

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ LUZAR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ LUZAR

POMEN ADHEZIJE DENDRITIČNIH CELIC ZA USPEŠNO
AKTIVACIJO CITOTOKSIČNIH CELIC T CD8⁺

THE IMPORTANCE OF DENDRITIC CELLS ADHESION FOR
SUCCESSFUL ACTIVATION OF CYTOTOXIC CD8⁺ T CELLS

Ljubljana, 2012

Diplomsko naloge sem opravljal na Inštitutu Jožef Stefan pod mentorstvom doc. dr. Nataše Obermajer, mag. farm. Eksperimentalno delo sem opravljal v biotehnološkem in celičnem laboratoriju na raziskovalnem odseku Biotehnologija B3. Snemanje celic v živo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nataši Obermajer za priložnost izdelave diplomske naloge. Zahvaljujem se ji za ves trud, vse nasvete in znanja ter za potrpežljivost in vsestransko pomoč.

Ob tej priložnosti bi se rad zahvalil svojemu dekletu Eriki za podporo, razumevanje, spodbudo in zaupanje vame skozi študij.

Zahvala gre tudi mojim starim staršem, ki so me podpirali in mi omogočali kvaliteten študij.

Posebno zahvalo namenjam svojima staršema, ki sta mi tekom celotnega študija stala ob strani in mi nudila vse, kar sem potreboval. Iskrena hvala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naloge samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Nataše Obermajer, mag. farm.

Jernej Luzar

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	- 1 -
POVZETEK	- 4 -
ABSTRACT	- 5 -
OKRAJŠAVE	- 6 -
1 UVOD	- 8 -
1.1 DENDRITIČNE CELICE	- 9 -
1.2 ZAKAJ SO DC TAKO UČINKOVITE APC?	- 10 -
1.3 DC IN PREDSTAVITEV ANTIGENOV	- 10 -
1.4 NEZRELE DC	- 11 -
1.5 ZRELE DC	- 11 -
1.6 T-CELIČNI RECEPTOR	- 13 -
1.7 KOSTIMULACIJSKI SIGNALI DC	- 14 -
1.8 CITOKINI DC	- 15 -
1.9 CITOKINI, KI SO POGLAVITNEGA POMENA ZA FUNKCIJE CELIC T -	15 -
1.9.1 IL-2	- 16 -
1.9.2 IL-4	- 16 -
1.9.3 IL-7	- 16 -
1.9.4 IL-10	- 16 -
1.9.5 IL-12	- 16 -
1.9.6 IFN- γ	- 17 -
1.10 CELICE T CD8 ⁺ IN GRANCIM B	- 17 -
1.11 IMUNSKI ODZIV PRI RAKU	- 18 -
1.11.1 IMUNSKI ODZIV PRI RAKU JAJČNIKOV	- 19 -

1.11.2 VPLIV CITOKINOV IN RASTNIH DEJAVNIKOV NA DELOVANJE LIMFOCITOV PRI RAKU JAJČNIKOV	- 20 -
1.12 VPLIV PGE ₂ NA DIFERENCIACIJO DC IN MDSC	- 22 -
1.13 ADHEZIJA IN MIGRACIJA DC.....	- 23 -
1.14 BLEBBISTATIN	- 25 -
2 HIPOTEZA IN NAMEN DELA	- 26 -
3 MATERIALI IN METODE DELA.....	- 27 -
3.1 MATERIALI.....	- 27 -
3.1.1 REAGENTI.....	- 27 -
3.1.2 PROTITELESA	- 28 -
3.1.3 GOJIŠČA	- 29 -
3.1.4 KOMPLETI.....	- 29 -
3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA.....	- 30 -
3.2 METODE DELA	- 31 -
3.2.1 PRIDOBIVANJE DC.....	- 31 -
3.2.2 IZOLACIJA MONOCITOV IN CELIC T CD8 ⁺ IZ ASCITESA BOLNIC Z RAKOM JAJČNIKOV	- 33 -
3.2.3 IZOLACIJA NAIVNIH CELIC T CD4 ⁺ IN CD8 ⁺ PERIFERNE KRVI IN <i>IN VITRO</i> PRIDOBIVANJE EFEKTORSKIH CELIC	- 34 -
3.2.4 PRETOČNA CITOMETRIJA	- 35 -
3.2.5 ELISA	- 36 -
3.2.6 IMUNOFLUORESCENČNA KONFOKALNA MIKROSKOPIJA	- 39 -
3.2.7 SNEMANJE CELIC V ŽIVO	- 40 -
3.2.8 STATISTIČNA ANALIZA	- 40 -
4 REZULTATI	- 41 -
4.1 IL-12 povrne citolitično funkcijo celic T CD8 ⁺ , ki jo zavre PGE ₂ prisoten v mikrookolju raka jajčnikov	- 41 -

4.2 Nastajanje IL-12 v DC, ki so zorene z INF- γ , je odvisna od pritrjevanja DC preko integrina β_2	- 43 -
4.3 Adhezija $^{IFN-\gamma}DC$ ne vpliva na aktivacijo Stat-1 in Stat-3, temveč spremeni zmožnost aktivacije NF- κ B	- 48 -
4.4 Producijo IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$ uravnava miozin II	- 48 -
4.5 Inhibicija miozina II tekom razvoja DC omogoči stabilno povečano produkcijo IL-12 IFN- γ DC (pri nadaljni stimulaciji s CD40L)	- 51 -
4.6 Stabilna produkcija velikih količin IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$, ki jo povzroči inhibicija miozina II, sproži učinkovite T_H1 odzive in stimulira funkcije citotoksičnih limfocitov T.....	- 53 -
4.7 Stimulacijski potencial $^{IFN-\gamma}DC$ pridobljenih iz monocitov, izoliranih iz mikrookolja raka jajčnikov	- 54 -
4.8 Terapevtski potencial $^{IFN-\gamma}DC$: povečana citotoksična funkcija celic T CD8+ izoliranih iz mikrookolja raka jajčnikov	- 56 -
5 RAZPRAVA.....	- 57 -
6 SKLEP	- 61 -
7 LITERATURA	- 62 -

POVZETEK

Dendritične celice (DC) so antigen predstavitevne celice in so ključnega pomena za uravnavanje T celičnega imunskega odziva, in sicer tudi pri aktivaciji citotoksičnih celic T CD8⁺. Celice T CD8⁺ uničujejo tumorske celice preko grancima B. Zmožnost DC, da sprožijo učinkovit T celični imunski odziv, je odvisna od njihovega zorenja, migracije v področja celic T limfnih vozlov in proizvajanja provnetnih citokinov. V primeru rakavih obolenj dodatno vplivajo zaviralni dejavniki tumorskega okolja, ki zavirajo nastanek in stimulatorno dejavnost DC ter nastanek ustreznega imunskega odziva.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na adhezijo DC, in pokazali, da adhezija uravnavava zorenje DC, tj. njihovo produkcijo citokinov. Monociti in nezrele DC se s pomočjo podosomov vežejo na substrat Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) integrinskega receptorja ICAM-1. Pokazali smo, da od miozina II odvisna adhezija/odlepljanje monocitov vpliva na zmožnost DC, da proizvajajo interlevkin-12 (IL-12) v prvih dneh razvoja iz monocitov. Aktomiozinsko signalizacijo tekom diferenciacije DC uravnavata bodisi interakcija njihovih površinskih adhezijskih receptorjev s specifičnimi substrati ali molekule, ki vplivajo na adhezijske strukture, kot je PGE₂, ki je glavni zaviralni dejavnik tumorskega okolja. Od miozina II odvisna β_2 integrinska signalizacija, ki poteka v podosomih, vpliva na sposobnost produkcije velikih količin IL-12 DC. IL-12 je ključen citokin, ki omogoča nastanek učinkovitih citotoksičnih celic T CD8⁺. Dokazali smo, da IFN- γ in PGE₂ izkazujeta nasprotne učinke na proces adhezije in preko podosom- β_2 integrin- miozin II signalizacije uravnavata sposobnost produkcije IL-12 v DC. IFN- γ , ob ustrezni adheziji, inducira produkcijo velikih količin IL-12 DC, medtem ko PGE₂ preko podosomov zavira to sposobnost.

Pomembno je, da IL-12 presega zaviralne učinke PGE₂, kot tudi drugih zaviralkov dejavnikov tumorskega okolja. Tako zagotavlja uspešno aktivacijo celic T CD8⁺ z veliko sposobnostjo citotoksičnosti in s tem ustrezen protitumorski imunski odziv.

DC, ki proizvajajo velike količine IL-12, zaradi omenjene zmožnosti preseganja inhibicije citolitične funkcije celic T CD8⁺, ki jo povzroča tumorsko okolje, kažejo velik potencial v terapevtske namene za povrnitev ustreznega imunskega odziva proti raku.

ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are antigen-presenting cells that play a key role in regulating T cell-based immunity and in particular also in the activation of cytotoxic CD8⁺ T cells. CD8⁺ T cells use granzyme B to kill tumor cells. The capacity of DC to induce functional T cell-based immune response depends on their maturation, migration to the T cell areas of lymph nodes and production of proinflammatory cytokines. In the case of cancer, suppressive factors of tumor environment inhibit formation and stimulation of DC and prevent the formation of appropriate immune response.

In the thesis, we investigated adhesion of DC and showed that adhesion regulates DC maturation, i.e. their cytokine production. Monocytes and immature DC adhere to the Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) intergrin receptor substrate ICAM-1 using the podosomes. We demonstrated that myosin II-dependent adhesion/de-adhesion of monocytes is affecting the ability of DC to produce interleukin-12 (IL-12) during the first days of their development from monocytes. Actomyosin signalization during DC differentiation is regulated by interaction of their surface adhesion receptors with specific substrates or molecules which have impact on adhesion structures, like PGE₂, which is the main suppressive factor of tumor environment. Myosin II-dependent β_2 integrin signalization that takes place in podosomes, is affecting ability of DC to produce high levels of IL-12. IL-12 is a key cytokine, which enables the formation of functional cytotoxic CD8⁺ T cells. We showed that IFN- γ and PGE₂ display opposite effects on adhesion and regulate ability of DC to produce IL-12 through podosome- β_2 integrin- myosin II signalization. IFN- γ , under appropriate adhesion, induces high levels IL-12 production in DC, while PGE₂ inhibit this ability through podosomes.

It is important that IL-12 surpasses the inhibitory effect of PGE₂ and other inhibitory factors of tumor environment and enables activation of CD8⁺ T cells with high cytotoxic capacity and appropriate antitumor immune response.

High levels of IL-12 producing DC surpass inhibition of CD8⁺ T cells cytolitic function from tumor environment and therefore show high potencial for therapeutic purposes, to reestablish the appropriate immune response against cancer.

OKRAJŠAVE

Ag	antigen
APC	antigen predstavitevne celice
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
CCL	kemokinski (C-C motiv) ligand
CCR	kemokinski (C-C motiv) receptor
CD	angl. cluster of differentiation
CFSE	karboksifluorescein diacetat sukcinimidil ester
COX	ciklooksigenaza
CTL	citotoksični limfociti T
DC	dendritične celice
FBS	fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)
GM-CSF	granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik
IDO	indolamin dioksigenaza
IFN	interferon
IL	interlevkin
LPS	lipopolisaharid
M-CSF	makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik
MDSC	mieloidne supresorske celice (angl. myeloid-derived suppressor cells)
NF-κB	jedrni dejavnik- κB (angl. nuclear factor- κB)

NO	dušikov oksid
PBS	fosfatna puferska solna raztopina (angl. phosphate buffered saline)
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. MHC)
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat
PRR	vzorce-prepoznavni receptor (angl. pattern-recognition receptor)
rh	rekombinantni humani
ROCK	angl. Rho-associated, coiled coil containing protein kinase
SEB	stafilokokni enterotoksin B
Stat	angl. signal transducers and activators of transcription
T _C	citotoksične celice T
T _H	celice T pomagalke
T _{reg}	regulatorne celice T
TAM	s tumorjem povezani makrofagi (angl. tumor-associated macrophages)
TCR	T-celični receptor
TGF	transformirajoči rastni dejavnik (angl. transforming growth factor)
TLR	angl. toll-like receptors
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)

1 UVOD

Citotoksični limfociti T (CTL) so najučinkovitejše celice pri obrambi pred tumorskimi celicami (1). Tako se v tumorski imunologiji poraja eno od pomembnejših vprašanj, kako ustvariti učinkovit odziv CTL, ki bo sprožil antigen-specifičen in zaščitni T celični odziv *in vivo*. Dokazano je bilo, da imajo bolniki z rakom spremenjen imunski odziv na tumorske antogene in druge antigene. Te spremembe zadevajo številne elemente imunskega odziva in preprečujejo učinkovito aktivacijo in proliferacijo limfocitov T, specifičnih za tumorske antogene in njihovo prepoznavanje tumorskih celic.

Znano je, da antigen predstavljene celice (APC) igrajo ključno vlogo pri indukciji protitumorskih imunskih odzivov z ustvarjanjem tumor-specifičnih limfocitov T (1). Limfociti T se odzivajo na tuje antogene tako s produkcijo proteinskih efektorskih molekul znanih kot limfokini (citokini, ki jih proizvajajo limfociti), kot tudi z razmnoževanjem. Kompletna aktivacija limfocitov T pa zahteva tri signalne dogodke, enega skozi antigensko-specifični receptor, drugega skozi receptorje za kostimulatorne molekule in tretjega skozi citokine. T-celični receptor (TCR) tumor specifičnih-limfocitov T prepozna s tumorjem povezane peptide, ki jih predstavljajo APC vezane na molekule poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda I (PHK-I) ali razreda II (PHK-II) (tako imenovan 'signal 1'). Uspešno prepoznavanje tumorskih antigenov pa ni odvisno le od interakcije TCR-peptid-PHK, ampak morajo biti zagotovljeni še drugi, t.i. pomožni oziroma kostimulatorni signali, ki preprečujejo T celično anergijo (tako imenovan 'signal 2') (2). To so večinoma interakcije CD80/CD86–CD28 ali CD40–CD40L (3). Te interakcije poudarjajo pomembno vlogo dendritičnih celic (DC), ki so v primerjavi z monociti, makrofagi in celicami B najbolj učinkovite APC.

Fenotipsko in funkcijsko razlikujemo več tipov DC, ki tvorijo različne citokine. S tvorbo različnih citokinov povzročajo DC polarizacijo celic T pomagalk (celic T_H) v celice T pomagalke tipa T_H1, T_H2, T_H9 in T_H17 (tako imenovan 'signal 3'). Signal 3 vodi v razvoj različnih tipov imunosti, zato bistveno vpliva na različno udeležbo posameznih efektorskih mehanizmov in različno sposobnost odstranitve rakavih celic (4, 5).

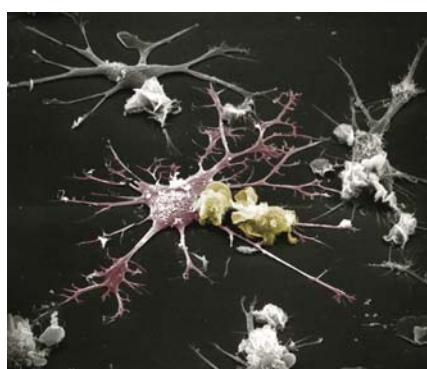
1.1 DENDRITIČNE CELICE

DC so poglavitne APC pri sprožitvi primarnega T-celičnega odziva kot tudi sekundarnega odziva počivajočih spominskih celic T (6).

DC povezujejo prirojeni in pridobljeni imunski odziv in so ključne za sprožitev pridobljenega imunskega odziva. Morfološko so jih opredelili kot celice z dolgimi izrastki. Poznamo dva tipa DC, ki se razlikujeta po lokaciji nahajanja ter imata tudi različne funkcije. Prvi tip se nahaja v intersticiju večine organov (v srcu, pljučih, jetrih, ledvici, prebavilih), veliko jih je v T-limfocitnem področju bezgavk in vranice. Te imenujemo intersticijske DC. Raztresene so tudi po epidermisu kože, kjer jih imenujemo Langerhanske celice. DC izhajajo zelo verjetno iz prednikov v kostnem mozgu (slika 1) in so sorodne mononuklearnim fagocitom. Te celice z dolgimi izrastki so izredno učinkovite pri predstavljanju antigena celicam T CD4⁺. Langerhanske celice ujamejo antogene, ki vstopijo skozi kožo in jih nesejo v krajevne bezgavke, kjer se začne imunski odziv (6).

Drugi tip DC imenujemo celice vrinjenke. Nahajajo se v germinativnih središčih limfatičnih foliklov v bezgavkah, vranici in limfatičnem tkivu sluznic. Te celice ne izhajajo iz prednikov v kostnem mozgu in niso sorodne drugim DC. Folikularne DC so v B-celičnem področju limfatičnih organov. Te celice zajamejo antogene, vezane s protitelesi ali s komponentami komplementa in jih izpostavijo na svoji površini, da jih spoznajo limfociti B (6).

DC, ki krožijo po krvnem in mezgovnem obtoku, imenujemo krožeče DC (6).



Slika 1: Dendritične celice, ki izvirajo iz kostnega mozga (7).

1.2 ZAKAJ SO DC TAKO UČINKOVITE APC?

Nezrele DC imajo več lastnosti, ki jim omogočajo ujeti antigen: 1. DC lahko zajamejo delce in mikrobe s fagocitozo (8-11); 2. lahko tvorijo velike pinocitozne vezikle v katerih je zbrana ekstracelularna tekočina in topljenci- ta proces se imenuje makropinocitoza (12); 3. izražajo receptorje, ki posredujejo adsorptivno endocitozo, vključno s C-tipi lektinskih receptorjev, ki so kot makrofagni manozni receptor (12) in DEC-205, kot tudi Fc γ in Fc ϵ receptorji (13). Makropinocitoza in receptorsko-posredovan privzem antigena naredita tako učinkovito predstavitev antigena, da so zadostne pikomolarne ali nanomolarne koncentracije antigena (12). V primerjavi z drugimi APC, ki potrebujejo mikromolarne koncentracije antigenov.

1.3 DC IN PREDSTAVITEV ANTIGENOV

DC so učinkoviti stimulatorji limfocitov B in T. Celice B, predhodniki celic, ki izločajo protitelesa, lahko direktno prepoznajo prvotne antigene preko svojih B-celičnih receptorjev. T limfociti pa tega ne zmorejo, ampak potrebujejo APC, da jim predelajo in predstavijo antigene. Tako TCR prepozna fragmente antigena, vezane na molekule PHK na površini APC. Zunajcelični antigeni vstopijo v APC z endocitozo, kjer jih te celice nato predelajo in običajno z molekulami PHK-II predstavijo celicam T pomagalkam. Aktivirane celice T pomagalke imajo velik vpliv na regulacijo imunskega odziva. Znotrajcelični antigeni, ki so razrezani na peptide v citosolu APC, se vežejo na molekule PHK-I ter so tako prepoznane s strani CTL. Ko so CTL enkrat aktivirani, lahko direktno ubijejo tarčno celico (4).

Sprožitev T-celične imunosti je precej zahtevna. Na začetku morajo celice T, ki krožijo po krvnem obtoku, najti in prepoznati peptide iz okuženih celic (npr. rakavih celic), ki se lahko nahajajo kjer koli v telesu. Količina specifičnih kompleksov med antigenom tumorjev ali okuženih celic in PHK-om APC je tipično majhna. Te komplekse morajo prepoznati redki kloni celic T preko TCR, ki ima majhno afiniteto. Poleg tega okuženim celicam in tumorjem pogosto primanjkuje kostimularnih molekul, katere poganjajo klonsko ekspanzijo celic T, izločanje citokinov in razvoj v celice ubijalke. DC zagotavljajo možnosti za reševanje teh izzivov. Nahajajo se v večini tkiv, kjer lovijo in predelujejo

antigene ter prikazujejo velike količine kompleksov peptid-PHK na njihovih površinah. Uravnavajo tudi njihove kostimulatorne molekule in potujejo v limfatične organe, vranico in limfne vozle, kjer se povezujejo in aktivirajo antigen-specifične celice T (4).

