi aktivnost encima COX2 in njegov produkt PGE<sub>2</sub>. Encim se namreč na tumorskih celicah prekomerno izraža [126-128], med učinki PGE<sub>2</sub> pa so povečana proliferacija tumorskih celic, angiogeneza in odpornost na apoptozo, hkrati pa zmanjšana gostiteljeva imunska odpornost.
- Preusmeritev mieloidne celične vrste v MDSC, namesto v zrele makrofage, granulocite in DC. Kot že omenjeno v uvodu, MDSC preko več različnih mehanizmov zavrejo imunski odziv, onemogočijo aktivnost limfocitov T, pokazalo pa se je tudi, da izločajo več različnih dejavnikov, ki vplivajo na T celično vrsto, med njimi tudi na limfocite Th17, kar je bila osrednja tema diplomske naloge.

Th17 celice so udeležene pri imunskega odgovora pri rakavih obolenjih, pa tudi pri drugih boleznih, npr. avtoimunih boleznih, alergijah ter pri transplantacijah organov in kostnega mozga. Normalno so udeležene pri obrambi pred zunajceličnimi bakterijami in glivami, predstavljajo približno 1% CD4<sup>+</sup> celic, pri raku in avtoimunih boleznih pa lahko v patološkem mikrookolju njihovo število skupaj s IL-17<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Tc17) drastično naraste. Tarča IL-17 so stromalne in endotelijske celice, ter podvrsta monocitov, ki nato začnejo izločati provnetne dejavnike, ki aktivirajo nevtrofilce in nasploh uravnavajo potek akutne okužbe. [21] Th17 celice poleg IL-17 izločajo tudi IL-17F, IL-21 in IL-22, tudi ti citokini sodelujejo pri vnetju. [129]

Th17 celice imajo dvojno vlogo pri napredovanju tumorja in sicer bodisi spodbujajo ali zavirajo rast tumorja preko spodbujanja vnetnega procesa, ki je v procesu nastanka raka lahko pozitiven dejavnik, lahko pa tudi negativen. Vnetje je velikokrat odgovorno za nastanek in napredok raka [1, 2], hkrati pa spodbudi aktivnost določenih celic imunskega sistema, da opravijo svojo nalogo in eliminirajo spremenjene celice. Pri kroničnem vnetju pa se sprožijo mehanizmi, ki zavrejo imunski odgovor in tako preprečijo prekomerno

dejavnost vnetnih dejavnikov, ki bi poškodovali zdravo tkivo. Težava nastane pri rakavih obolenjih, ko tumorske celice izločajo imunosupresivne dejavnike in onemogočijo učinkovit T celični odgovor, s tem pa omogočijo rast in napredovanje tumorja.

Med zelo pomembnimi dejavniki, povezanimi z napredkom raka, sta encim COX2 in njegov produkt PGE<sub>2</sub>. Znano je, da tumorske celice na svoji površini izražajo visoke nivoje COX2 [126-128], posledično se v njihovem mikrookolju vzpostavi visoka koncentracija PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> ima pri akutnem vnetju tako provnetne, kot tudi protivnetne lastnosti, med pomembnimi lastnostmi je ta, da zavira citolitično aktivnost celic naravnih ubijalk NK (natural killer, angl.) in njihovo izločanje IFN- $\gamma$ , kar posledično pripomore k zaviranju Th1 in Tc celičnega odziva. [102].

Hkrati je PGE<sub>2</sub> znan induktor imunosupresornih celic MDSC. [70-72] Te so prisotne v ascitesni tekočini med tumor infiltrirajočimi limfociti oz. TIL pri več vrst raka in pomembno prispevajo k angiogenezi, metastaziranju in k širjenju tumorskih celic. [81, 86, 130, 131] MDSC izločajo PGE<sub>2</sub>, ki je povezan z diferenciacijo celic Th17. Signali za indukcijo Th17 se očitno na več nivojih spodbujajo med seboj preko pozitivnih povratnih zank: PGE<sub>2</sub> namreč deluje tako direktno na Th17 celice kot posredno preko makrofagov in DC, ki izločajo IL-23 in IL-1 $\beta$ , ki povzročijo diferenciacijo Th17. [45, 132, 133]

PGE<sub>2</sub> se je izkazal kot ključen dejavnik, ki je vpletен v več pozitivnih povratnih zank, odgovornih za nastanek Th17celic. Deluje direktno na CD4 $^{+}$  celice, pa tudi preko modulacije MDSC, ki pod vplivom PGE<sub>2</sub> začnejo izločati Th17 usmerjajoče citokine. Pod njihovim vplivom se fenotip CD4 $^{+}$  celic, prisotnih v okolini MDSC v ascitesni tekočini, usmeri v Th17 fenotip. Vpliv MDSC na Th17 diferenciacijo pa je očitno specifičen, saj njihova prisotnost nima vpliva na izražanje IFN- $\gamma$  in transkripcijskega dejavnika FoxP3.

K nastanku Th17 fenotipa pripomore tudi izločanje IL-23 iz MDSC, za katero je bila potrebna predhodna stimulacija MDSC z CD40L, nastanek IL-23 pa je še bolj spodbudil dodatek IL-6 iz okolja. Stimulacija s CD40L ligandom je simulirala stik MDSC s CD4 $^{+}$  celicami iz okolja, kar je očitno še dodaten spodbujajoč dejavnik k sintezi Th17 usmerjajočih dejavnikov in Th17 diferenciaciji.

V tumorskem okolju prisotne MDSC izražajo visoke nivoje COX2 in izločajo večje količine PGE<sub>2</sub>. Ta pa ne deluje samo na CD4 $^{+}$  celice, preko pozitivne povratne zanke

deluje tudi na same MDSC in spodbudi nadaljnje izločanje PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> lahko v prisotnosti IL-1β (ki je znan induktor MDSC) izločajo tudi normalno prisotne CD11b<sup>+</sup> celice v krvi.

MDSC torej izločajo PGE<sub>2</sub>, izločajo pa tudi IL-1β, IL-6 ter TGF-β. Izločanje TGF-β je neodvisno od PGE<sub>2</sub>, saj se proizvodnja tega citokina ne zmanjša ob inhibiciji COX2 s celekoksibom in je njegova sinteza očitno nadzorovana preko drugih dejavnikov. Zgoraj omenjeni citokini skupaj s PGE<sub>2</sub> delujejo na CD4<sup>+</sup> celice in povzročijo njihovo diferenciacijo v Th17 celice. K temu pripomorejo tudi CD4<sup>+</sup> celice same z izločanjem endogenih dejavnikov, ki spodbujajo Th17 diferenciacijo. IL-1β povzroči izločanje IL-6 iz CD4<sup>+</sup> celic, oba dejavnika, IL-1β in IL-6, pa inducirata izražanje COX2 na CD4<sup>+</sup> celicah, pri čemer endogeni PGE<sub>2</sub> inducira izražanje NOS2 na CD4<sup>+</sup> celicah ter še dodatno pripomore k Th17 diferenciaciji.

IL-1β iz tumorskega okolja pa ne vpliva samo na izražanje COX2 na MDSC, ampak skupaj s PGE<sub>2</sub> tudi na izražanje NOS2 na MDSC. NO je pomemben dejavnik pri nastanku Th17 celic. Če inhibiramo NOS2, se z IL-1β in IL-6 sprožena Th17 diferenciacija onemogoči. Za izločanje NO je bistven PGE<sub>2</sub>, saj če njegovo sintezo inhibiramo s celekoksibom, se ustavi izražanje NOS2, s tem pa tudi sinteza NO, posledično ni Th17 diferenciacije. Vpliv NO na CD4<sup>+</sup> celice ima enak učinek v prisotnosti oz. odsotnosti eksogenih Th17 usmerjajočih citokinov, kar nakazuje na njegovo sposobnost, da neposredno vpliva na pojav Th17 fenotipa, brez pogoja prisotnosti MDSC (in PGE<sub>2</sub>).