1.4 NEZRELE DC

V večini tkiv so prisotne nezrele DC. Te celice niso sposobne stimulirati celice T, ker jim manjkajo dodatni signali, ki nastajajo pri interakcijah molekul, kot so CD40, CD54, CD86, z njihovimi ligandi. So pa te celice zelo dobro opremljene za lovljenje antigenov. Antigeni so sposobni inducirati celotno zorenje in mobilizacijo DC (4).

Nezrele DC znotraj tkiv zajamejo ostanke celic, ki so umrle tekom procesa fiziološke obnove tkiva. Ker vnetje ne spremlja tega procesa, ostanejo DC nezrele. Te nezrele DC, katerim manjkajo kostimulatorne molekule, migrirajo v limfne vozle, kjer predstavljajo tkivne antigene celicam T. Celice T, katerim so antigeni predstavljeni brez prisotnosti kostimulatornih molekul, vstopijo v stanje anergije ali pa so izbrisane. Nadalje, v ekstrinzični toleranci, so nezrele DC sposobne povečati število $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{reg} (14) in inducirati Tr1-tip T_{reg} (15).

Znano je, da je zorenje DC ključno za začetek imunosti. Sproženo je lahko z različnimi dejavniki. Ti so lahko mikrobeni ali vnetni produkti. Lahko je to celotna bakterija (16), komponenta mikrobne celične stene imenovana lipopolisaharid (LPS) (12) ali citokini, kot so IL-1, GM-CSF in TNF- α . Vsi ti stimulirajo zorenje DC, medtem ko ga IL-10 blokira (17). Endogeni ceramidi, ki so inducirani z zoritvenimi signali, ali dodani eksogeni ceramidi (npr. C2-ceramid) lahko izključijo lovljenje antigenov z DC (18).

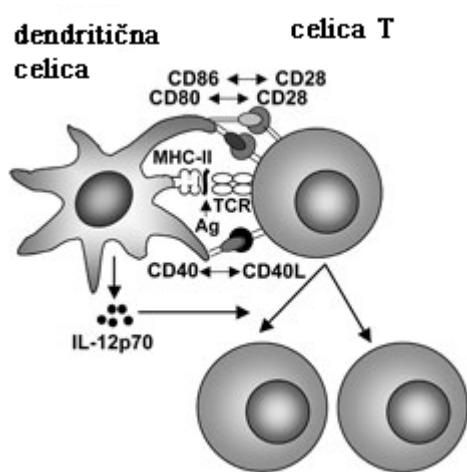
1.5 ZRELE DC

Lastnost DC, da uravnavajo imunski sistem, je odvisna od njihovega zorenja. Od zorenja so odvisne fenotipske in funkcijске značilnosti DC, tj. ali bodo nastale imunostimulatorne DC ter njihov profil citokinov, ki jih bodo izločale. V procesu zorenja gredo DC preko številnih fenotipskih in funkcijskih sprememb. Proses zorenja zajema premik PHK na

površino, povečanje površinskega izražanja kostimulatornih molekul, morfološke spremembe, reorganizacija citoskeleta, izločanje citokinov, kemokinov in proteaz in površinsko izražanje adhezijskih molekul in kemokinskih receptorjev (4).

Zrele DC imajo lastnost zmožnosti aktivacije celic T. Ko so celice T enkrat aktivirane, so zmožne dokončati imunski odziv s tem, da tvorijo interakcije z ostalimi celicami. Te celice so lahko celice B (oblikovanje protiteles), makrofagi (izločanje citokinov) ali tarče za lizo (4).

Ustrezno aktivirane zrele DC sintetizirajo velike količine IL-12. IL-12 spodbuja tako naravni (naravne celice ubijalke) kot tudi pridobljeni (celice T in B) imunski odziv. Prav tako poleg izražanja produktov PHK in kompleksov PHK-peptid, izražajo mnoge dodatne molekule, ki tvorijo interakcije z receptorji na celicah T (19, 20). Te interakcije povečajo adhezijo in kostimulacijo. Primeri teh molekul so CD40, CD54 (ali ICAM-1), CD58 (ali LFA-3), CD80, CD86 (4) (slika 2).



Slika 2: Interakcija DC in celica T. Signal 1 zagotavlja kompleks PHK-II-peptid-TCR, signal 2 kostimulatorne molekule (CD80/86-CD28 ali CD40-CD40L) in signal 3 citokini (IL-12 vodi v $T_{H}1$ imunski odziv).

Zrele DC izražajo velike količine transkripcijskih kontrolnih proteinov družine jedrnih dejavnikov- κ B (NF- κ B) (Rel A/p65, Rel B, Rel C, p50, p52) (21). Ti proteini urejajo izražanje mnogih genov, ki kodirajo imunske in vnetne proteine.

Prepoznavanje patogenov je posredovano s tako imenovanimi vzorce-prepoznavni receptorji (angl. pattern-recognition receptors, PRRs). Ti receptorji prepoznaajo ohranjene molekulske vzorce (s patogenom povezane molekulske vzorce), ki so značilne za več velikih skupin mikroorganizmov. TLR (angl. toll-like receptors) delujejo kot PRR pri sesalcih in igrajo osrednjo vlogo v prepoznavanju mikrobnih komponent. Hkrati TLR

lahko prepoznačajo tudi endogene ligande, ki so inducirani tekom vnetnega odziva (22). Izražanje članov družine TLR se razlikuje med posameznimi imunskimi celicami (23) in se zlasti sproži ob različnih dražljajih. Medtem ko je pri monocitih izraženih nekaj tisoč molekul TLR na celico, je pri nezrelih DC prisotnih nekaj sto ali manj molekul na celico (24). Vnetni citokini, mikrobi ali njihovi produkti (LPS, lipoproteini in CpG DNA), ki so ligandi za TLR, inducirajo zorenje DC (25). Hkrati signaliziranje preko TLR, ki ga sproži LPS ali CpG DNA, sproži indukcijo sproščanja citokinov, kot je IL-12 in s tem poveča sposobnost DC, da podprejo T_{H1} celično diferenciacijo (22). Aktivacija TLR vodi v translokacijo in transaktivacijo NF-κB, kot tudi do dogodkov, kot je aktivacija poti MAP 3-kinaze (26).

Patogen ali antigen lahko sproži indukcijo imunskega odziva, ki zajema aktivacijo DC, tudi preko signalnih transdukcijskih poti družine TNF-R in s TNF-R povezanimi dejavniki. Tudi signaliziranje skozi družino TNF-receptorjev, kot npr. TNF-R (CD120 a/b), CD40 in TRANCE/RANK, se pokaže kot aktivacija NF-κB (4).

Poleg aktivacije DC z mikrobi in z njimi povezanimi produkti, je pomembna aktivacija DC, ki se zgodi ob interakciji s celicami T, saj je komunikacija med DC in celicami T dvosmerna. CD40 in TRANCE/RANK receptor (27, 28) na DC sta povezana s proteini družine TNF, ki so izraženi na aktiviranih in spominskih celicah T. To pa vodi v podaljšano preživetje DC (28, 29) in v primeru CD40 do povečanja količine CD80 in CD86, sekrecije IL-12 in sproščanja kemokinov (IL-8, MIP-1 α in β) (29).

Ob aktivaciji, DC potujejo do limfatičnega tkiva, kot je vranica in limfnii vozli. Tu lahko DC končajo svoje zorenje (30), privabljajo celice B in celice T s sproščanjem citokinov (31) in vzdržujejo sposobnost kroženja limfocitov T (32).

1.6 T-CELIČNI RECEPTOR

TCR je kompleks, sestavljen iz več integralnih proteinov plazemske membrane. Heterodimer $\alpha\beta$ (ali $\gamma\delta$) posreduje specifično vezanje s kompleksom peptid-PHK na površini APC ali celice tarče. α in β sta dve kovalentno (disulfidne vezi) povezani polipeptidni verigi, ki sestavljata prej omenjeni heterodimer. Vsaka veriga ima zunajcelični

del, zasidran v plazemsko membrano, transmembranski peptid in kratek citoplazemski rep. Polipeptidni verigi γ in δ sta po zgradbi in funkciji podobni verigama α in β (6).

Podenote TCR-ja, kot sta npr. CD4 in CD8, ki sodelujejo pri vezavi antigena, so različne pri celicah T z različnimi funkcijami. Zanimivo je, da je večina celičnih površinskih molekul enaka pri celicah T $\alpha\beta$ in celicah T $\gamma\delta$, dve pomembni izjemi sta le CD4 in CD8, ki ju ni na večini celic T $\gamma\delta$. V kompleksu TCR so prisotne tudi druge podenote, kot je npr. CD3, ki so enake pri vseh celicah T. Njihova funkcija je sodelovanje pri prenosu signala v notranjost celice. Tako pošljejo molekule CD3, po vezavi antigena s TCR, signale v citoplazmo, kar privede do funkcijске aktivacije. Celice T pa imajo poleg receptorjev za petide na svoji površini izražene še številne druge proteine, ki jih imenujemo dopolnilne molekule ali koreceptorji. Pomembni so pri aktivaciji in efektorskih funkcijah celic T (6).

Molekuli CD4 in CD8 sta površinski molekuli in se nahajata na različnih podskupinah celic T. CD4 najdemo na celicah T pomagalkah (T_H), CD8 pa na citotoksičnih celicah T (T_C). Obe sta koreceptorja in olajšata interakcijo celic T_H z APC in celic T_C s celicami tarčami. Koreceptorja sta pa zato, ker se med spoznavanjem antigenske komponente združita s komponentami TCR. Ve se tudi, da se CD4 veže z nespremenljivim delom molekule PHK-II in CD8 z nespremenljivim delom molekule PHK-I. Poleg teh dveh molekul pa so prisotne tudi številne druge, predvsem adhezijske molekule (adhezini LFA-1 in LFA-3), molekule CD2, CD28, CD45R in še nekatere druge. Poleg utrjevanja povezave TCR z ligandom, imajo še kostimulacijske lastnosti (6).

1.7 KOSTIMULACIJSKI SIGNALI DC

Kot smo že omenili, so potrebne tri signalne poti za spodbudo diferenciacije in razmnoževanja celic T. Prvi signal nastane ob stimulaciji TCR, drugega sprožijo kostimulatorne molekule, ki se nahajajo na celicah T in tretjega zagotovijo citokini. Kostimulatorne molekule se povežejo z ligandi na APC. Če naivne celice T ne dobijo kostimulacijskih signalov, lahko to privede do dolgo trajajoče imunske anergije ali do smrti celic (6).

Pokazalo se je, da je pomembna kostimulacijska molekula na naivnih celicah T glikoprotein CD28. Ta se veže z B7, ki je ligand na APC. B7 se nahaja v dveh oblikah, in

sicer v B7-1 (znan tudi kot CD80) in B7-2 (znan tudi kot CD86). B7-1 se veže s CD28, B7-2 pa s CTLA-4, ki je stukturno podoben CD28, vendar se za razliko od njega nahaja na aktiviranih in ne na nainvih celicah T. Tako je bilo ugotovljeno, da sta B7-1 in B7-2 najpomembnejši kostimulacijski molekuli izraženi na APC. Tu pa naj še dodam, da DC konstitucijsko izražajo velike koncentracije B7-1 in B7-2 in seveda tudi velike koncentracije molekul PHK-I in PHK-II (6).

1.8 CITOKINI DC

DC lahko izločajo številne citokine. Na to katere citokine bodo izločale vplivajo številni dejavniki. Eden od dejavnikov je sama zrelost DC (npr. nezrele ali zrele DC), pomembni so tudi dejavniki, ki vplivajo na razvoj in zrelost DC ter tudi v katero smer gre sam razvoj DC. Pod vplivom tumorskega okolja lahko diferenciacija DC vodi tudi v tolerogene in supresivne oblike APC (kot so: s tumorjem povezani makrofagi (TAM), mieloidne supresorske celice (MDSC)). Seveda ti različni tipi celic izločajo različne citokine.

DC lahko proizvajajo naslednje citokine: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-12 (p35 in p40), IL-15, IL-18, TNF- α , TGF- β , M-CSF in GM-CSF, vendar pa ne proizvajajo IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, in ne izražajo IFN- γ . IL-12 izločajo po aktivaciji signalne poti preko molekule CD40. Le DC, ki izvirajo iz CD14 $^+$, po aktivaciji signalne poti preko molekule CD40 izločajo IL-10 (33).

DC tretirane z raznimi mešanicami citokinov lahko poleg zgoraj naštetih citokinov, izražajo še IL-8, IL-23 in VEGF (34).

1.9 CITOKINI, KI SO POGLAVITNEGA POMENA ZA FUNKCIJE CELIC T

Funkcije celic T so močno odvisne od citokinov, ki so prisotni v okolju, hkrati pa aktivirane celice T izločajo številne citokine, ki določajo/ustvarjajo vrsto imunskega odziva. Na kratko bomo opisali le najpomembnejše.

1.9.1 IL-2

Sinteza in izločanje IL-2 se sproži ob aktivaciji zrelih celic T. Je poglavitni citokin, ki spodbuja limfocite T, da preidejo iz faze G₁ v fazo S celičnega cikla. Izdelujejo ga predvsem celice T CD4⁺ in deluje avtokrino in parakrino. Izločajo ga samo aktivirane celice T in te iste izražajo tudi močno afinitetne receptorje, kar vodi v razrast specifičnih klonov celic T. IL-2 je poglavitni avtokrini dejavnik za limfocite T, zato je njegova količina pomembna za jakost in obseg od celic T odvisnega imunskega odziva. Dolgotrajno spodbujanje celic T lahko povzroči odstranitev receptorja za IL-2 s površine celic T. Sproščeni receptorski proteini se lahko vežejo s prostim IL-2 in preprečijo njegovo interakcijo s celicami (6).

1.9.2 IL-4

Poglavitna fiziološka funkcija IL-4 je usmeritev celic T v odziv celic T_H2 in uravnavanje alergijskih reakcij. IL-4 blokira večino učinkov IFN-γ na makrofage in onemogoča povečano izdelovanje IL-1, dušikovega oksida (NO) in prostaglandinov (6).

1.9.3 IL-7

IL-7 pospešuje razmnoževanje prednikov celic T, zrelih celic T in diferenciacijo prednikov T in celic T_C. IL-7 spodbuja izločanje IL-1α, IL-1β, IL-6 in TNF-α. Pospešuje nastajanje celic T_C in z limfociti aktiviranih celic ubijalk celo v odsotnosti IL-2 (6).

1.9.4 IL-10

IL-10 imenujemo zaviralni faktor sinteze citokinov. Preprečuje izdelovanje IL-1, GM-CSF, G-CSF in TNF-α. Njegovo nastajanje pa preprečuje IFN-γ (6).

1.9.5 IL-12

IL-12 ne izdelujejo celice T, ampak celice B, monociti in makrofagi. Je najmočnejši vzpodbujevalec naravnih celic ubijalk in spodbuja sproščanje IFN-γ v njih. IL-12 deluje sinergistično z IL-2. Spodbuja tudi diferenciacijo celic T CD8⁺ v zrele funkcionalno aktivne citotoksične celice. Okrepi tudi odziv celic T_H1. Proučevanja so pokazala, da dajanje IL-12 *in vivo* zmanjša razraščanje tumorjev in metastaz in ima dolgotrajen učinek. Menijo, da je učinek tega citokina predvsem v zvečanju aktivnosti celic T_C (6).

1.9.6 IFN- γ

IFN- γ je pleiotropen citokin in vpliva na razmnoževanje, diferenciacijo in aktivnost celic T, naravnih celic ubijalk in celic B. Izdelujejo ga naivne celice T_H, podvrste T_H0 in T_H1, vse celice T CD8⁺ ter naravne celice ubijalke. IFN- γ je močan aktivator makrofagov. V njih spodbudi nastajanje NO, TNF- α in IL-1 in tako poveča zmožnost makrofagov, da ubijejo znotrajcelične parazite in tumorske celice. IFN- γ sodeluje sinergistično z drugimi citokini (6).

1.10 CELICE T CD8⁺ IN GRANCIM B

Ena od funkcij imunskega sistema je prepoznavanje in uničenje okuženih in spremenjenih celic. To se doseže s citotoksičnimi limfociti. Citotoksičnost je zelo organiziran proces, sestavljen iz več faz. Dosežeta ga lahko dve vrsti celic: eno so naravne celice ubijalke, druge pa celice T CD8⁺.

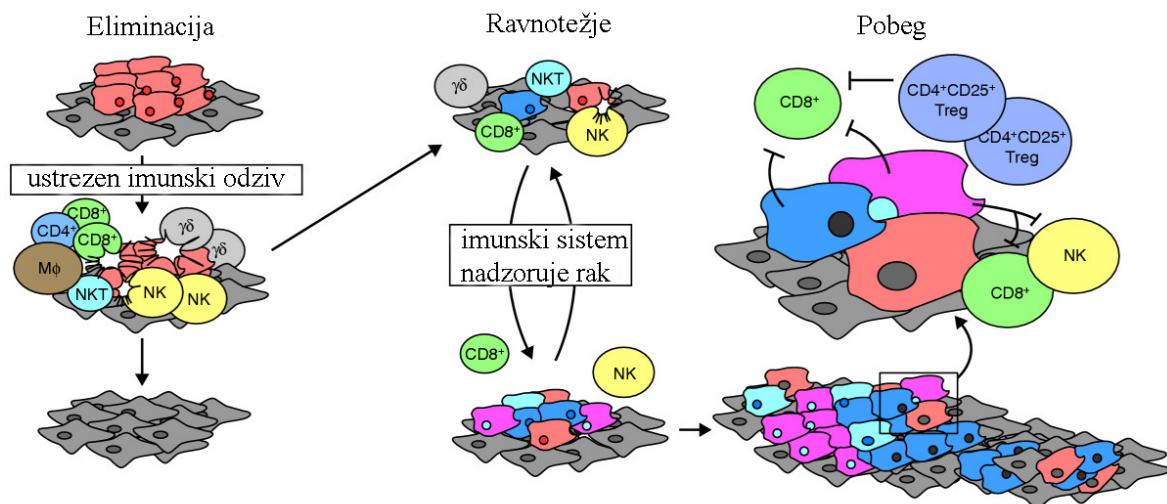
Grancimi so encimi, ki spadajo v družino serinskih proteaz. Grancimi inducirajo celično smrt. Poznamo več človeških grancimov. Grancim A in grancim B sta prisotna v največjih količinah. Shranjeni so v citotoksičnih granulah v citotoksičnih T limfocitih in v naravnih celicah ubijalkah. Te citotoksične granule vsebujejo tudi perforin, kateri je pomemben za dostavo grancimov v tarčno celico. Ko citotoksični T limfociti tvorijo imunsko sinapso s specifično prepoznano tarčno celico, se citotoksične granule premaknejo do imunske sinapse. Tam se membrana citotoksične granule združi z membrano celice ubijalke in vsebina granule se sprosti v sinaptično špranjo. Grancimi tako vstopijo v tarčno celico, kjer sprožijo različne poti programirane celične smrti. Celice ubijalke so serijske ubijalke, saj uidejo iz tega srečanja nepoškodovane in lahko poiščejo in uničijo drugo tarčno celico (35).

Grancim B ima najmočnejšo apoptozno aktivnost med vsemi grancimi, to pa je posledica njegove lastnosti, ki je podobna lastnosti kaspaz, da lahko cepi substrate na ključnih ostankih asparaginske kisline (36). Grancim B lahko cepi in zato direktno aktivira nekaj prokaspaz. Direktno lahko navzdol cepi substrate kaspaz, vključno z inhibitorjem kaspazno-aktivirane DNaze. Tako lahko v veliki meri prispeva k fragmentaciji DNA v tarčni celici. Pokazalo se je tudi, da je mitohondrijska motnja nepogrešljiv element

grancimsko posredovane celične smrti (37). Grancim B specifično in hitro cepi Bid, ki je pro-apoptozni član Bcl-2 družine proteinov, končno do ostanka asparaginske kisline na mestu 75. Tako se okrnjena Bid molekula vstavi v mitohondrijsko membrano in inducira sproščanje drugih pro-apoptoznih članov, vključno s citokromom C in Smac/Diablo (38). Obstajajo tudi kspazno neodvisni mehanizmi, ki pa so slabo raziskani.