Končni produkt vseh teh povratnih zank so Th17 celice, ki sprožajo provnetne citokine in na prvi pogled prispevajo k vnetnemu stanju v tumorskem okolju. S tega zornega kota so Th17 celice udeležene v začaranem krogu vnetja ter tumorskega napredovanja. Nepojasnjeno ostaja ali nastanejo kot poskus obrambe pred rakavimi celicami in spodbujajo zavrnitev raka [19, 134, 135], ali pa njihova prisotnost nadalje pripomore k napredovanju tumorja. [136-138] Prav tako ostaja pod vprašajem, kako se vloga Th17 celic spreminja tekom razvoja tumorja, če sploh se spreminja. Poleg Th17 celic imata pomembno vlogo tudi z njimi povezana citokina IL-17 in IL-23, ki vplivata na ostale celice v tumorskem okolju. Hkrati imajo Th17 celice v tumorjih polifunkcionalen citokinski profil, na katerega bistveno vpliva izvor (sprožen s karcinogeni ali s patogeni) ter stadij tumorja, splošno vnetno stanje ter imunska kompetenca pacienta. V tumorju prisotne Th17 celice očitno niso običajne efektorske celice, saj izražajo zelo malo HLA-dr, CD25 in grancima B. [19]

Celice Th so heterogene in plastične; plastičnost pa je še posebej značilna za vrsto Th17. Možen scenarij za nastanek imunsko zavirajočega okolja je tudi ta, da Th17 celice v tumorskem okolju preidejo v imunosupresivne Treg, ki zavirajo imunske odgovore. Nasploh je prehod Treg/Th17 še precej nejasen: nejasno je, kateri dejavniki v tumorskem okolju vplivajo na preobrazbo, pri tem je možna tudi interferenca dejavnikov iz okolja s transkripcijskimi dejavniki. Na ta prehod imata mogoče vpliv tudi dejavnika PGE<sub>2</sub> in NO, ki se v tumorskem okolju nahajata v obilici.

Na tem področju je bilo narejenih že precej raziskav, vendar so bile večinoma izvedene na mišjih celicah, ki pa se od človeških celic razlikujejo – če pogledamo samo vpliv TGF-β na Th17 celice, je razlika precejšna.

Ko se bo pokazal pravi pomen nastanka Th17 celic pri rakavih boleznih in tudi vsi dejavniki, ki so pri tem vpleteni, se bo pokazala tudi zanimiva tarča za terapijo tumorjev, pa tudi drugih kroničnih obolenj. Kot »krivec« za začarani krog vnetja in hkratne imunske supresije se kot najbolj potencialen dejavnik kaže PGE<sub>2</sub>. Z zaviranjem njegove sinteze z inhibitorji COX2 oz. antagonisti EP2/4 bi mogoče lahko dosegli ponoven funkcionalen imunski odgovor z ustreznim citokinskim okoljem in zavrlji škodljivo vnetje.

## 6. SKLEP

Medtem ko je za nastanek MDSC in njihovo funkcijo odgovoren tudi PGE<sub>2</sub>, ki se nahaja v tumorskem okolju v višjih koncentracijah, sta dejavnika PGE<sub>2</sub> in NO, ki jih sintetizirata encima COX2 in NOS2 v človeških rakavih MDSC (v nadaljevanju MDSC), odgovorna za nastanek in razmnoževanje Th17 celic v tumorskem okolju.

Ugotovili smo, da PGE<sub>2</sub> iz MDSC avtokrino nadzira proizvodnjo Th17 polarizirajočih citokinov: IL-1 $\beta$ , IL-6, po dodatni stimulaciji s CD40L pa tudi IL-23. Poleg tega MDSC izločajo tudi TGF- $\beta$ , ki je Treg polarizirajoči citokin. MDSC pa izločajo tudi NO, ki je direkten sprožitelj Th17 diferenciacije. NOS2/NO uravnava PGE<sub>2</sub>, saj je inhibicija sinteze COX2, zavrla NOS2 in nastajanje NO. Inhibicija NOS2 je nadalje onemogočila z MDSC povzročeno Th17 diferenciacijo. Preko COX2/PGE<sub>2</sub> regulirani Th17 polarizirajoči faktorji iz MDSC inducirajo CD4 $^{+}$  celično endogeno COX2/PGE<sub>2</sub> povratno zanko, ki ohranja Th17 fenotip. PGE<sub>2</sub>, ki deluje na CD4 $^{+}$  celice, deluje nanje preko EP2 in EP4 prostaglandinskih receptorjev.