1.11 IMUNSKI ODZIV PRI RAKU

Komponente imunskega sistema omogočajo odstranjevanje rakavih celic, ali pa povzročijo, da se vzpostavi imunsko ravnotežje in pobeg tumorja iz imunskega nadzora. Eliminacija, ravnotežje in pobeg so poimenovali s skupno besedo imunsko urejanje (angl. immunoediting) (39) (slika 3). Proces funkcionalnega rakavega imunskega nadzora deluje kot zunanji zaviralec tumorja, imunski sistem pa lahko tudi olajša napredovanje tumorja. Spoznanje, da imunost igra dvojno vlogo pri kompleksnih interakcijah med tumorjem in gostiteljem, je vodilo k izpopolnjevanju hipoteze o rakavem imunkemu nadzoru v hipotezo o rakavem imunskemu urejanju. Na začetku imunski sistem prepozna in odstrani rakave celice, zato raka ne zaznamo. Če eliminacija ni uspešna ji sledi obdobje ravnotežja, ko imunski sistem nadzoruje rak. Ko rak postane klinično zaznan, je že pobegnil protitumorski imunosti (40). Eliminacijo in ravnotežje omogočajo/izvajajo limfociti, predvsem preko T-celične podpopulacije (41). Pri bolnikih z rakom pa imunksemu odzivu proti tumorju nasprotuje supresiven, tumorsko-voden učinek (42). Tumor lahko supresijo doseže znotraj rakavega mikrookolja in tudi sistemsko. Regulatorne celice T (T_{reg}), kot primer, lahko zavrejo efektorske celice T. Te celice so odkrili v mikrookoljih večih tumorjev (43-45). Imunosupresijo povzroča tudi znižanje količine PHK-a na APC in izguba tumorskih antigenov (46). Poleg tega pa tudi motnja delovanja naravnih celic ubijalk (43, 47).



Slika 3: Imunsko urejanje (angl. immunoediting) (48).

1.11.1 IMUNSKI ODZIV PRI RAKU JAJČNIKOV

Prisotnost ali odsotnost specifičnih populacij celic T igra ključno vlogo v imunskem urejanju. Prisotnost tumorsko infiltrirajočih limfocitov, kot so celice T CD3⁺ in povečano število citotoksičnih limfocitov T CD8⁺ v tkivih vstavljenih v parafin, je povezano s podaljšanim preživetjem teh tkiv (49-51). Eliminacijo posredujejo tudi celice CD3⁺CD56⁺, tj. citotoksične celice T, ki izkazujejo naravnim celicam ubijalkam podobne značilnosti. Te celice imajo najvišjo citotoksično aktivnost med vsemi efektorskimi celicami *in vitro* (52, 53). Pri ovarijskem raku imajo celice T CD4⁺ pozitivni vpliv, in sicer privabljajo DC v tumor in na ta način omogočijo aktivacijo tumor-specifičnih celic T CD8⁺, ki posredujejo dolgotrajno zaščito (54).

Po drugi strani imajo T_{reg} ključno vlogo pri nastanku periferne tolerance pri tumorski imunosti. T_{reg} so celice znotraj CD4⁺CD25⁺ T-celične populacije in izražajo FoxP3⁺ protein (55, 56). Ljudje s tumorji imajo izražene povišane količine T_{reg} (57, 58). Prisotnost CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg} celic se ujema s slabim kliničnim izidom (59), saj akumulirane T_{reg} zavirajo CD8-posredovan imunski odziv proti tumorju (57, 60).

Pokazalo se je, da plazmacitoidne DC prav tako prispevajo k imunosupresiji. Te DC inducirajo T_{reg} v tumorskem mikrookolju (61).

Kemoterapija (natančneje uporaba paklitaksela) znižuje količino T_{reg} in ima pozitiven vpliv na imunski odziv (62). Prav tako ima gemcitabin v kombinaciji z oksiplatinom in citokini, kot sta IL-2 in GM-CSF, zaviralni vpliv na T_{reg} (63, 64).

1.11.2 VPLIV CITOKINOV IN RASTNIH DEJAVNIKOV NA DELOVANJE LIMFOCITOV PRI RAKU JAJČNIKOV

Gostiteljev protitumorski odziv je rezultat ravnotežja med celicami pomagalkami T_H1 in celicami pomagalkami T_H2 . T_H1 spodbujajo imunski odziv, medtem ko je T_H2 odziv premik v korist onkogeneze in napredovanja bolezni. Obe vrsti celic pomagalk proizvajata IL-12, IL-4, IFN- γ , medtem ko TNF- α proizvajajo samo T_H1 , IL-10 pa T_H2 (65-68). Te citokine lahko proizvajajo tudi rakave celice. Prisotni so v ascitesu in so povezani s prognozo raka jajčnikov (57, 69-71). Gradient med krvjo in ascitesom pa bi lahko igral ključno vlogo pri migraciji levkocitov (72).

Razumljivo je, da bodo citokini, ki so vpleteni v T_H1 odziv, pričakovano napovedovali boljšo prognozo, kakor tisti, ki so vpleteni v T_H2 odziv in imajo nasprotni učinek. Citokina IL-12 (73) in IL-21 (74) trenutno preučujejo zaradi njunega terapevtskega potenciala v drugih tipih raka in bi lahko imela enak učinek tudi pri raku jajčnikov. Vnos IL-12 je povezan z ugodno prognozo, saj so pri eni od študij širje pacienti imeli zmanjšano gliomo za 50% (73). V eni od študij pa se je povečal protitumorni učinek človeških celic raka jajčnikov, ki so izločale tako sam IL-21, kot v kombinaciji z GM-CSF (74). Količina IL-6 v serumu je povečana pri bolnicah z rakom jajčnikov (75, 76), prav tako pa je povezana s slabim splošnim preživetjem. IL-1 je še eden od citokinov, ki je povezan z rastjo rakavih celic in napredovanjem raka (77, 78). Nedolgo nazaj so odkrili, da IL-15 aktivira celice T $CD8^+$ in naravne celice ubijalke, kar seveda lahko zavira rast tumorja (79).

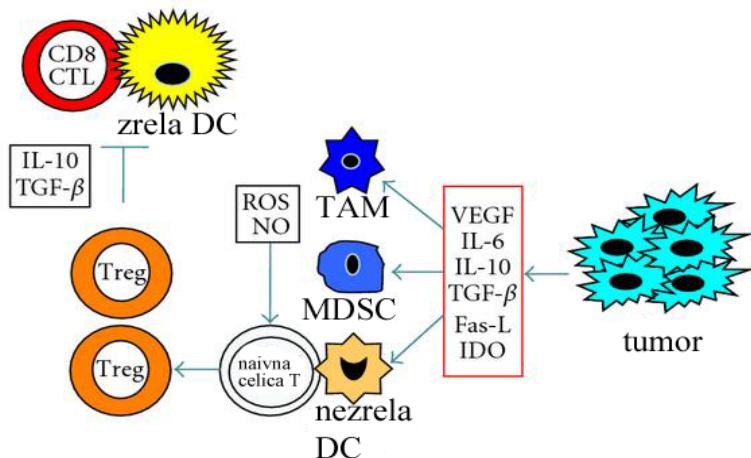
Citokin, ki je zelo močno povezan s tumorsko imunosupresijo, je transformirajoči rastni dejavnik- β (TGF- β). To je protein, ki vpliva na proliferacijo, aktivacijo in diferenciacijo imunskih celic in zavira protitumorski imunski odziv (80). V rakavih celicah je nastajanje TGF- β povečano, kar poveča proteolitično aktivnost celic in vezanje na molekule celične adhezije v ekstracelularnem matriksu. Poleg tega lahko TGF- β pretvori efektorske celice T v T_{reg} (81) (slika 4). Ugotovili so, da lahko TGF- β vzpodbuja angiogenezo. Vse te njegove učinke lahko zavremo s protitelesi proti TGF- β (82).

TNF- α proizvajajo tumorske celice. Spodbudi lahko avtokrino proliferacijo in napredovanje bolezni pri raku jajčnikov (83-85). Nasprotno temu, TNF- α obratno korelira s prisotnostjo CD4 $^+$ CD25 $^+$ celic T (te so značilne pri T_H2 odzivu), kar je pokazalo, da zmanjša količino T_{reg} (86).

Proteini imenovani kemokini imajo tudi vlogo pri raku jajčnikov. Ugotovili so, da kemokin CCL5, ki ga izločajo celice T CD4 $^+$, privablja CCR5 $^+$ DC na mesto tumorja in jih aktivira prek interakcije CD40-CD40L (55). Na novo aktivirane DC spodbudijo tumor-specifične celice T CD8 $^+$ in tako zagotavljajo dolgotrajno zaščito.

IFN- γ ima stimulatorno vlogo, saj pretvarja imunosupresivne makrofage v imunostimulatorne celice (87). Zaradi te lastnosti bi njegov lokalni vnos lahko potencialno zvišal učinkovitost protitumorske imunoterapije, ki temelji na efektorskih celicah T (88).

Žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), ki je znan po tem, da spodbuja angiogenezo in s tem razrast tumorja, ima še druge imunosupresivne lastnosti pri raku. Povezan je z nizko količino IL-12, inhibicijo zorenja DC, majhnim številom naravnih celic T ubijalk in povečanjem količine T_{reg} (89-93). Svoje učinke sproži preko receptorja VEGFR, predvsem VEGFR2 (94). Razen rakavih celic, je protein VEGFR2 selektivno izražen na CD4 $^+$ FoxP3 $^+$ T_{reg} (95).



Slika 4: Tumorsko mikrookolje zavira imunski sistem. Zaviralni dejavniki povzročajo nastanek TAM, MDSC in nezrelih DC ter tudi T_{reg} (96).

1.12 VPLIV PGE₂ NA DIFERENCIACIJO DC IN MDSC

DC in MDSC imajo nasprotne vloge v imunskem sistemu. MDSC tako v nasprotju z DC zavirajo sposobnosti celic T CD8⁺. MDSC zavirajo imunski odziv proti rakavim celicam, vendar bi bile lahko uporabne pri avtoimunskih boleznih in pri preprečevanju zavračanja pri transplantacijah (97-99). Prav tako MDSC izločajo velike količine imunosupresivnih dejavnikov kot so indolamin dioksigenaza (IDO) (100, 101), IL-10 (102), arginaza (103, 104), inducibilna NO sintetaza (NOS2) (104), NO in reaktivne kisikove spojine (ROS) (105). S temi molekulami zavirajo T-celične odzive (106, 107).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) je provnetna molekula, ki jo proizvajajo rakave celice, stroma in infiltrirajoče mieloidne celice (108). Njegovo signaliziranje poteka preko 4 G-proteinsko vezanih receptorjev (EP1- EP4), med katerimi sta EP2 in EP4 vpletena v dvig količine cAMP (109). Zelo zanimivo je, da PGE₂ lahko vzpodbudi končno zorenje že razvitih DC in poveča njihove stimulatorne vloge (110, 111). Vendar pa prisotnost PGE₂ pri zgodnjih fazah razvoja DC zavre diferenciacijo človeških monocitov v funkcionalne T_H1-spodbujajoče CD1a⁺ DC (112). Pokazalo se je, da PGE₂ poveča število MDSC v mišjih modelih (113-115) in izražanje arginaze 1 v človeških MDSC (104) in preusmeri diferenciacijo DC proti MDSC (116). Vnetne molekule kot so IL-1 β , IFN- γ , PGE₂ ali TLR ligandi inducirajo izražanje PGE₂ (97).

Tumorske celice proizvajajo in/ali inducirajo sproščanje PGE₂, PGE₂ pa inducira dodatne z MDSC- povezane imunosupresivne dejavnike v monocitih. Prav tako inducira visoko izražanje COX2 in *de novo* endogeno nastajanje PGE₂. PGE₂ proizvajajo v velikih količinah tudi MDSC. Da bi bile MDSC funkcionalno stabilne, potrebujejo kontinuirano produkcijo PGE₂. Tako inhibicija produkcije PGE₂ prepreči indukcijo MDSC fenotipa v nezrelih mieloičnih celicah. Še bolj pomembno pa je, da obrne supresivne funkcije MDSC v rakavem okolju (116).

Dokazano je bilo, da inhibicija endogene produkcije PGE₂ z uporabo selektivnih COX2 inhibitorjev, obrne supresivne učinke popolnoma razvitih MDSC, ki so bile izolirane iz celic raka jajčnikov. Podobne rezultate so dobili z uporabo sintetičnih antagonistov receptorjev EP2/1 in EP4 za PGE₂ (110). Rezultati dobljeni z inhibicijo COX2 so bili boljši kot rezultati z inhibicijo IDO-1, arginaze-1, IL-10 ali inducibilne NO sintetaze. Razlog, da je tarča zlasti PGE₂, bi lahko razložili s tem, da je lastnost PGE₂ (in EP2

agonista, vendar ne EP3/1 agonista) izvajanje direktnega supresivnega učinka na celice T CD8⁺, ločeno od indukcije dodatnih supresivnih dejavnikov (116).

1.13 ADHEZIJA IN MIGRACIJA DC

Migracija je aktivni proces, ki vsebuje kemokine in adhezijske molekule ter spremišča proces zorenja DC. Eden ključnih korakov do uspešnega imunskega odziva je migracija DC v limfne vozle, kjer nato vstopajo v interakcije z naivnimi celicami T. *In vitro* proizvedene zrele DC lahko učinkovito migrirajo v T celična področja limfnih vozlov pri pacientih z melanomom. Te migracijske sposobnosti ne izkazujejo nezrele DC. V *in vitro* študijah so potrdili, da so, nezrele DC močno adherentne, medtem ko zrele DC ostajajo močno gibljive. Tako so pokazali, da lastnosti DC, da ustvarijo ustrezni imunski odziv, korelira z njihovo zmožnostjo migracije tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (117).

Izražanje adhezijskih molekul integrinov β_1 in β_2 se nekoliko zmanjša ob zorenju DC. Oba tipa DC se vežeta na zunajcelični matriksni protein fibronektin. Vendar je vezava in celično širjenje veliko močnejše pri nezrelih DC. Slednje so na fibronektinu zelo dinamične, saj se kontinuirano širijo, krčijo in menjavajo obliko, vendar niso gibljive. Obratno pa so zrele DC zelo gibljive in se kontinuirano prilepljajo in odlepljajo z uporabo dendritov. Tako je posledično hitrost zrelih DC 10-krat večja kot hitrost nezrelih. Vezavo lahko v celoti blokiramo s protitelesi proti integrinom β_1 ali delno s protitelesi proti integrinom β_2 (117).

Že prej omenjeni CCR5 je izražen v približno 40% na nezrelih DC, medtem ko je na zrelih DC odsoten. Obratno je pri izražanju CCR7, katerega ni na nezrelih DC, je pa prisoten v približno 80% na zrelih DC (117). Ko DC dozorijo, pridobijo CCR7, ki se odziva na liganda CCL19 in CCL21 (118-120). Ti kemokini so odgovorni, da DC prispejo do limfnih vozlov (121-123).

Migracija pomeni začetek in koordinacijo kompleksnih serij preoblikovanja citoskeleta, kar se kaže kot polarizirane izbokline, tvorjenje novih adhezijskih točk in odlepljanje. *In vitro* pridobljene nezrele DC plavajo v skupkih, ob dodatku LPS pa se hitro pritrdijo, razvijejo polarnost in sestavijo aktinsko bogate strukture znane kot podosomi na vodilnem robu celice. Sestavljanje podosomov je povezano s specifično translokacijo β_2 integrinov

iz notranjosti DC na celično površino le-te, kar pa ni možno ob odsotnosti Wiskott-Aldrich sindromskega proteina. Ko napreduje zorenje, normalne DC postanejo spet okrogle ter izgubijo podosome. Ta morfološka sprememba je zelo povezana s kvantitativno zmanjšano možnostjo adhezije s fibronektinom ali z ICAM-1 prekritimi površinami. Podobno zmanjšana možnost adhezije na ICAM-1 se pojavi tudi pri tistih nezrelih DC, ki niso zmožne tvoriti podosomov, ali pri selektivni inhibiciji CD18 komponente podosomov. To nakazuje, da se podosomi preko CD18 pritrđijo na ICAM-1. Tako naj bi podosomi predstavljeni ključno povezano med smernimi celičnimi izbolkinami in dosego translokacije DC z vzpostavitvijo novih dinamičnih sidrnih točk na sprednji strani celice (124).

Podosomi so lokacije aktivne matriksne razgradnje, ki vzpodbudi celično migracijo in invazijo. Sestavljeni so iz jeder, ki so polna aktina. Jedra so obkrožena s citoskeletnimi proteini, kot so vinkulin, paksilin in talin. Ti proteini povežejo integrine z aktinskim citoskeletom (125). Nahajajo se v monocitih, nezrelih DC, ki izvirajo iz monocitov in v mieloidnih DC. Odziv podosomov na zoritveni dražljaj, kot sta TNF- α in PGE₂, je njihova hitra razgradnja, medtem ko je razgradnja upočasnjena pri odzivu na LPS. Z LPS povezana razgradnja in začetek hitre migracije DC je odvisno od nastajanja prostaglandinov v DC. Oba procesa zavira aktivacija β_1 integrinov. To kaže, da razgradnja podosomov, kot posledica zorenja in izguba $\alpha_5\beta_1$ integrinske aktivnosti, omogoča človeškim DC spremembo iz adhezivnega v močno migratorni fenotip (126).

Razgradnja podosomov se zgodi v nekaj minutah po dodatku PGE₂ DC. Ta odziv je posredovan z dvigom cAMP, znižanjem Rho kinaze in je odvisen od miozina II. Stimulacija s PGE₂ vodi do aktivacije majhne GTPaze RhoA in zmanjšanja količine Rac1-GTP ter Cdc42-GTP. Ti rezultati kažejo, da stimulacija s PGE₂ vodi do aktivacije osi RhoA-Rho-kinaze, katera vzpodbudi krčenje, ki temelji na aktomiozinu, in naknadno razgradnjo podosomov. Temu sledi *de novo* sestava fokalne adhezije. Tako naj bi bili ti dve različni adhezijski strukturi nasprotno urejeni z aktomiozinsko krčljivostjo in relativnimi aktivnostmi RhoA, Rac1 in Cdc42 (127).

Majhne GTPaze, Rac1, Cdc42 in RhoA, člani Rho družine, urejajo celično gibanje s spremenjanjem sestave aktina, adhezije in aktomiozinske krčljivosti (128). Rac1 ustvarja z aktinom bogate lamelipodijske izrastke in z integrinom posredovane adhezije (129). Obratno pa RhoA aktivira ROCK in naknadno aktivira ne-mišični miozin II, kateri

promovira aktomiozinsko krčljivost (130). Ključna za prehod skozi ozke vrzeli je prav od ROCK in miozina II odvisna krčljivost (131).

DC potujejo skozi različna okolja. V tkivih, kot so fibroblastna retikularna tkiva in notranje stene žil, DC uporabljajo z integrinom posredovane pripombe in krčljivost za celično gibanje. Obratno pa v omejenih območjih uporabljajo z miozinom II posredovano aktomiozinsko krčljivost, da se lahko premikajo naprej, ker ta tkiva zapirajo in mehanično sidrajo celična telesa (132, 133). Med transmigracijo DC so potrebni vsaj trije mehanizmi. Prvič, DC morajo oblikovati lamelijpodijske izrastke na sprednjem delu kot odziv na kemokine, ki so signal za premikanje naprej. Drugič, DC morajo skrčiti in stisniti svoja telesa z aktomiozinsko krčljivostjo, da pridejo skozi ozke vrzeli. Tretjič, po tem, ko so DC izpostavljene lumnu, se morajo ločiti od epitelnih celic, da lahko vstopijo v obtok. Miozin II promovira njihov odstop od endotelija žil (134, 135).

1.14 BLEBBISTATIN

Blebbistatin je majhna inhibitorna molekula, ki ima veliko afiniteto in selektivnost za miozin II. Blebbistatin se veže na kompleks miozin-ADP-P_i in upočasni sproščanje fosfata. Tako se ne vpleta v vezavo miozina z aktinom niti v z ATP inducirano aktomiozinsko disociacijo. Blebbistatin blokira miozinske glave kompleksa produktov z nizko aktinsko afiniteto. Vezavno mesto blebbistatina na miozinskih glavah je znotraj vodnih votlin, ki se nahajajo med nukleotidnim žepom in režo za aktinsko vezavo. Zaradi te svoje lastnosti se uporablja v raziskavah mišične fiziologije in za raziskave celične funkcije izoblik citoplazemskega miozina II (136).

2 HIPOTEZA IN NAMEN DELA

DC so profesionalne APC. Njihova lastnost, da spodbudijo funkcionalne celice T, je odvisna od zorenja, migracije do T celičnih področij limfnih vozlov in izločanja citokinov. V tej diplomski nalogi se bomo osredotočili na preučevanje možnosti vpliva na diferenciacijo in zorenje DC s spremjanjem adhezije in posledično signalizacije preko citoskeleta. Naš cilj je priprava DC, ki bi proizvajale visoke količine IL-12.

V tumorskem okolju so prisotne velike količine PGE₂. PGE₂ povzroči zmanjšanje tvorbe IL-12 v DC, ki migrirajo v tumorsko okolje, in tako oslabi protitumorski imunski odziv. Pod vplivom PGE₂ postanejo DC tolerogene in njihov razvoj gre v supresivno obliko APC, t.i. MDSC. Te celice imajo obraten učinek od normalnih DC, saj uravnavajo imunski odziv tako, da omogočajo razrast tumorja.

Po drugi strani DC, ki proizvajajo velike količine IL-12, lahko sprožijo ustrezni (tip T_H1) in močan protitumorski imunski odziv. IFN-γ sproži nastajanje velikih količin IL-12 v DC. IL-12 preseže imunosupresivne učinke PGE₂ in tako omogoči uspešno aktivacijo citotoksičnih celic T CD8⁺, katerih naloga je uničenje tumorskih celic.

Naša predvidevanja so, da je adhezija med diferenciacijo in zorenjem DC pomemben dejavnik, ki vpliva na lastnosti DC, da le-te proizvajajo IL-12. Raziskovali bomo vpliv z integrini posredovanega signaliziranja, ki spremlja adhezijo/migracijo tekom diferenciacije in zorenja DC, na značilnosti zrelega fenotipa DC. Tako se bomo osredotočili na adhezijo/odlepljanje povezano z miozinom II. Naša predpostavka je, da adhezija/odlepljanje povezano z miozinom II vpliva na zmožnost DC, da proizvajajo IL-12.

IFN-γ in PGE₂ vplivata na adhezijo DC in s tem na proizvajanje IL-12 zrelih DC. Naša hipoteza je, da IFN-γ in PGE₂ vplivata na adhezijo/odlepljanje preko miozina II. Posledica tega je različno izločanje IL-12. To je tako odvisno od snovi, katerim bodo DC izpostavljene tekom diferenciacije in zorenja.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI

Preglednica I: Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

REAGENT	Proizvajalec	REAGENT	Proizvajalec
blebbistatin	Sigma-Aldrich	penicilin/streptomicin	Invitrogen
brefeldin A	Sigma-Aldrich	PGE ₂	Sigma-Aldrich
BSA ($\geq 95,0\%$)	Sigma-Aldrich	PMA	Sigma-Aldrich
Butaprost	Sigma-Aldrich	poli(I:C)	Sigma-Aldrich
celekoksib	Biovision	rhGM-CSF	Miltenyi Biotec
CD40L	Enzo Life Sciences	rhIFN- γ	Miltenyi Biotec
CFSE	Invitrogen	rhIL-12	R&D Systems
EDTA 0,5 M pH 8,0	Invitrogen	rhIL-17	R&D Systems
faloidin-tetrametilrodamin B izocianatni konjugat	Fluka	rhTNF- α	Miltenyi Biotec
		SEB	Toxin Technologies
FBS	Gemini	Sulprostone	Sigma-Aldrich
GlutaMAX™ 100x	Invitrogen	TMB	Sigma-Aldrich
histopaque	Sigma-Aldrich	Triton X-100	Sigma-Aldrich
IL-4	Miltenyi Biotec	Tween 20	Sigma-Aldrich
ionomicin	Sigma-Aldrich	C ₆ H ₈ O ₇ xH ₂ O	Serva
indometacin	Sigma-Aldrich	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 98,5-101 %	Riedel-de Haën
LPS	Sigma-Aldrich	H ₂ SO ₄ 95-97 %	Riedel-de Haën
PBS 1x pH 7,4	Invitrogen	4 % parafomaldehid	Fisher Scientific

3.1.2 PROTITELESA

Preglednica II: Protitelesa, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

PROTITELESA	Proizvajalec
protitelesa CD1a- PE	BD Pharmingen in eBioscience
protitelesa CD14-PE	BD Pharmingen in eBioscience
protitelesa CD80-PE	BD Pharmingen in eBioscience
protitelesa IL-4-PE	eBioscience
protitelesa CD83-FITC	BD Pharmingen in eBioscience
protitelesa CD86-FITC	BD Pharmingen in eBioscience
protitelesa HLA-DR-FITC	BD Pharmingen in eBioscience
protitelesa IFN- γ -FITC	eBioscience
podganja protitelesa IgG ₁ -PE/FITC	BD Pharmingen
podganja protitelesa IgG _{2a} -PE/FITC	BD Pharmingen
mišja IgG ₁ -PE/FITC	BD Pharmingen
protitelesa proti človeškemu grancimu B	BD Pharmingen
protitelesa proti NF- κ B konjugirana z Alexa Fluor 488	Santa Cruz Biotechnology
protitelesa proti IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 ali IFN- γ	eBioscience
protitelesa proti IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 ali IFN- γ konjugirana s streptavidinom	eBioscience
konjugat biotin-hrenova peroskidaza	Pierce

3.1.3 GOJIŠČA

Preglednica III: Gojišča, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

GOJIŠČA	Proizvajalec
AIM-V medij	Invitrogen
IMDM medij	Invitrogen
RPMI medij	Invitrogen

3.1.4 KOMPLETI

Preglednica IV: Kompleti, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

KOMPLET	Proizvajalec
CD14-Microbeads izolacijski komplet	Miltenyi Biotec
CD45RO-Microbeads izolacijski komplet	Miltenyi Biotec
izolacijski komplet za celice T CD4 ⁺	Miltenyi Biotec
izolacijski komplet za celice T CD8 ⁺	Miltenyi Biotec
Prolong Antifade komplet	Molecular Probes
FoxP3 fiksirni/permeabilizacijski komplet	eBioscience
komplet za obogatitev CD8 celic	Miltenyi Biotec
CD3/CD28 Dynabeads	Invitrogen

3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica V: laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

LABORATORIJSKA OPREMA	Proizvajalec
analizna tehtnica	AJH 4200CE, Tehnica
avtoklav	H+P Labortechnik
avtomatske pipete	Eppendorf Research
avtomatska multikanalna pipeta -12	Brand
banjice za multikanalne pipete	Corning Costar
centrifuga	Universal 320R, Hettich Zentrifugen
citospin	Cytofuge
falkonke	Corning Costar
hladilnik in zamrzovalnik	Gorenje
inkubator	WTC Binder
komora z laminarnim pretokom zraka	LFVP 12, Iskra PIO
konfokalni mikroskop	LSM 510, Carl Zeiss
krioviale	Corning Costar
MACS Multistand magnetno stojalo	Miltenyi Biotec
MACS separacijske kolone 25 LS	Miltenyi Biotec
MidiMACS ločevalnik (magnetno držalo)	Miltenyi Biotec
mikroskop	CKX 41, Olympus
mikrotiterske plošče	Corning Costar, Iwaki
mini centrifuga	LMS
motorizirani invertni mikroskop	IX 81, Olympus
pipetor	Drummond Scientific
pretočni citometer	BD FACSCalibur, BD Biosciences

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice V: laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu diplomske naloge, ter njihov proizvajalec.

LABORATORIJSKA OPREMA	Proizvajalec
serološke pipete	LLG
spektrofotometer	Infinite M1000, Tecan
vakuumski filtrirni sistem 500 mL	Corning Costar
vibracijsko mešalo	EV-102, Tehnica
zamrzovalnik -80°C	MDF-53V, Sanyo
zamrzovalnik s tekočim dušikom	GT40, Air Liquide

3.2 METODE DELA

3.2.1 PRIDOBIVANJE DC

Mononuklearne celice periferne krvi smo pripravili iz zgoščene krvi zdravih darovalcev (pripravljeni na Zavodu RS za transuzijsko medicino Ljubljana, dovoljenje etične komisije 21p/08/11).

Postopek izolacije mononuklearnih celic periferne krvi:

- a. Zgoščeno kri razdelimo v 4 velike falkonke (po približno 11 mL).
- b. Dodamo enako količino RPMI medija in premešamo s pipeto.
- c. Dodamo 12 mL histopaque (gostotni gradientni medij) na dno falkonke.
- d. Centrifugiramo 25 minut pri 2300 obratih/minuto brez pospeška in zavore.
- e. Zgornjo plast s trombociti odstranimo.
- f. S pipeto poberemo plast mononuklearnih celic in jo prenesemo v nove falkonke.
- g. Dolijemo RPMI medij do 50 mL.

- h. Centrifugiramo 3-krat: 1. pri 1600 obratih/minuto, 2. pri 1300 obratih/minuto in 3. pri 1100 obratih/minuto. Med centrifugiranji supernatant zavržemo in resuspendiramo z novim RPMI medijem, katerega dopolnimo do 50 mL. Pred zadnjim centrifugiranjem združimo celice v dve falkonki.
- i. Po zadnjem centrifugiranju združimo celično frakcijo v eno falkonko in dopolnimo z AIM-V medijem.

Monocite smo izolirali z uporabo pozitivne magnetne selekcije, pri kateri smo uporabljali CD14-Microbeads izolacijski komplet.

Postopek izolacije monocitov:

- a. Predhodno izolirane mononuklearne celice periferne krvi centrifugiramo 8 minut pri 1100 obratih/minuto.
- b. Supernatant zavržemo ter resuspendiramo in dopolnimo do 2 mL z MACS pufom ter dodamo 100 µL CD14-Microbeads.
- c. Inkubiramo na 4 °C 25 minut.
- d. Speremo s 40 mL MACS pufra in centrifugiramo 8 minut pri 1600 obratih/minuto.
- e. Odlijemo in resuspendiramo v 1 mL MACS pufra.
- f. Kolono postavimo v magnetno držalo in jo speremo s 5 mL MACS pufra.
- g. Na kolono nanesemo označene celice ter jih 3-krat speremo s po 4 mL MACS pufra.
- h. Kolono snamemo iz magnetnega držala, dodamo 5 mL MACS pufra in iztisnemo monocite iz kolone v falkonko.
- i. Dopolnimo do 40 mL s kompletnim IMDM medijem.

Postopek priprave MACS pufra

V 500 mL destilirane vode damo 2,5 g BSA in 2 mL EDTA.

Priprava kompletnega IMDM medija

Zmešamo 500 mL IMDM medija + 55 mL FBS + 5,5 mL GlutaMAXTM + 5,5 mL penicilina/streptomicina. Na koncu še sterilno prefiltriramo.

Gojenje monocitov

Za gojenje monocitov smo uporabljali plošče s 24 vdolbinicami, bodisi polistirenske ter obdelane za optimalno delo s celičnimi kulturami ali z ultra nizko možnostjo pritrjevanja celic. V eno vdolbinico smo dali 5×10^5 celic v gojišču z rekombinantnim GM-CSF in rekombinantnim IL-4 (oba v koncentraciji 1000 U/mL), z ali brez dodatka blebbistatina (10 µM) ali celekoksiba (10 µM). Monocite smo gojili 6 dni ter 3. dan zamenjali polovico medija z začetnimi koncentracijami dejavnikov. Šesti dan smo sprožili zorenje DC (48 ur) z naslednjimi dejavniki: LPS (20 ng/mL), TNF-α (50 ng/mL), IFN-γ (1000 U/mL), PGE₂ (10^{-6} mol/L), poli(I:C) (20 µg/mL) in/ali CD40L.

3.2.2 IZOLACIJA MONOCITOV IN CELIC T CD8⁺ IZ ASCITESA BOLNIC Z RAKOM JAJČNIKOV

Človeški ascites raka jajčnikov je bil pridobljen intraoperativno na Ginekološki kliniki v Ljubljani, UKCL. Pridobljen je bil iz nezdravljenih pacientk z napredovanim 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 ascitesa rakavih bolnic so bile zbrane s centrifugiranjem. Centrifugiraju je sledila liza rdečih krvnih celic in pozitivna magnetna selekcija celic

CD14⁺ (CD14-MicroBeads). Celice T CD8⁺ so bile izolirane z negativno selekcijo s CD8 obogatitvenim izolacijskim kompletom.

3.2.3 IZOLACIJA NAIVNIH CELIC T CD4⁺ IN CD8⁺ PERIFERNE KRVI IN IN VITRO PRIDOBIVANJE EFEKTORSKIH CELIC

Naivne celice T CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ in CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ smo izolirali z negativno selekcijo iz mononuklearnih celic periferne krvi z uporabo CD45RO-MicroBeads in izolacijskega kompleta za celice T CD8⁺ in CD4⁺.

Postopek izolacije naivnih celic T CD4⁺ ali CD8⁺:

- a. Uporabimo negativno frakcijo, ki smo jo dobili pri izolaciji monocitov.
- b. Dodamo CD45RO-Microbeads in inkubiramo 20 minut.
- c. Dodamo 40 ml MACS pufra in centrifugiramo 8 minut pri 1600 obratih/minuto.
- d. Odlijemo supernatant in resuspendiramo sediment v MACS pufru.
- e. Dodamo 1. del izolacijskega kita za celice T CD4⁺ ali CD8⁺ in inkubiramo 20 minut.
- f. Dodamo 2. del izolacijskega kita za celice T CD4⁺ ali CD8⁺ in inkubiramo 15 minut.
- g. Dodamo 40 ml MACS pufra in centrifugiramo 8 minut pri 1600 obratih/minuto.
- h. Odlijemo supernatant in resuspendiramo sediment v MACS pufru.
- i. Kolono postavimo v magnetno stojalo in jo speremo s 5 mL MACS pufra.
- j. Na kolono nanesemo označene celice ter 3-krat speremo s po 4 mL MACS pufra.
- k. V negativno frakcijo dodamo kompletni IMDM medij.

Na ta način smo pridobili enotno populacijo celic CD4⁺/CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻. Celice T CD4⁺ in CD8⁺ (1×10^5 celic/vdolbinico) smo aktivirali z DC, katere smo prej tretirali s SEB (1 ng/mL, 1:5 do 1:20 razmerje DC:celice T).

Celice T CD4⁺ in CD8⁺ smo po protokolu proizvajalca obarvali s CFSE. Peti oz. šesti dan smo analizirali z DC-aktivirane celice T CD4⁺ in CD8⁺. Analizirali smo proliferacijo in izražanje CXCR3 ter grancima B.

Za analizo produkcije citokinov smo peti oz. šesti dan odvzeli gojišče kokultur celic ter ga nadalje analizirali z ELISA. Celice T smo nadalje gojili in jih 7-9. dan stimulirali s PMA (50 ng/mL) in ionomicinom (1 µg/mL). Po štirih urah stimulacije kultur celic T smo dodali brefeldin A (10 µg/mL), ki preprečuje znotrajcelični transport in zadrži producirane citokine znotrajcelično, ter jih inkubirali preko noči. Celice smo zbrali, jih fiksirali in permeabilizirali z raztopino FoxP3 fiksirnega/permeabilizacijskega kompleta. Pri nadaljnem znotrajceličnem barvanju smo uporabili naslednja protitelesa: IFN- γ -FITC, IL-4-PE. Celice smo inkubirali s protitelesi 30 minut pri sobni temperaturi, nevezana protitelesa sprali in celice resuspendirali v 4 % paraformaldehidu.

3.2.4 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 ustvari zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnostih celic v vzorcu. Svetlobni žarek zadane 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 dvobarvne celične površine in znotrajceličnega imunskega barvanja smo izvedli na Beckton Dickinson FACSCalibur pretočnem citometru. *In vitro* pridobljene DC smo obarvali s protitelesi CD1a-PE, CD14-PE, HLA-DR-FITC, CD80-PE, CD83-FITC, CD86-FITC. Za izotipske kontrole smo uporabili podganja IgG_{2a}-PE/FITC in IgG₁-PE/FITC protitelesa.

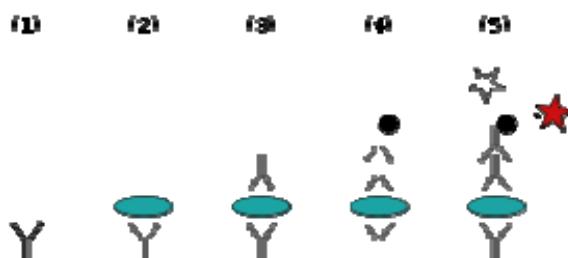
Postopek priprave vzorcev za pretočno citometrijo:

- a. Celice speremo s PBS.
- b. Inkubiramo jih v pufru za blokado (1 % BSA v PBS) 10 min.
- c. Dodamo protitelesa ter inkubiramo 30 min na 4 °C.
- d. Speremo s PBS.

Za detekcijo znotrajceličnega grancima B smo celice predhodno fiksirali in permeabilizirali s FoxP3 fiksirnim/permeabilizacijskim kompletom po protokolu proizvajalca.

3.2.5 ELISA

Encimski imunski test na trdnem nosilcu (angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je ena izmed imunoloških tehnik, ki omogoča detekcijo antigenov ali protiteles. Direktna (sendvič) ELISA temelji na tvorbi kompleksa med primarnim protitelesom, specifičnim antigenom za to protitelo, ki ga želimo določiti, ter sekundarnim protitelesom, katero je odgovorno za detekcijo nastalega kompleksa. Mi smo dodali še eno protitelo, ki je bilo označeno z encimom in se je vezalo na sekundarno protitelo. Encim ob dodatku substrata povzroči barvno reakcijo (slika 5). Intenziteta barvne reakcije je sorazmerna s številom kompleksov primarno protitelo- antigen- sekundarno protitelo- protitelo označeno z encimom. Število teh je odvisno od koncentracije antiga v vzorcu.



Slika 5: Direktna ELISA. (1) primarno protitelo, (2) specifičen antigen se veže na primarno protitelo, (3) sekundarno protitelo se veže na kompleks antigen-primarno

protitelo, (4) protitelo označeno z encimom se veže na sekundarno protitelo, (5) dodatek substrata ob prisotnosti encima povzroči barvno reakcijo (137).

ELISA test smo uporabili za analizo nastajanj IL-17, IFN- γ , IL-4 in IL-10, ki so jih izločile celice T peti oz. šesti dan gojenja. S pomočjo ELISA testa smo analizirali tudi nastajanje IL-12 in IL-10 *in vitro* pridobljenih DC, in sicer po 48 urnem zorenju in po kasnejši 24 urni re-stimulaciji s celicami J558, ki izražajo CD40L.