Zaključimo lahko z ugotovitvijo, da se v tumorju vzpostavi več povratnih zank, ki usmerjajo CD4 $^{+}$  celice v Th17 fenotip. Z uporabo inhibitorjev COX2 (npr. celekoksib) prekinemo te zanke in onemogočimo nastanek Th17 celic. Ker pa vloga Th17 celic na tumorskem mestu še ni razložena – rezultati raziskav so si namreč nasprotujoči – je težko zaključiti, da bi bila preprečitev nastanka Th17 celic pozitivna za pacientovo ozdravitev. Th17 celice so namreč heterogena skupina z nekaj skupnimi značilnostmi, kot so izločanje posameznih skupnih citokinov in izražanje transkripcijskih dejavnikov, hkrati pa so funkcionalno različne celice. Th17 celice so tudi plastične, saj se lahko ob ustreznom okolju pretvorijo v drug T celični podtip, in sicer je zlasti pomemben njihov prehod v Treg.

Z našim delom smo ugotovili pomen posameznih tumorskih dejavnikov ter njihov mehanizem indukcije Th17 celic pri raku ter pokazali, da sta PGE<sub>2</sub> in NO pomembni potencialni terapevtski tarči pri zdravljenju obolenj, pri katerih igrajo pomembno vlogo Th17 celice.

## 7. LITERATURA

1. Coussens L M, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860-7.
2. Mantovani A et al.: Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 436-44.
3. Dunn GP, Old L J, Schreiber R D: The immunobiology of cancer immuno surveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21(2): 137-48.
4. Koebel C M et al.: Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007; 450(7171): 903-7.
5. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS d.d., Ljubljana, 2000, str. 7,-8, 14-15, 17, 30, 37-38, 84, 177, 191, 249, 251, 254, 510.
6. Mosmann T R, Coffman R L, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989. 7: 145-73.
7. Annunziato F et al.: Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204(8): 1849-61.
8. Dardalhon V et al.: IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008; 9(12): 1347-55.
9. Sundstedt A et al.: Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 1997; 158(1): 180-6.
10. Latchman D S: Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12): 1305-12.
11. Acosta-Rodriguez E V et al.: Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; 8(9): 942-9.
12. Chen W et al.: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198(12): 1875-86.
13. Chen Z, Laurence A, O'Shea J J: Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007; 19(6): 400-8.
14. Manel N, Unutmaz D, Littman D R: The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 2008; 9(6): 641-9.
15. Cosmi L et al.: Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008; 205(8): 1903-16.
16. Kanangat S et al.: Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol* 1996; 26(1): 161-5.
17. Jing H, Vassiliou E, Ganea D: Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74(5): 868-79.
18. Veldhoen M et al.: TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2): 179-89.
19. Kryczek I et al.: Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114(6): 1141-9.
20. Kryczek I et al.: Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol* 2008; 181(7): 4733-41.
21. Kastelein R A, Hunter C A, Cua D J: Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 221-42.
22. Langrish C L et al.: IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004; 202: 96-105.
23. McKenzie B S, Kastelein R A, Cua D J: Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006; 27(1): 17-23.