Pufri za ELISA test

- PBS (pH 7,4)
- pufer za spiranje: 0,05 % Tween v PBS
- pufer za blokado: 3 % BSA v PBS
- substratni pufer (pH 6,0) za TMB: 188,5 mL 0,2 M Na₂HPO₄ (8,9 g Na₂HPO₄·2H₂O v 250 mL destilirane vode) + 121,5 mL 0,1 M C₆H₈O₇·xH₂O (10,5 g C₆H₈O₇·H₂O v 500 mL destilirane vode) + 250 mL destilirane vode
- raztopina za prekinitev reakcije s substratom: 2 M H₂SO₄ (10,8 mL 98 % H₂SO₄ + do 100 mL destilirane vode)

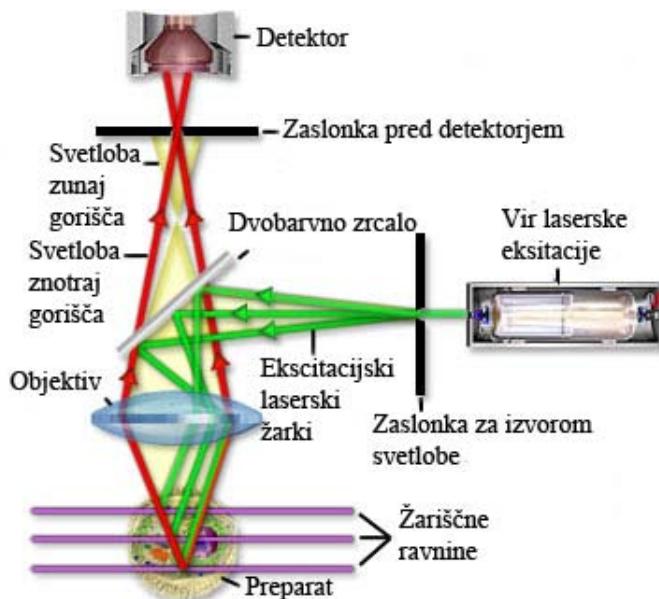
Postopek izvajanja direktnega ELISA testa:

- a. Prekrivanje mikrotiterske ploščice: primarna protitelesa ustrezno redčimo v PBS (5 µg/mL) in v vsako vdolbinico mikrotiterske ploščice odpipetiramo po 50 µL te raztopine ter ploščo prekrijemo s folijo.
- b. Inkubacija poteka čez noč na sobni temperaturi.
- c. Spiranje in osušitev ploščice: z multikanalno pipeto ročno 3-krat speremo z 200 µL vsako vdolbinico plošče s pufrom za spiranje in osušimo.

- d. Blokada: v vsako vdolbinico odpipetiramo po 150 µL pufra za blokado in pokrijemo s folijo. Blokada poteka 30 minut do 2 uri na sobni temperaturi. Nato odstranimo pufer za blokado in ploščico osušimo.
- e. Vezava antigena: za standardno krivuljo pripravimo ustrezzo razredčitveno vrsto v pufru za blokado in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 50 µL standarda. Redčenje gre po formuli 2^n , kar pomeni, da ima vsaka naslednja vdolbinica 2-krat manjšo koncentracijo kot vdolbinica pred njo. Začetna koncentracija je 5 ng/mL. Razredčitveno vrsto pripravimo v prvih dveh stolpcih. Vzorce ustrezzo redčimo s pufrom za blokado in odpipetiramo po 50 µL v vsako vdolbinico. Za kontrole odpipetiramo v vsako vdolbinico po 50 µL pufra za blokado. Ploščo nato pokrijemo s folijo.
- f. Inkubacija poteka 2 uri na 37 °C.
- g. Spiranje in osušitev plošče: z multikanalno pipeto ročno 3-krat speremo z 200 µL vsako vdolbinico plošče s pufrom za spiranje in osušimo.
- h. Vezava sekundarnih protiteles konjugiranih s streptavidinom: sekundarna protitelesa razredčimo s pufrom za blokado (2 µg/mL) in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 50 µL raztopine.
- i. Vezava biotin- hrenova peroksidaza konjugata: z biotinom označeno hrenovo peroksidazo razredčimo s pufrom za blokado (1:1000) in v vsako vdolbinico odpipetiramo po 100 µL raztopine.
- j. Inkubacija poteka 2 uri na 37 °C.
- k. Spiranje in osušitev plošče: z multikanalno pipeto ročno 3-krat speremo z 200 µL vsako vdolbinico plošče s pufrom za spiranje in osušimo.
- l. Reakcija s substratom: TMB redčimo (1:2) s substratnim pufrom s pH 6,0 in odpipetiramo po 100 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 odčitamo na čitalcu absorbanco pri 450 nm.

3.2.6 IMUNOFLUORESCENČNA KONFOKALNA MIKROSKOPIJA

Pri konfokalnem mikroskopu pregledujemo preparat z laserskim žarkom v x,y-točkah določene z-ravnine. Vzbujeno fluorescenčno svetlobo iz posameznih točk sprejme detektor, ki informacije s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Preiskovanje preparata samo v izbrani ravnini z nastavljivo globino omogočata dve zaslонki z zelo majhnima odprtinama. Nameščeni sta v gorišču za lečo objektiva, konfokalno. Prva zaslonka je nameščena za izvorom svetlobe in omogoča osvetljevanje preparata le v izbrani točki v nekem trenutku. Druga zaslonka je nameščena pred detektorjem in prepreči vstopanje fluorescenčne svetlobe, ki izhaja iz območij preparata zunaj gorišča (slika 6). Iz optičnih rezin preparata lahko sestavimo tridimenzionalno sliko tkiva.



Slika 6: Shematski prikaz konfokalnega mikroskopa (138).

1×10^5 nezrelih DC (diferenciranih v prisotnosti/odsotnosti blebbistatina, 10 μM) in zrele DC, ki so zorele dva dni z 20 ng/mL LPS \pm 1000 U/mL IFN- γ (\pm blebbistatin, 10 μM), smo centrifugirali s citospinom 6 minut pri 1000 obratih/minuto na objektna stekla. Celice smo fiksirali 45 minut s 4 % paraformaldehidom in permeabilizirali z 0,1 % Triton X-100 v PBS, pH 7,4, 10 minut. Aktin smo označili s faloidin-tetrametilrodaminom B izocianatnim konjugatom (500 ng/mL), 30 minut pri sobni temperaturi.

Pri analizi aktivacije NF-κB smo stimulirali obdelane ali kontrolne nezrele DC s 25 ng/mL LPS 1,5 ure. Nato smo jih centrifugirali s citospinom 6 minut pri 1000 obratih/minuto. DC smo fiksirali 45 minut s 4 % paraformaldehidom in permeabilizirali z 0,1 % Triton X-100 v PBS, pH 7,4, 10 minut. Nespecifično obarvanje smo preprečili z enourno inkubacijo celic v 3 % BSA v PBS, pH 7,4. NF-κBp65 smo označevali s protitelesom proti NF-κB, konjugiranim z Alexa Fluor 488 1,5 ure v pufru za blokado. Celice smo nato sprali s PBS (100 mL). ProLong Antifade komplet smo uporabili za pritrđitev krovnega stekelca na objektno steklo in pripravo trajnih preparatov. Pri analizi celic s konfokalnim mikroskopom smo si naključno izbrali področja velikosti $10 \mu\text{m}^2$ (ROI, angl. region of interest) znotraj jedra in v citoplazmi. Aktivacijo NF-κB smo določili kot razmerje povprečja fluorescenčne intenzitete ROI jedra in citoplazme.

Fluorescenčno mikroskopijo smo izvedli z uporabo Carl Zeiss LSM 510 konfokalnega mikroskopa. Alexa Fluor 488 ali faloidin-tetrametilrodamin B izocianatni konjugat smo vzbudili z argonskim (488 nm) ali He/Ne (543 nm) laserjem. Uporabili smo emisijske filtre ozkega obsega 505-530 nm in z LP 560 nm. Slike smo analizirali s Carl Zeiss LSM slikovno programsko opremo 3.0.

3.2.7 SNEMANJE CELIC V ŽIVO

Kontrolne in z blebbistatinom tretirane nezrele DC, ki smo jih diferencirali v ploščah z 12 vdolbinicami, smo aktivirali z dodatkom 25 ng/mL LPS \pm 1000 U/mL IFN- γ (\pm blebbistatin, 10 μM). Zorenje celic smo spremljali v 1,5 do 3,5 minutnih intervalih 7 do 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂. Slike so bile posnete z Olympus IX 81 motoriziranim invertnim mikroskopom in Cell® programsko opremo.

3.2.8 STATISTIČNA ANALIZA

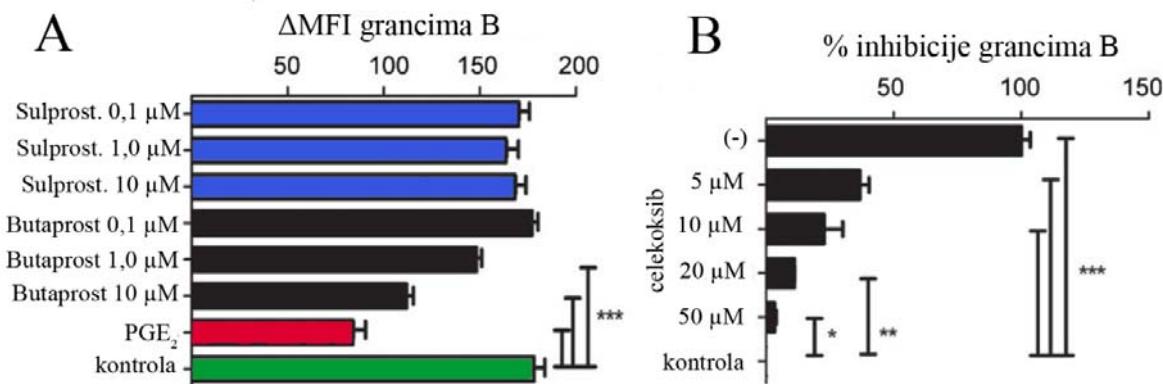
Vsi podatki so bili ovrednoteni s Prism Version 5 programsko opremo (GraphPad) in analizirani s Studentovim t testom (obojestranski), P < 0,05 smo privzeli za signifikantno različne rezultate (P < 0,05 označen *; P < 0,01 označen **; P < 0,001 označen ***).

4 REZULTATI

4.1 IL-12 povrne citolitično funkcijo celic T CD8⁺, ki jo zavre PGE₂ prisoten v mikrookolju raka jajčnikov

PGE₂ direktno zavre izražanje grancima B in popolnoma zavre citolitično funkcijo celic T CD8⁺ (slika 7A). Z zviševanjem koncentracije EP2 agonista (Butaprost) se približujemo učinkom, kot jih ima PGE₂, medtem ko zviševanje koncentracije EP3/1 agonista (Sulprostone) ne zavira izražanje grancima B (slika 7A).

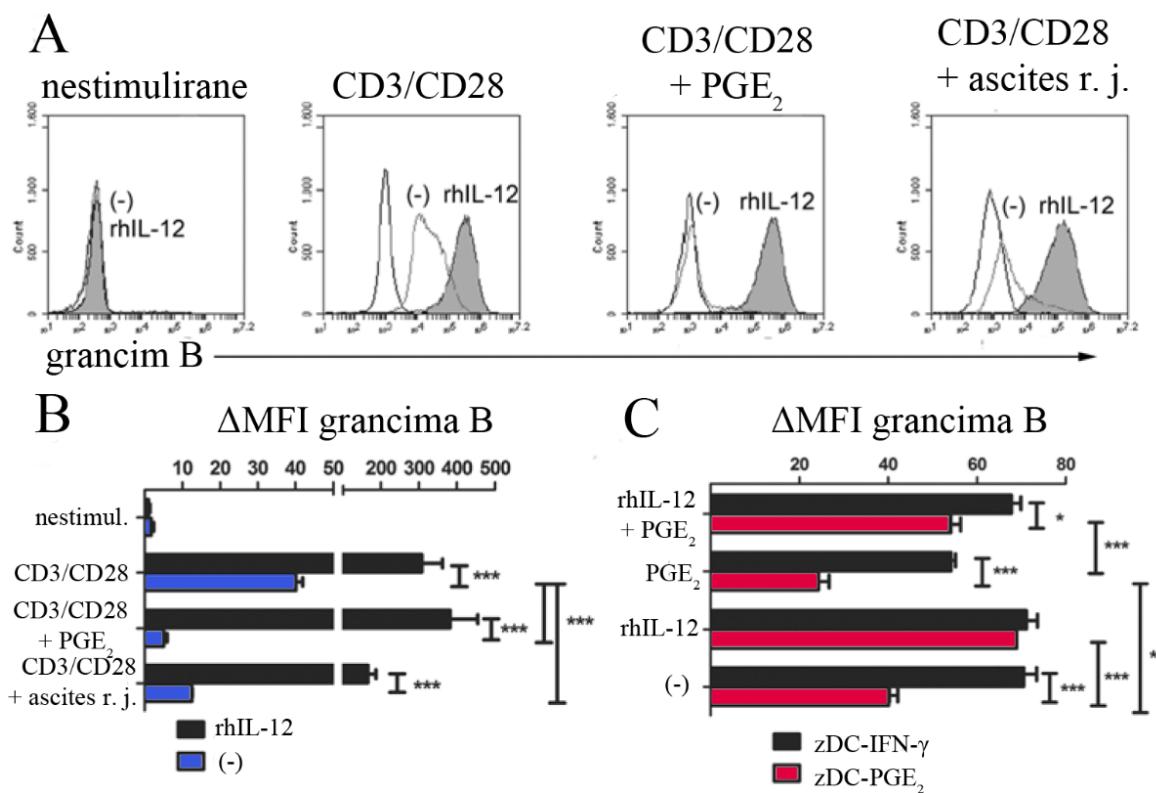
COX2 inhibicija zavre sposobnost kondicioniranega gojišča primarnih celic raka jajčnikov, da zmanjša izražanje grancima B v celicah T CD8⁺, ki so bile aktivirane v tem gojišču (slika 7B). Omenjeno gojišče popolnoma zavre izražanje grancima B, medtem ko zviševanje koncentracije celekoksiba znižuje učinke tega gojišča na zaviranje izražanja grancima B. Pri 50 µM koncentraciji celekoksiba je zaviranje izražanja grancima B še vedno signifikantno različno glede na kontrolne pogoje, vendar je zelo zmanjšano glede na prej omenjeno gojišče brez dodatka celekoksiba (slika 7B).

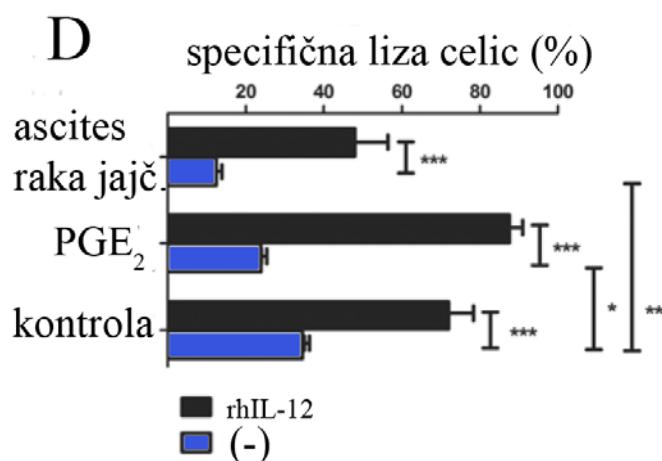


Slika 7: (A) Zaviranje izražanja grancima B na 5. dan aktiviranih celic T CD8⁺ v odsotnosti ali prisotnosti PGE₂, EP3/1 agonista (Sulprostone) ali EP2 agonista (Butaprost). ΔMFI (= MFI(grancim B)/MFI(IgG), angl. mean fluorescence intensity ratio; sprememba intenzitete fluorescence med grancimom B in kontrolo- specifično barvanje za grancim B). Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija. (B) Izražanje

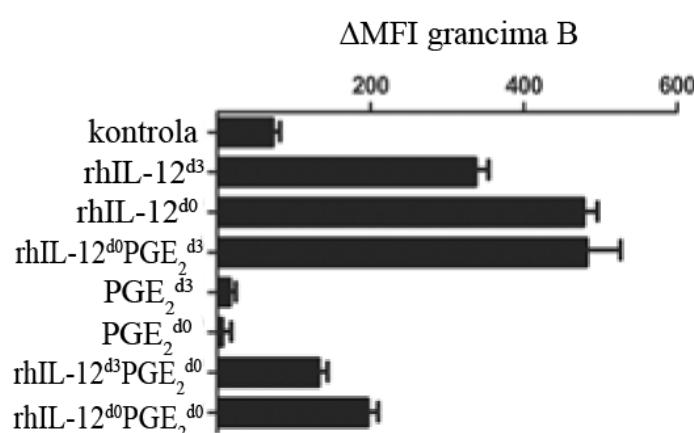
grancima B v celicah T CD8⁺ stimuliranih s proti-CD3/CD28 protitelesi v prisotnosti ali odsotnosti kondicioniranega gojišča, ki smo ga ustvarili z gojenjem celic iz ascitesa raka jajčnikov (N= 4), v odsotnosti ali prisotnosti celekoksiba. Histogram predstavlja zbrane podatke 3 neodvisnih eksperimentov z različnimi darovalci kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

Stimulacija CD3/CD28 molekul celic T CD8⁺ in še posebej INF-γ kot tudi IL-12 so signifikantno povečali izražanje grancima B. Eksogeni rekombinantni IL-12 in IL-12, ki so ga proizvajale ^{IFN-γ}DC (DC, ki so zorene z IFN-γ), je uspešno presegel zaviralne učinke rakavega mikrookolja in eksogenega PGE₂. Posledica tega je bilo povsem povrnilo izražanje grancima B in citolitične funkcije celic T CD8⁺ (slika 8A-D). IL-12 se je tako izkazal v fizioloških pogojih za zelo učinkovitega. Dodatek IL-12 na začetku ali 3. dan petdnevne gojenje celic T CD8⁺ je povečal izražanje grancima B, ki ga je zavrl PGE₂ (slika 9). To nakazuje, da IL-12 poveča proizvodnjo/proliferacijo in citotoksično aktivnost citotoksičnih limfocitov T (139).





aktiviranih celic T CD8⁺ ob dodatku IL-12 in/ali PGE₂ (^{IFN-γ}DC proti ^{PGE₂}DC (DC, ki so zorene s PGE₂)). (D) Citolitični učinki celic T CD8⁺ v prisotnosti ali odsotnosti IL-12. Vse podatke (A-D) smo zbrali iz 3 neodvisnih eksperimentov. Histogrami predstavljajo podatke kot srednjo vrednost ± standardno deviacijo.