24. Waibler Z et al.: TLR-ligand stimulated interleukin-23 subunit expression and assembly is regulated differentially in murine plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Mol Immunol* 2007; 44(7): 1483-9.
25. Reis e Sousa C: Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(1): 21-5.
26. Vozelj, M.: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS d.d., 2000, Ljubljana, str. 37, 142
27. Kawai T, Akira S: Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 1-20.
28. Sender L Y et al.: CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals. *Mol Immunol* 2010; 47(6): 1255-61.
29. Oppmann B et al.: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13(5): 715-25.
30. Langowski J L et al.: IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442(7101): 461-5.
31. Vozelj, M., Temelji imunologije
32. Bogdan C.: Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2(10): 907-16.
33. Nathan C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992. 6(12): 3051-64.
34. Bogdan C: The function of nitric oxide in the immune system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, 2000, Heidelberg, str. 443–492
35. Hooper D C et al.: Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(6): 2528-33.
36. Boughton-Smith N K et al.: Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993; 342(8867): 338-40.
37. Niedbala W et al.: Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(22): 9220-5.
38. Kwak J Y et al.: Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell Immunol* 2000; 203(2): 84-94.
39. Mazzoni A et al.: Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 168(2): 689-95.
40. Zheng Y et al.: Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445(7128): 648-51.
41. McGeachy M J et al.: TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007; 8(12): 1390-7.
42. Gronski M A et al.: TCR affinity and negative regulation limit autoimmunity. *Nat Med* 2004; 10(11): 1234-9.
43. Purvis H A et al. Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* 2010; 116(23): 4829-37.
44. Yao C et al.: Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 2009; 15(6): 633-40.
45. Khayrullina T et al.: In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J Immunol* 2008; 181(1): 721-35.
46. Zhou L, Chong M M, Littman D R: Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; 30(5): 646-55.

47. Murphy E et al.: Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 1996; 183(3): 901-13.
48. Szabo S J et al.: Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997; 185(5): 817-24.
49. Djuretic I M et al.: Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007; 8(2): 145-53.
50. Naoe Y et al.: Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf beta binding to the Il4 silencer. *J Exp Med* 2007; 204(8): 1749-55.
51. Harrington L E et al.: Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11): 1123-32.
52. Ivanov I et al.: The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126(6): 1121-33.
53. Weaver C T et al.: IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 821-52.
54. Atarashi K et al.: ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2008; 455(7214): 808-12.
55. Hall J A. et al.: Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 2008; 29(4): 637-49.
56. Mucida D et al.: Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317(5835): 256-60.
57. Coombes J L et al.: A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204(8): 1757-64.
58. Sun C M et al.: Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204(8): 1775-85.
59. Benson M J et al.: All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007; 204(8): 1765-74.
60. Brustle A et al.: The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007; 8(9): 958-66.
61. Zhang F, Meng G, Strober W: Interactions among the transcription factors Runx1, ROR $\gamma$ T and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2008; 9(11): 1297-306.
62. Ono M et al.: Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 2007; 446(7136): 685-9.
63. Chen Z et al.: Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(21): 8137-42.
64. Lund J M et al.: Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 2008; 320(5880): 1220-4.
65. Youn J I et al.: Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008; 181(8): 5791-802.
66. Ochoa A C et al.: Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(2 Pt 2): 721s-726s.
67. Almand B et al.: Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166(1): 678-89.
68. Sinha P et al.: Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 2007; 179(2): 977-83.
69. Murdoch C et al.: The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(8): 618-31.

70. Pan P Y et al.: Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 2008; 111(1): 219-28.
71. Sinha P et al.: Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007; 67(9): 4507-13.
72. Serafini P et al.: High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; 64(17): 6337-43.
73. Bunt S K et al.: Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* 2007; 67(20): 10019-26.
74. Gabrilovich D et al.: Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vivo*. *Blood* 1998; 92(11): 4150-66.
75. Nefedova Y et al.: Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9525-35.
76. Gabrilovich D I, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(3): 162-74.
77. Toh B et al.: Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol* 2011; 9(9): e1001162.
78. Bronte V, Zanovello P: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 641-54.
79. Rodriguez P C, Ochoa A C: Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 2008; 222: 180-91.
80. Rodriguez P C et al.: Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 2005; 202(7): 931-9.
81. Yang L et al.: Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13(1): 23-35.
82. Li H et al.: Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009; 182(1): 240-9.
83. Srivastava M K et al.: Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* 2010; 70(1): 68-77.
84. Hanson E M et al.: Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2009; 183(2): 937-44.
85. Nagaraj S et al.: Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007; 13(7): 828-35.
86. Priceman S J et al.: Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 2010; 115(7): 1461-71.
87. Movahedi K et al.: Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008; 111(8): 4233-44.
88. Dolcetti L et al.: Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 2010; 40(1): 22-35.
89. Nausch N et al.: Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood* 2008; 112(10): 4080-9.