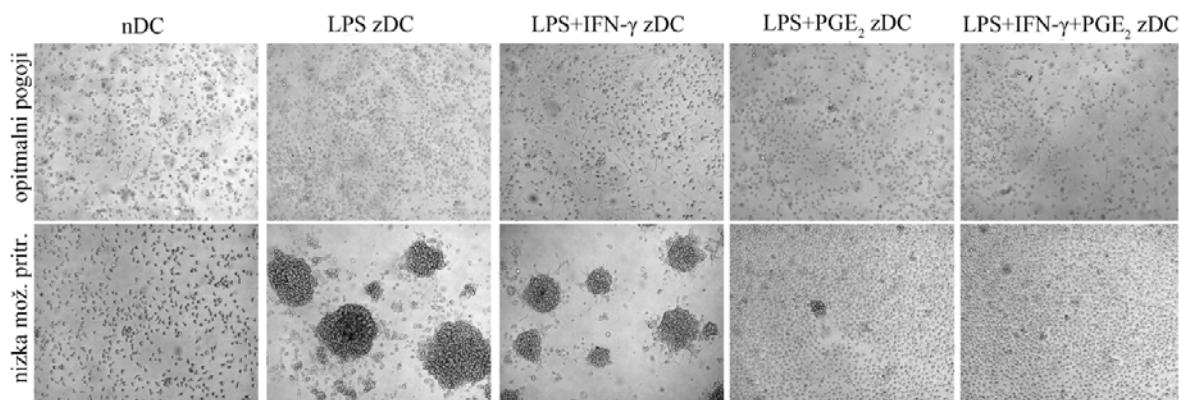


Slika 9: Izražanje grancima B na 5. dan celic T CD8⁺ stimuliranih s proti-CD3/CD28 protitelesi ± PGE₂ in/ali rhIL-12 (dodali smo ga na začetku gojenja (dan 0) ali že rastopčim celičnim T CD8⁺ (3. dan)). Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

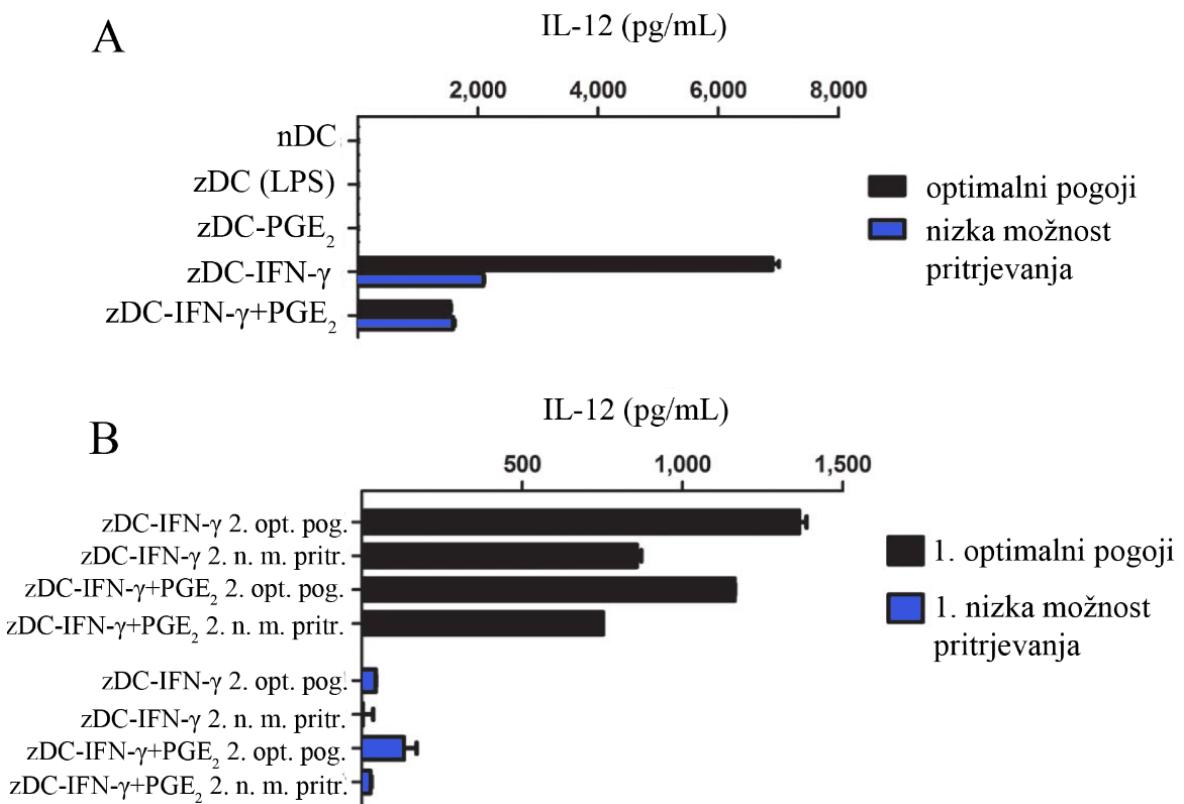
4.2 Nastajanje IL-12 v DC, ki so zorene z INF-γ, je odvisna od pritrjevanja DC preko integrina β₂

DC, zorene v prisotnosti IFN-γ ali PGE₂, se močno razlikujejo v morfologiji (slika 10). Medtem ko so ^{IFN-γ}DC adherentne in morfološko podobne makrofagom, ^{PGE₂}DC interagirajo v celičnih skupkih in se ne pritrjujejo na površino gojilne posode. Razlike v adherentnosti obeh celičnih populacij so nas vodile k preučevanju vpliva pritrjevanja na

funkcijo DC, in sicer na njihovo produkcijo citokinov. V ta namen smo uporabili plošče z nizko možnostjo pritrjevanja. Opazili smo velik vpliv pritrjevanja na morfologijo $^{IFN-\gamma}DC$ in njihovo produkcijo IL-12p70, medtem ko, po pričakovanjih, odsotnost pritrjevanja ni vplivala na morfologijo $^{PGE_2}DC$. Prisotnost dejavnikov, ki inducirajo produkcijo IL-12, kot je IFN- γ , je namreč primarno potrebna za produkcijo IL-12, ne glede na možnost pritrjevanja DC tekom razvoja, ker IFN- γ tudi ob pomanjkanju možnosti pritrjevanja inducira nastajanje IL-12 (slika 11A). Vpliv adhezije smo opazili le v primeru, ko smo DC diferencirali v odsotnosti pritrjevanja, medtem ko kasneje v razvoju DC pritrjevanje ne kaže podobnega vpliva (slika 11B). Tako pritrjevanje ne vpliva na lastnosti DC, ki so bile diferencirane na kontrolni površini in je bilo njihovo pritrjevanje preprečeno le tekom indukcije njihovega zorenja.

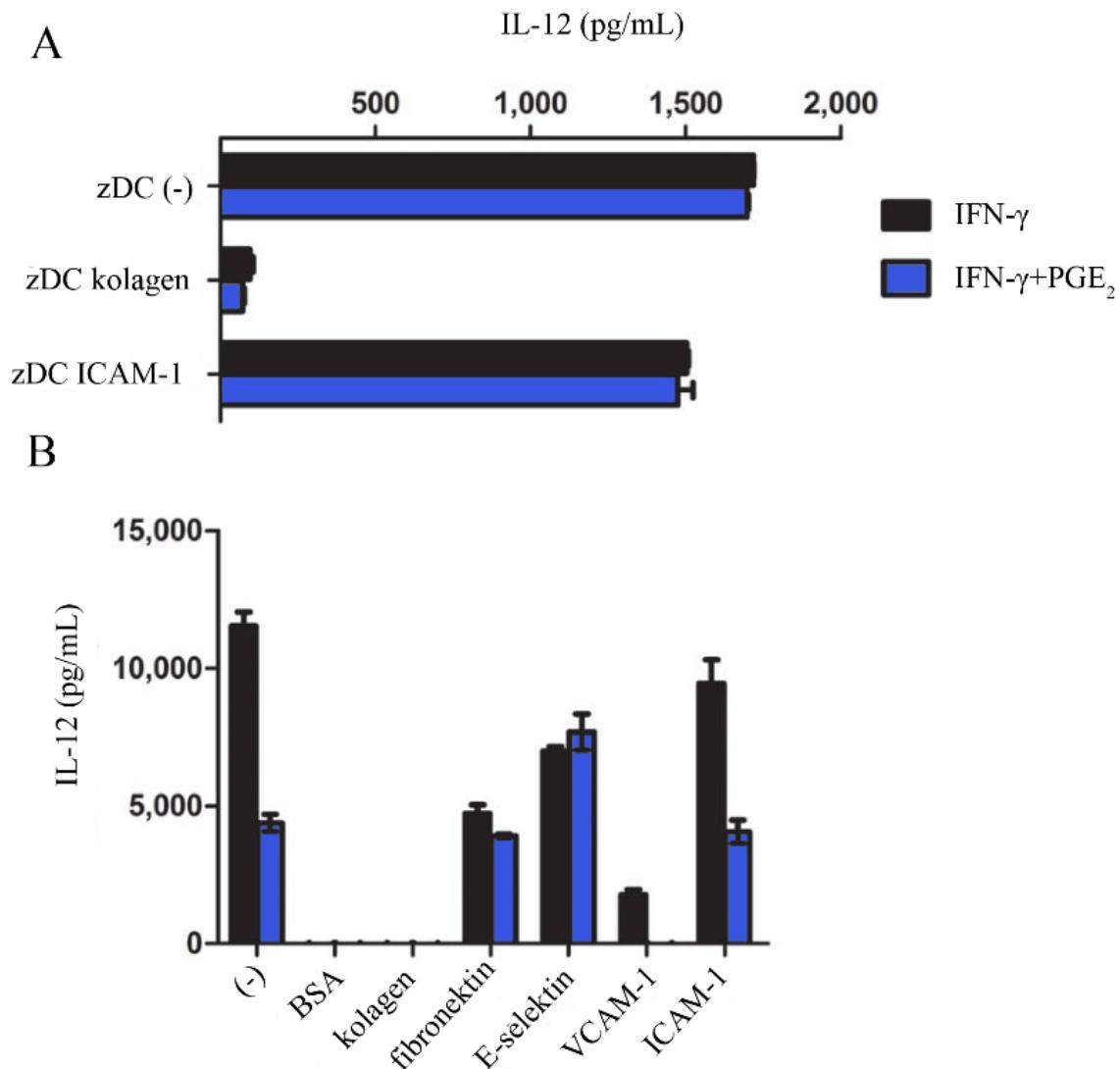


Slika 10: Morfologija DC gojenih na ploščah obdelanih za optimalno gojenje celičnih kultur ter ploščah z nizko možnostjo pritrjevanja. Prvi stolpec predstavlja slike nezrelih DC, ostali stolpci pa predstavljajo zrele DC, ki smo jim vzpodbudili zorenje z raznimi dodatki ali kombinacijami dodatkov.



Slika 11: (A, B) DC smo gojili na ploščah obdelanih za optimalno gojenje celičnih kultur in na ploščah z nizko možnostjo pritrjevanja (1. gojitveno stanje) iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF. Kasneje smo jih prenesli na nove plošče (2. gojitveno stanje) in nadalje vzpodbudili zorenje z LPS. Histograma predstavlja podatke kot srednjo vrednost \pm standardna deviacija.

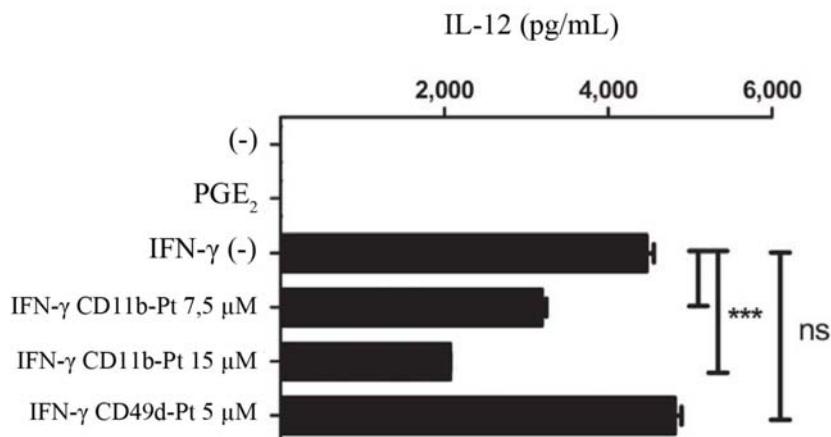
V nadaljevanju smo določali učinke pritrjevanja pri gojenju DC na ploščah, prekritih z različnimi substrati. DC gojene na ploščah prekritih s fibronektinom, E-selektinom ali VCAM-1, so imele zmanjšano produkcijo IL-12, medtem ko je pritrjevanje na BSA ali kolagen popolnoma zavrlo sposobnost DC, da producira IL-12 (slika 12). Podobnih učinkov nismo opazili pri gojenju celic na ploščah prekritih z ICAM-1, kar kaže na pomembnost β_2 integrinske signalizacije na produkcijo IL-12, inducirano z IFN- γ . Poleg tega, dodatek PGE₂ k DC, ki zorijo v prisotnosti IFN- γ , značilno zmanjša produkcijo IL-12p70 le na ploščah prekritih s polistirenom ali ICAM-1. To dokazuje, da PGE₂ prepreči interakcije DC z ICAM-1, ki je substrat β_2 integrinskega receptorja na DC.



Slika 12: (A, B) DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF na ploščah prekritih z BSA, kolagenom, fibronektinom, E-selektinom, VCAM-1 ali ICAM-1. Kasneje smo vzpodbudili zorenje z LPS in IFN- γ ± PGE₂. Histograma predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

V skladu z navedenim, smo uspeli dokazati, da tudi protitelesa proti CD11b (α_M komponenta integrina $\alpha_M\beta_2$) analogno zmanjšajo produkcijo IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$, pri čemer je njihov učinek koncentracijsko odvisen (slika 13). Specifičnost vpliva signalizacije preko β_2 integrinskega receptorja smo dokazali z uporabo protitelesa proti CD49d (α_4

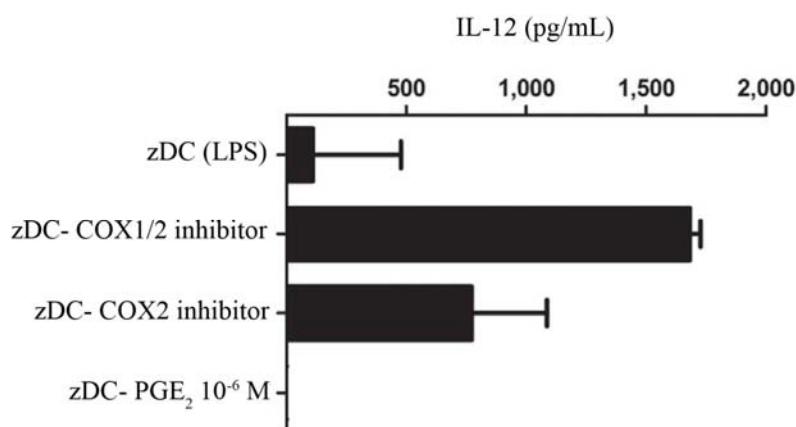
komponenta integrina $\alpha_4\beta_1$), ki ni zmanjšal produkcije IL-12 (slika 13). Integrin β_2 je ključen za produkcijo IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$, medtem ko integrin β_1 nima podobne funkcije.



Slika 13: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF ± protitelesa CD11b (CD11b-Pt) ali protitelesa CD49d (CD49d-Pt). Kasneje

smo vzpodbudili zorenje z LPS v prisotnosti ali odsotnosti PGE₂ ali IFN- γ . Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

Inhibicija sinteze PGE₂ s COX1/2 inhibitorjem tekom diferenciacije monocitov v DC je povečala produkcijo IL-12 v DC (slika 14). Enak učinek je pokazala specifična inhibicija COX2, ki je povečala produkcijo IL-12 (slika 14). Ti rezultati kažejo pomembnost citoskeletalnega preoblikovanja tekom razvoja DC za njihovo kasnejšo zmožnost produkcije IL-12.

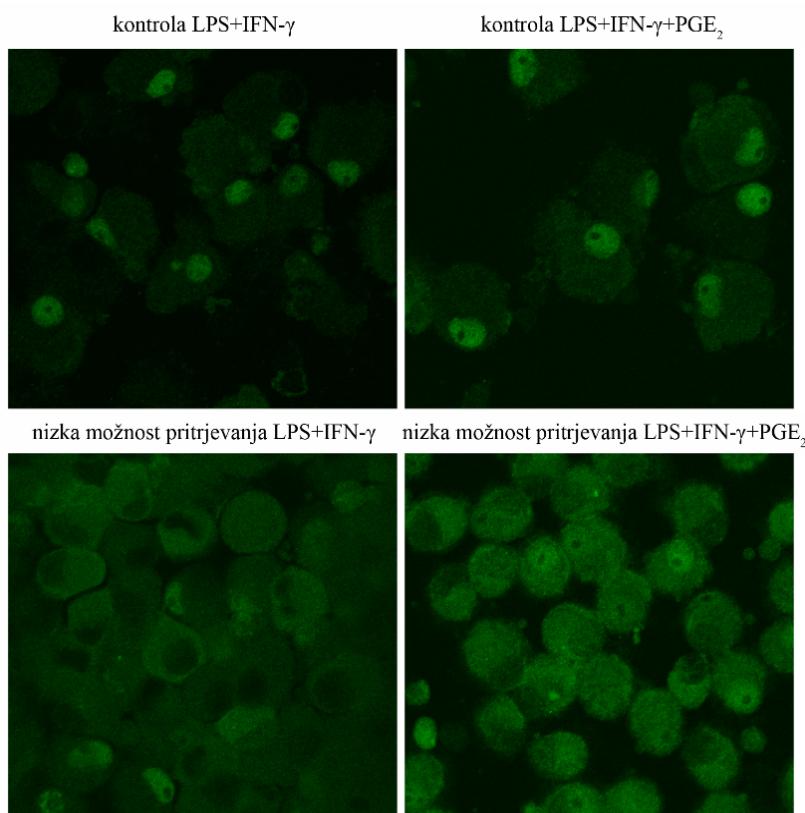


Slika 14: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti COX2 inhibitorja (celekoksib), COX1/2 inhibitorja (indometacin) ali PGE₂. Kasneje smo

vzpodbudili zorenje z LPS. Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

4.3 Adhezija $^{IFN-\gamma}DC$ ne vpliva na aktivacijo Stat-1 in Stat-3, temveč spremeni zmožnost aktivacije NF-κB

Nezmožnost $^{IFN-\gamma}DC$, da bi proizvajale IL-12, je povezana s pomanjkanjem aktivacije NF-κB (slika 15), ne vpliva pa na IFN- γ inducirano aktivacijo Stat-1 in Stat-3 v DC. To potrjuje, da je signalizacijska pot preko NF-κB ključna za nastajanje IL-12 človeških DC po njihovi stimulaciji s CD40L (140).

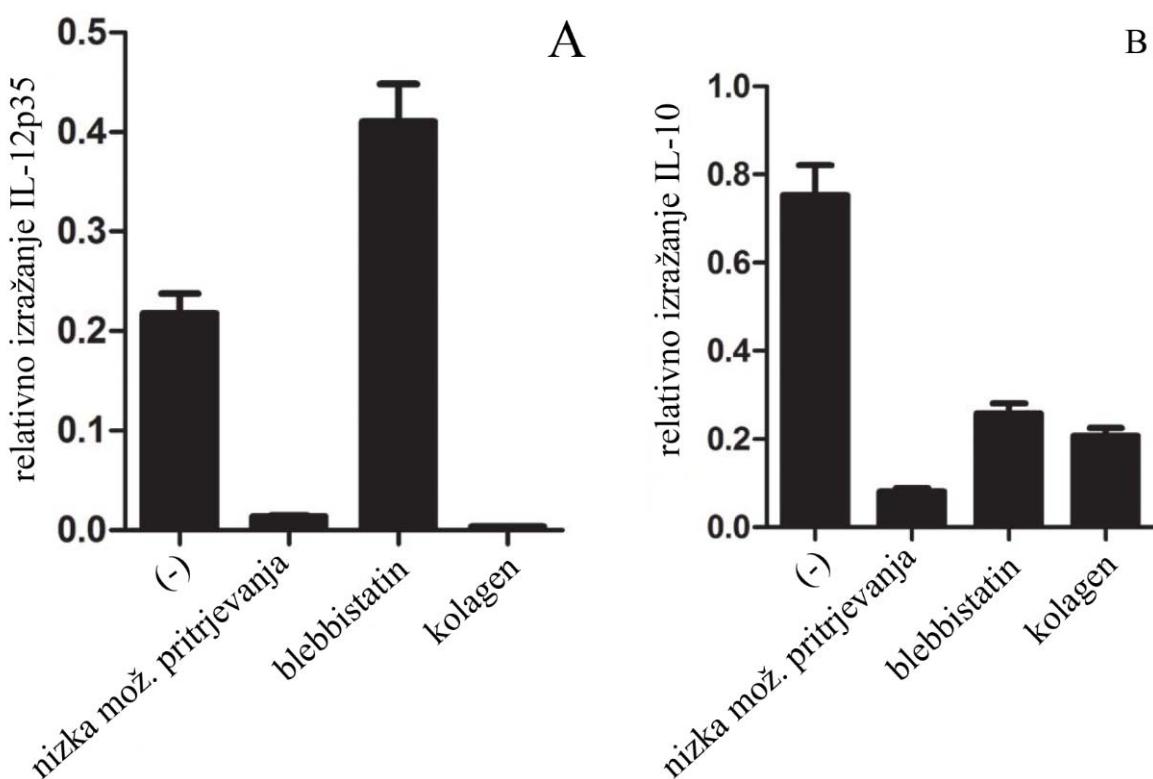


Slika 15: Aktivacija NF-κB posneta z invertnim fluorescenčnim mikroskopom. Slika prikazuje lokalizacijo NF-κB v celicah. Pri kontrolah je očitno NF-κB aktiviran, ker je prisoten v jedru, kamor se prestavi ob aktivaciji iz citoplazme. Pri odsotnosti adhezije ne pride do aktivacije NF-κB in le-ta ostane v citoplazmi.

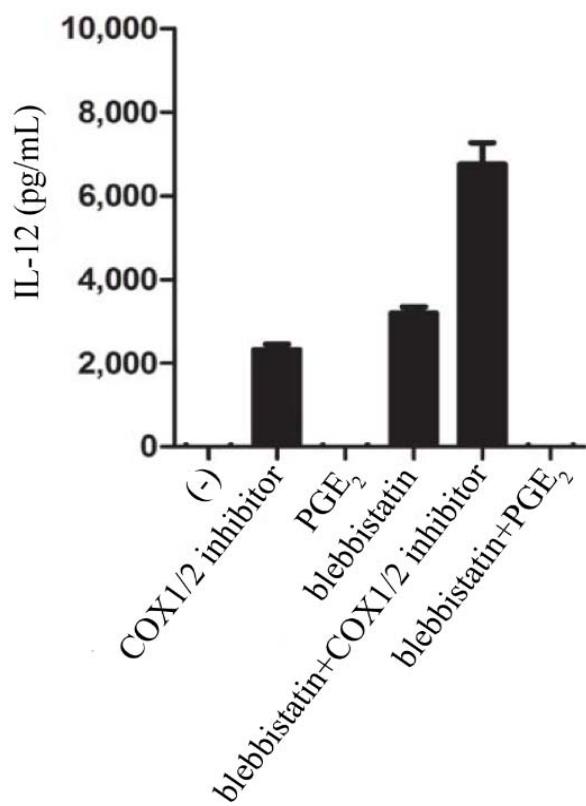
4.4 Producijo IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$ uravnava miozin II

Dodatek blebbistatina diferencirajočim DC, je povečal produkcijo IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$ (slika 16A). Vpliv blebbistatina je bil specifičen za IL-12 in ni značilno vplival na produkcijo IL-10 teh celic (slika 16B). Hkrati je blebbistatin, dodan diferencirajočim DC, ki so bile gojene na ploščah z nizko adhezivnostjo, rešil sposobnost produkcije IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$. Dodatek PGE₂ blebbistatinu je izničil učinke slednjega ter preprečil produkcijo IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$.

γ DC (slika 17). Kombinacija blebbistatina in COX1/2 inhibitorja pa je sinergistično povečala nastajanje IL-12 \pm IFN- γ DC (slika 17). Iz navedenega lahko sklepamo, da PGE₂ preseže učinke blebbistatina in jih izniči, obratno pa dodatek COX1/2 inhibitorja poveča učinke blebbistatina. Naši rezultati tako nasprotujejo trditvi, da blebbistatin blokira izgubo podosomov zaradi PGE₂ (127). Potrdili smo, da blebbistatin nasprotuje učinkom PGE₂ preko inhibicije miozina II (127), vendar v naših poskusih sam ni uspel preseči učinkov PGE₂.

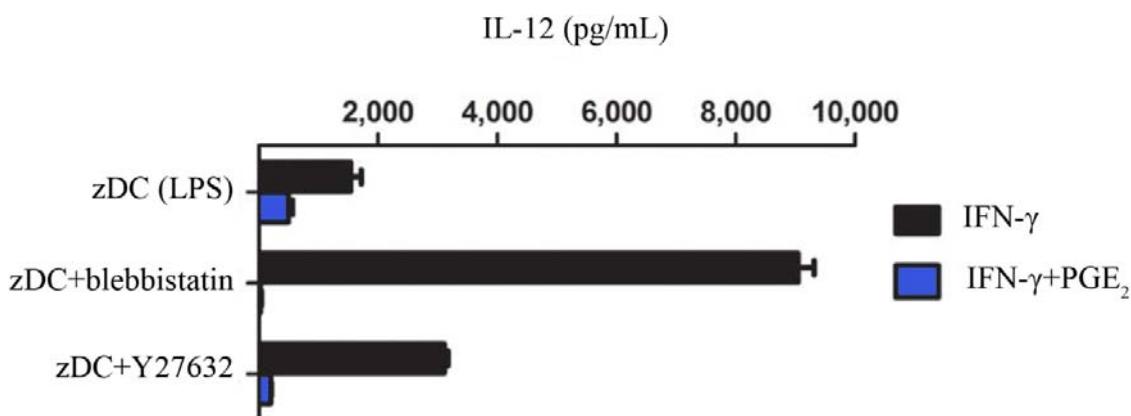


Slika 16: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti blebbistatina na ploščah z nizko možnostjo pritrjevanja ali na ploščah prekritih s kolagenom. Kasneje smo jih za 6 ur stimulirali z LPS \pm IFN- γ . Prikazano je relativno izražanje IL-12p35 (A) in IL-10 (B). Histograma predstavlja podatke kot srednjo vrednost \pm standardna deviacija.



Slika 17: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti COX1/2 inhibitorja, PGE₂, blebbistatina ali v kombinacijah blebbistatin ± COX1/2 ali PGE₂. Kasneje smo jim vzpodbudili zorenje z LPS. Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

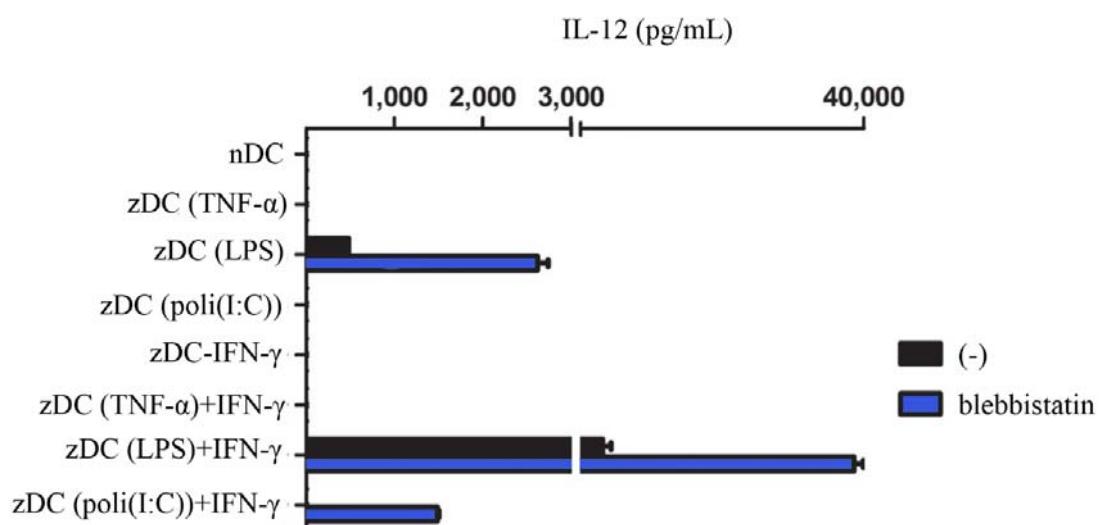
Ključna regulatorja adhezije, ki uravnava od miozina II odvisno krčljivost, sta RhoA in Rho-kinaza (ROCK). RhoA je majhna GTPaza Rho družine, Rho-kinaza pa je efektor Rho (141). Y-27632, ki je inhibitor ROCK, podobno kot blebbistatin učinkovito poveča nastajanje IL-12, pri čemer so učinki slednjega močnejši. V nasprotju pa ML-9, ki je inhibitor miozinske lahko-verigne kinaze (MLCK), ni induciral podobnih učinkov (slika 18).



Slika 18: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti blebbistatina ali ROCK inhibitorja (Y27632). Kasneje smo vzpodbudili zorenje z LPS in IFN- γ ± PGE₂. Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

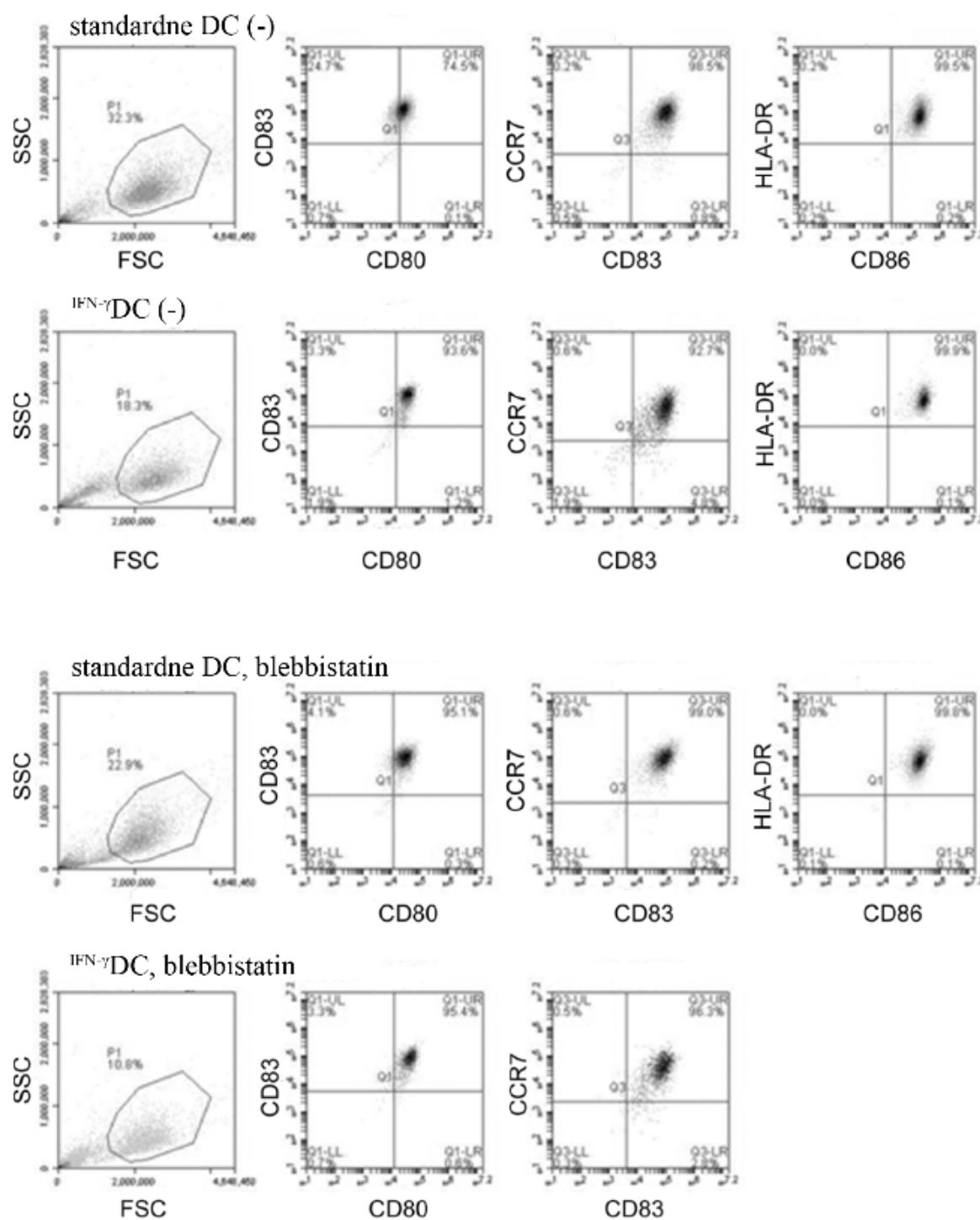
4.5 Inhibicija miozina II tekom razvoja DC omogoči stabilno povečano produkcijo IL-12 ^{IFN- γ} DC (pri nadaljni stimulaciji s CD40L)

Zorenje smo inducirali z LPS, TNF- α ali poli(I:C). Medtem ko TNF- α ni sprožil stabilne produkcije IL-12 tudi ob prisotnosti IFN- γ in blebbistatina, so s poli(I:C) zorene DC producirale IL-12 v primeru prisotnosti obeh, tako INF- γ in blebbistatina tekom razvoja DC (slika 19). Zorenje DC z LPS je sprožilo produkcijo IL-12 v DC, tudi ob njihovi kasnejši re-stimulaciji. Producija IL-12 se je zelo povečalo tako ob prisotnosti IFN- γ , zlasti pa ob sočasni prisotnosti IFN- γ in blebbistatina (slika 19). Inhibicija miozina II v diferencirajočih monocitih torej močno poveča sposobnost ^{IFN- γ} DC, da stabilno proizvajajo velike količine IL-12 (pri kasnejši stimulaciji s CD40L).



Slika 19: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti blebbistatina. Kasneje smo jim vzpodbudili zorenje s TNF- α , LPS, poli(I:C) ± IFN- γ . Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

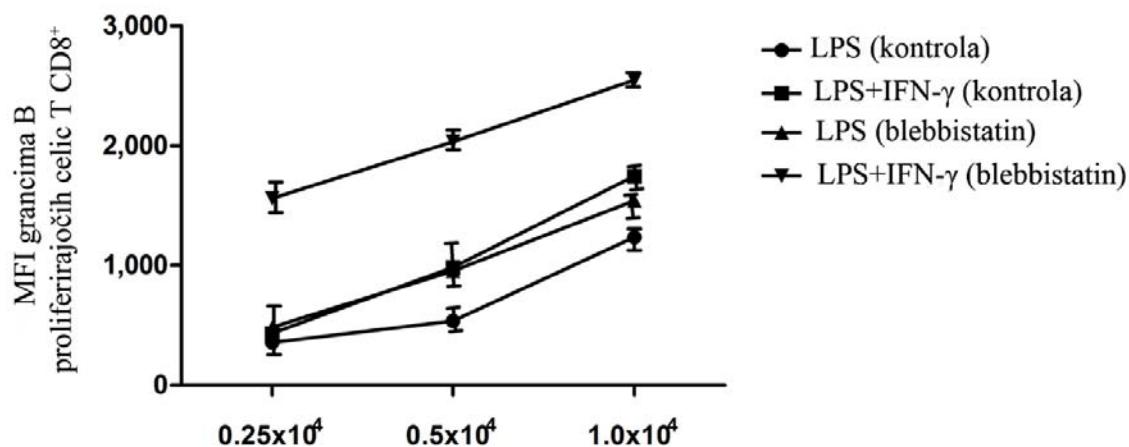
Učinek inhibicije miozina II na značilnosti nastalih DC je izredno specifičen, saj v nasprotju močnega uravnavanja lastnosti produkcije IL-12, inhibicija miozina II ne vpliva na fenotipske spremembe DC. Inhibicija miozina II ni niti povišala niti inhibirala izražanje CD83, ki je označevalec zrelih DC in tudi ne ravni izražanja kostimulatornih molekul CD80 in CD86 ter HLA-DR, ki je antigen predstavitevna molekula PHK-II (slika 20).



Slika 20: Reprezentativno barvanje DC in $^{IFN-\gamma}DC$, ki smo jih gojili v prisotnosti ali odsotnosti blebbistatina. Blebbistatin ne vpliva na izražanje površinskih kazalcev zoritvenega statusa DC (torej na stopnjo zrelosti DC), vendar ima specifičen vpliv na produkcijo citokinov.

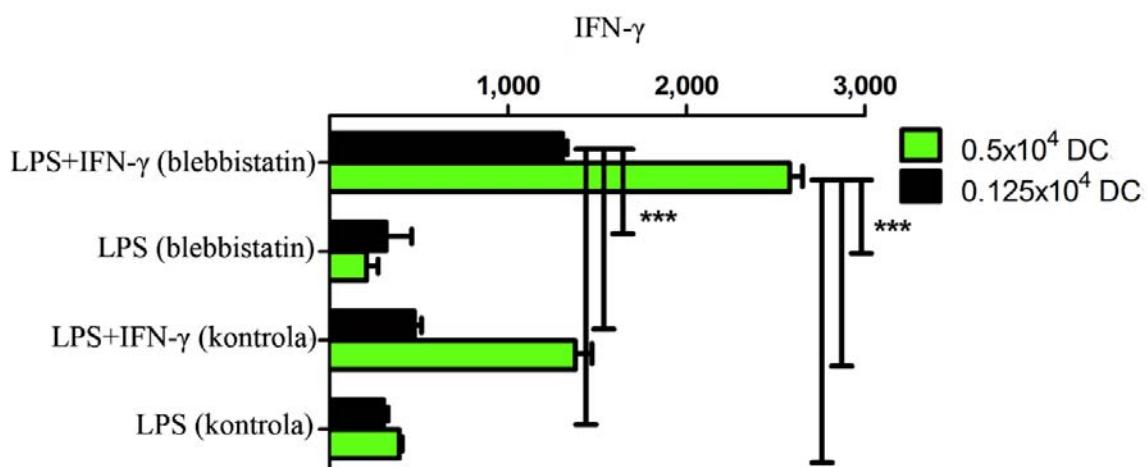
4.6 Stabilna produkcija velikih količin IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$, ki jo povzroči inhibicija miozina II, sproži učinkovite T_H1 odzive in stimulira funkcije citotoksičnih limfocitov T

$^{IFN-\gamma}DC$ stabilno proizvajajo velike količine IL-12 pri restimulaciji ob interakciji z limfociti, kljub odsotnosti IFN- γ ter vplivajo na T-celični odziv pri srečanju z naivnimi celicami T. Z inhibicijo miozina II inducirana produkcija velikih količin IL-12 $^{IFN-\gamma}DC$, je izrazito inducirala visoko izražanje grancima B v naivnih celicah T CD8⁺ (slika 21).



Slika 21: DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti blebbistatina. Zorenje smo vzpodbudili z LPS ± INF- γ . Graf predstavlja srednjo vrednost intenzitete fluorescence grancima B v odvisnosti od števila DC in pogojev zorenja DC.

Stabilne DC, ki proizvajajo velike količine IL-12, ki promovirajo T_H1 odziv in, ki promovirajo odziv citotoksičnih limfocitov T, imajo pomembne klinične učinke. Te DC inducirajo terapevtski T_H1 odziv in sproščanje velikih količin grancima B citotoksičnih limfocitov T pri raku. Dokazali smo, da z inhibicijo miozina II inducirane ^{IFN-γ}DC, ki proizvajajo velike količine IL-12, inducirajo produkcijo velikih količin IFN-γ tudi v limfocitih raka jajčnikov (slika 22), kar nakazuje njihov močan terapevtski potencial kot cepiva proti raku.

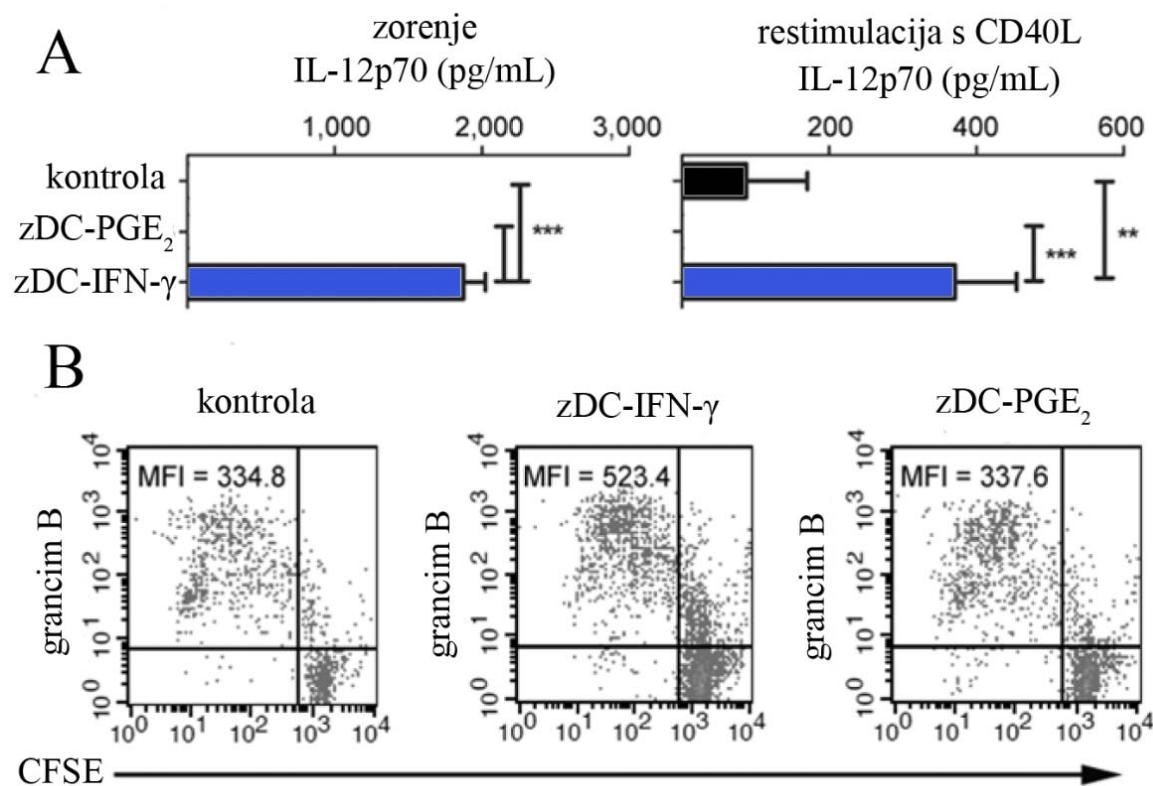


Slika 22: Limfocite raka jajčnikov smo vzpodbudili z različnimi DC. DC smo gojili iz monocitov v prisotnosti IL-4 in GM-CSF in v odsotnosti ali prisotnosti blebbistatina. Zorenje smo vzpodbudili z LPS ± INF-γ. Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija.