90. Youn J I, Gabrilovich D I: The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 2010; 40(11): 2969-75.
91. Bingisser R M et al.: Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 1998; 160(12): 5729-34.
92. Harari O, Liao J K: Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des* 2004; 10(8): 893-8.
93. Rivoltini L et al.: Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 2002; 188: 97-113.
94. Mellor A L et al.: Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 2002; 168(8): 3771-6.
95. Frumento G et al.: Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002; 196(4): 459-68.
96. Phipps R P, Stein S H, Roper R L: A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991; 12(10): 349-52.
97. Goodwin J S, Ceuppens J: Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol*, 1983; 3(4): 295-315.
98. Hata A N, Breyer R M: Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004; 103(2): 147-66.
99. Tai H H et al.: Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 483-93.
100. Yu Y, Chadee K: Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 1998; 161(7): 3746-52.
101. Weller C L et al.: Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(28): 11712-7.
102. Mailliard R B et al.: IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* 2005; 202(7): 941-53.
103. Smith R J: Modulation of phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils: effect of nonsteroid anti-inflammatory agents and prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 200(3): 647-57.
104. Aronoff D M, Canetti C, Peters-Golden M: Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 2004; 173(1): 559-65.
105. Serezani C H et al.: Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(5): 562-70.
6. Goodwin J S, Bankhurst A D, Messner R P: Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. *J Exp Med* 1977; 146(6): 1719-34.
107. Minakuchi R et al.: Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE2. *J Immunol* 1990; 145(8): 2616-25.
108. Snijdewint F G et al: Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150(12): 5321-9.
109. van der Pouw Kraan T C et al.: Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181(2): 775-9.
110. Walker C et al.: Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J Immunol* 1983; 130(4): 1770-3.
111. Rincon M et al.: Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur J Immunol* 1988; 18(11): 1791-6.

112. Vozelj, M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS d.d., Ljubljana, 2000, str. 249
113. Snyder D S, Beller D I, Unanue E R: Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature* 1982; 299(5879): 163-5.
114. Muthuswamy R et al.: PGE(2) transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood* 2010; 116(9): 1454-9.
115. Kalinski P et al.: IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 1997; 159(1): 28-35.
116. Nagaraj S, Gabrilovich D I: Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *Cancer J* 2010; 16(4): 348-53.
117. Obermajer N et al.: Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2011; 118(20): 5498-505.
118. Chizzolini C et al.: Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* 2008; 112(9): 3696-703.
119. Boniface K et al.: Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* 2009; 206(3): 535-48.
120. Vozelj, M., Temelji imunologije
121. Hicklin D J, Marincola F M, Ferrone S: HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 1999; 5(4): 178-86.
122. M. Vozelj: Temelji imunologije
123. Staveley-O'Carroll K et al.: Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(3): 1178-83.
124. Igney F H, Krammer P H: Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002; 71(6): 907-20.
125. Russell J H et al.: Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(6): 2151-5.
126. Jabbour H N et al.: Expression of COX-2 and PGE synthase and synthesis of PGE(2) in endometrial adenocarcinoma: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *Br J Cancer* 2001; 85(7): 1023-31.
127. Li W et al.: Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(4): 1673-8.
128. Huang M et al.: Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 1998; 58(6): 1208-16.
129. Dong C: TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(5): 337-48.
130. Yang L et al.: Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; 6(4): 409-21.
131. Shojaei F et al.: Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25(8): 911-20.
132. Sheibanie A F et al.: Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(8): 2608-19.
133. Sheibanie A F et al.: The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *J Immunol* 2007; 178(12): 8138-47.
134. Oniki S et al.: Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenic melanoma. *Cancer Res* 2006; 66(12): 6395-404.
135. Sfanos K S et al.: Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008; 14(11): 3254-61.

136. Zhang J P et al.: Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 50(5): 980-9.
137. Chen X et al.: Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2010; 69(3): 348-54.
138. Wang L et al.: IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 2009; 206(7): 1457-64.