4.7 Stimulacijski potencial ^{IFN-γ}DC pridobljenih iz monocitov, izoliranih iz mikrookolja raka jajčnikov

Prisotnost IFN-γ inducira produkcijo IL-12p70 v DC, pridobljenih iz monocitnih celic izoliranih iz supresivnega rakavega mikrookolja, medtem ko odsotnost IFN-γ ali prisotnost PGE₂ tega ne povzroča (slika 23A- levo). Restimulacija s CD40L inducira nastajanje IL-12p70 v DC, pridobljenih iz monocitov izoliranih iz supresivnega rakavega mikrookolja, vendar je nastajanje IL-12p70 signifikantno večje ob prisotnosti IFN-γ, medtem ko, po

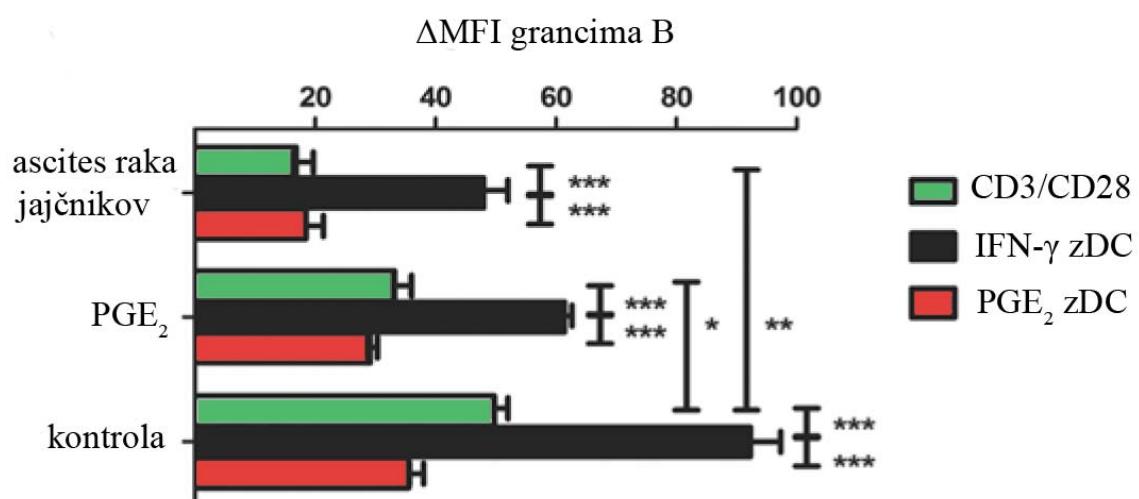
pričakovanjih, nastajanja IL-12p70 ni ob prisotnosti PGE₂ (slika 23A- desno). ^{IFN-γ}DC so signifikantno bolj učinkovite, pri indukciji izražanja grancima B v celicah T CD8⁺, v primerjavi s kontrolnimi ali ^{PGE2}DC (slika 23B).



Slika 23: Nastajanje IL-12p70 v kulturah iz celic CD14⁺, ki smo jih izolirali iz ascitesa raka jajčnikov in smo jim omogočili 48-urno zorenje (A- levo) ali smo jim omogočili 24-urno restimulacijo s celicami J558, ki izražajo CD40L (A- desno). Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost ± standardna deviacija. (B) Stimulacija celic T CD8⁺ s kontrolnimi DC, ^{PGE2}DC ali ^{IFN-γ}DC (celice CD14⁺ smo izolirali iz periferne krvi zdravih darovalcev). Podatke smo pridobili iz 3 neodvisnih eksperimentov.

4.8 Terapevtski potencial $\text{IFN-}\gamma\text{DC}$: povečana citotoksična funkcija celic T CD8^+ izoliranih iz mikrookolja raka jajčnikov

Aktivacija celic T CD8^+ z $\text{IFN-}\gamma\text{DC}$ je sprožila izražanje visokih vrednosti grancima B v primerjavi z aktivacijo s proti-CD3/CD28 protitelesi ali PGE_2DC (slika 24). Celice T CD8^+ aktivirane z $\text{IFN-}\gamma\text{DC}$ v okolju raka jajčnikov ali ob prisotnosti PGE_2 niso imele zmanjšane produkcije grancima B (slika 24).



Slika 24: Proti-CD3/CD28 protitelesa in zrele DC, ki smo jih zorili v prisotnosti PGE_2 ali $\text{IFN-}\gamma$, smo uporabili za stimulacijo celic T $\text{CD8}^+ \pm$ ascites raka jajčnikov ali PGE_2 . Stimulirane celice T CD8^+ z $\text{IFN-}\gamma\text{DC}$ vzpodbudijo visoko izražanje grancima B in preprečijo zaviranje izražanja grancima B v celicah T CD8^+ s strani ascitesa raka jajčnikov ali PGE_2 v primerjavi s proti-CD3/CD28 protitelesi ali PGE_2DC . Histogram predstavlja podatke kot srednjo vrednost \pm standardna deviacija.

5 RAZPRAVA

Za proliferacijo naivnih celic T CD8⁺ in nastanek CTL so potrebni trije signali. V diplomski nalogi smo se osredotočili na signal 3, ki ga omogočajo citokini. IL-12 zagotovi signal 3 citotoksičnim limfocitom T, tako *in vitro* (142), kot tudi *in vivo* (143, 144). Signal 3 zagotovi masivno klonsko ekspanzijo celic T CD8⁺, razvoj njihovih efektorskih funkcij in vzpostavitev dolgo živeče spominske populacije. Tako smo dokazali in potrdili, da IL-12 presega zaviralne učinke okolja raka jajčnikov ali PGE₂ na imunski odziv in povrne citolitično funkcijo celic T CD8⁺ s tem, da povrne izražanje grancima B.

Tumorsko okolje raka jajčnikov lahko zavira imunski odziv celic T CD8⁺ prek vseh treh signalov. Z nastanjem topnih dejavnikov, kot so IL-10, TGF-β, VEGF (140, 141), PGE₂ in drugih, vpliva na signal 3 in deluje zaviralo na imunski odziv.

PGE₂ je ključen naravni varovalni element, ki omejuje imunsko hiperaktivacijo in preprečuje samouničenje zdravega, zdravljenega ali razvijajočega tkiva. Vendar pa je PGE₂ eden glavnih krivcev za imunsko disfunkcijo pri raku, kroničnem vnetju in kroničnih infekcijah. Izakazalo se je, da je PGE₂ najbolj pomemben dejavnik v tumorskem okolju, ki zavira citolitične funkcije celic T CD8⁺ in povzroča napredovanje tumorja. Ugotovili smo, da zaviranje poteka preko EP2 receptorja. Preko omenjenega receptorja deluje kot agonist. PGE₂ ima velik vpliv na imunske celice v tumorju, kot je inhibicija funkcij APC (145), spremjanje ravnotežja IL-10 in IL-12 (146) in promoviranje zaviranja efektorskih celic. Rezultati v diplomski nalogi predstavljajo, da mikrookolju raka jajčnikov primanjkuje provnetnih signalov in prevladuje protivnetno okolje, ki ga nadzira PGE₂. PGE₂ zmanjšuje produkcijo IL-12 v DC in tako vodi razvoj celic T CD4⁺ v T_H2 namesto v T_H1 imunski odziv. Poleg tega, pod vplivom PGE₂ nastajajo T_{reg} iz celic T in tudi preusmeri razvoj DC v MDSC. Z dodatkom COX1/2 in COX2 inhibitorjev zmanjšamo zavirale učinke PGE₂.

Za preseganje zaviralnih učinkov PGE₂ se kaže bistvena tudi prisotnost IL-12, in sicer dodatek eksogenega IL-12, kot tudi IL-12 IFN-γDC. IL-12 preseže zavirale učinke tumorskega okolja in povrne citolitično funkcijo celic T CD8⁺. Rezultati diplomske naloge so pokazali, da lahko na različne načine zagotovimo nastajanje IL-12 v zrelih DC. To lahko dosežemo preko inhibicije miozina II in preko inhibicije ROCK (manjše količine IL-

12 kot pri inhibiciji miozina II) tekom diferenciacije DC. Vendar ob prisotnosti PGE₂ omenjena načina nista učinkovita, ker slednji presega njuna učinka. Lahko pa ob prisotnosti PGE₂ z inhibicijo COX2 dosežemo, da zrele DC proizvajajo IL-12. Vsekakor je za nastajanje IL-12 v DC najpomembnejši dejavnik IFN- γ . Tako je ob ustrezni adheziji tekom diferenciacije DC (inhibicija miozina II) in dodatku IFN- γ tekom zorenja DC še povečano nastajanje IL-12 v DC. IL-12 je torej sposoben povrniti citolitično funkcijo celic T CD8⁺ in vodi razvoj celic T CD4⁺ v T_H1 imunski odziv, ki promovira zavnitev tumorja (147, 148).

Lastnosti DC oblikujejo torej po eni strani signali topnih dejavnikov v okolju, ki vplivajo na sam nastanek in zorenje DC, hkrati pa tudi morfološke spremembe, ki spremeljajo ta razvoj. V diplomski nalogi prikazujemo, da miozin II povezuje prirojeno in pridobljeno imunost z oblikovanjem signala 3. Vpliv na signal 3 preko miozina II je povezan z adhezijo v zgodnjih fazah razvoja DC, tj. pri diferenciaciji DC. Signal 3 namreč sestavlja signali citokinov, ki jih proizvajajo DC, in vpliva na razvoj in aktivacijo posamezne vrste celic T. Miozin II regulira produkcijo IL-12 v DC in s tem oblikuje imunski odziv T_H celic ter limfocitov T CD8⁺.

Adhezija in migracija celic uravnavata aktomiozinske morfološke spremembe ter citoskeletalno preoblikovanje in sta neposredno povezani s signali dejavnikov v okolju (citokini, mikrobi, itd.), ki jih tekom svojega razvoja prejmejo DC. Monociti migrirajo čez endotelij v smeri lumna. Izpostavljenost monocitov endoteliju pri tej migraciji je ključnega pomena za diferenciacijo v DC (149). Monociti kontinuirano migrirajo iz krvi v periferna tkiva z uporabo β_2 integrinov (CD18) (150) in CD31 (151). Z rezultati diplomske naloge smo potrdili, da pri migraciji monocitov in nezrelih DC poteka pritrjevanje prav z uporabo β_2 integrinov. V nasprotni smeri pa transmigrirajo skozi endotelij preko funkcionalnega P-glikoproteina (MDR-1) (152). Nasprotno transmigrirajoče celice lahko pozneje z ustrezno stimulacijo dozorijo v DC. Medtem ko so stimulacijski dejavniki, ki so potrebni za zorenje DC, v veliki meri raziskani, pa je vpliv adhezijskih signalov tekom procesa transmigracije monocitov za razvoj DC nepoznan. Nedavne objave poudarjajo pomembnost signalov, ki izvirajo iz citoskeletalnega preoblikovanja, za kasnejšo lastnost DC na razvoj celic T_H1, T_H2 ali T_H17. Rezultati v diplomski nalogi kažejo pomembnost pritrjevanja monocitov preko integrinov β_2 tekom diferenciacije DC. Monociti in nezrele DC se na plastiko pritrjujejo s podosomi preko Mac-1 integrinskega receptorja. Odsotnost pritrjevanja, ki je bila

posledica prisotnosti PGE₂, je povzročila pomanjkanje produkcije IL-12 v DC. PGE₂ in cAMP inducirata motnjo citoskeletne dinamike posredovano z raztplavljanjem podosomov in struktur fokalnih adhezij (127). Dodatek PGE₂ zmanjša tudi produkcijo IL-12 DC, ki zorijo v prisotnosti IFN- γ , in sicer le na ploščah prekritih s polistirenom ali ICAM-1. To je dokaz, da PGE₂ preprečuje pritrjevanje preko β_2 integrinskega receptorja, saj se podosomi adherirajo na ICAM-1 preko CD18. Proces pritrjevanja pa je ključen le tekom diferenciacije DC, saj pritrjevanje med zorenjem nima vpliva na lastnost DC, katere so imele nemoteno pritrjevanje tekom diferenciacije.

Citoskeletalno preoblikovanje ima torej velik vpliv na to, kakšne citokine bodo proizvajale DC. Ti citokini nadalje vplivajo na razvoj T celičnega odziva, ki gre lahko v T_H1, T_H2 ali T_H17 imunski odziv ali pa vodi v razvoj T_{reg}, ki zavirajo imunski odziv. Vnetje in rak preko sprememb v izražanju adhezijskih molekul ter preoblikovanja strukture zunajceličnega matriksa vplivata na citoskeletalno preoblikovanje. Rezultati v diplomski nalogi kažejo, da pomembno vlogo pri tem procesu igra tudi molekula, ki je pogosto prisotna v povečanih količinah pri raku, in sicer PGE₂. Za PGE₂ je bilo pokazano, da razaplja podosome in povzroča odsotnost adhezije. Tvorbo PGE₂ lahko zaviramo z dodatkom COX1/2 ali COX2 inhibitorja. Na adhezijo in za nas ustrezeno citoskeletalno preoblikovanje lahko vplivamo tudi s specifičnimi zaviralci signalizacijskih poti, ki so vključene v proces adhezije, kot je inhibitor miozina II, blebbistatin. Blebbistatin preko inhibicije miozina II uravnava adhezijo. Njegovo delovanje spreminja PGE₂. Dodatek COX1/2 ali COX2 inhibitorja ob prisotnosti blebbistatina sinergistično poveča produkcijo IL-12^{IFN- γ} DC.

IL-12 preko povečane produkcije IFN- γ celic T CD4⁺ in povečanega T_H1 imunskega odziva posredno in hkrati neposredno povrne citotoksičnost celic T CD8⁺. Rezultati v diplomski nalogi kažejo, da rakavo okolje in PGE₂ zavirata izločanje grancima B in povzročata zmanjšanje ali odsotnost citotoksičnosti celic T CD8⁺. IL-12, ki ga izločajo DC zmanjša zaviralne učinke PGE₂ in rakavega okolja in povrne izločanje grancima B celic T CD8⁺. Enak učinek ima tudi IFN- γ T_H1 celic, ki poveča izražanje grancima B. Bistvena je povezava med IL-12 in IFN- γ , saj prisotnost IFN- γ pri zorenju DC poveča produkcijo IL-12 DC in IL-12 inducira produkcijo IFN- γ ter tako tvorita pozitivno povratno zanko, ki omogoča protitumorsko imunost.

Rezultati diplomske naloge kažejo velik potencial cepiv na osnovi DC, ki izločajo visoke količine IL-12, pri pacientkah z rakom jajčnikov. To lahko pripisemo učinkom IL-12, da zviša citolitično delovanje celic T CD8⁺, ki ga zniža rakovo okolje. Rak jajčnikov je oblika raka, ki izkazuje izrazit pomen imunske komponente pri napredovanju bolezni, zato lahko sklepamo, da ima povrnitev citolitične funkcije celic T CD8⁺ s signaliziranjem preko IL-12 bistven vpliv na regresijo bolezni, kar bodo pokazale klinične študije. Pomembno je, da se zavedamo pomena sočasnega zaviranja raznih dejavnikov rakavega okolja, kot je PGE₂, ki očitno zavirajo učinke celičnih terapij in pri načrtovanju bodočih cepiv vključimo obe komponenti protitumorske terapije.

Poleg tega rezultati diplomske naloge kažejo na pomen regulacije procesa adhezije za optimiranje cepiv na osnovi DC kot protitumorske terapije. Predstavljeni rezultati kažejo na pomembnost vpletenosti adhezije/migracije mieloidnih prekurzorskih celic na kasnejšo produkcijo citokinov razvitih in zrelih DC. Prilagajanje adhezije/migracije je pomembno predvsem v začetnih fazah razvoja DC. Nadaljnje študije bodo pojasnile mehanizme signaliziranja pri citoskeletalnem preoblikovanju med razvojem DC in s tem njihov vpliv na signal 3. Le-ta je bistven za regulacijo imunskih odzivov, s katerimi lahko zdravimo raka, infekcije, alergije ali avtoimunske bolezni.

6 SKLEP

S pridobljenimi rezultati smo potrdili našo hipotezo, da adhezija med diferenciacijo DC vpliva na proizvajanje IL-12, medtem ko se je izkazalo, da adhezija kasneje pri zorenju DC nima pomembnega vpliva na produkcijo IL-12. Adhezija in transendotelijski prehod sta bistvena pri migraciji monocitov in nezrelih DC v tkiva in bezgavke tekom procesa diferenciacije in zorenja.

Hkrati smo potrdili hipotezo, da miozin II vpliva na adhezijo/odlepljanje in proces aktomiozinske signalizacije za produkcijo IL-12 DC. Z dodatkom blebbistatina, ki je inhibitor miozina II, smo regulirali adhezijo/odlepljanje DC in posledično proizvajanje IL-12. Vpliv blebbistatina je bil specifičen za IL-12 in ni imel značilnega vpliva na IL-10. Poleg tega smo še pokazali, da je za produkcijo IL-12 ključen integrin β_2 , medtem ko integrin β_1 nima podobne funkcije.

Z rezultati smo dokazali, da IFN- γ in PGE₂ vplivata na adhezijo/odlepljanje preko miozina II. Za PGE₂ je značilno raztavljanje podosomov, in sicer preko integrina β_2 , kar se je izkazalo ob dodatku PGE₂ IFN- γ DC na ploščah prekritih z ICAM-1. PGE₂ deluje preko miozina II in izniči učinke blebbistatina ter preko teh signalizacijskih poti zmanjšuje produkcijo IL-12 DC. Mehanizmi, preko katerih deluje PGE₂, nasprotujejo učinkom IFN- γ , kar potrjuje, da je njuno delovanje povezano z regulacijo miozina II.

Za zaključek lahko povzamemo, da inhibicija miozina II v diferencirajočih monocitih močno poveča sposobnost IFN- γ DC, da stabilno proizvajajo velike količine IL-12, zato bi lahko bile primerne kot celična cepiva za terapevtske namene v primerih, ko je imunski odziv zavrt, in sicer pri rakavih obolenjih.

7 LITERATURA

1. Lanzavecchia A: Identifying strategies for immune intervention. *Science* 1993; 260: 937-944
2. Schwartz RH: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-1356
3. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Health WR: Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature* 1998; 393:478-480
4. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
5. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal M, Liu YJ: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183-1186
6. Vozelj M: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 36-254
7. <http://www.uni-ulm.de/expane/images/dendritic.jpg>, povzeto junija 2012
8. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM: Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 479-488
9. Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M: Langerhans cells transport *Leishmania* major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 1595-1601
10. Reis e Souza C, Stahl PD, Austyn JM: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 509-519
11. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ: Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J. Immunol.* 1997; 158: 4229-4236
12. Sallusto F, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 389-400
13. Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating

- factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1109-1118
14. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM: Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198: 235-247
 15. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarlo MG: Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but no CD25+ CD4+ Tr cells. *Blood* 2005; 105: 1162-1169
 16. Winzler C et al.: Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997; 185: 317-328
 17. Buelens C et al.: Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by IL-10. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 1848–1852
 18. Sallusto F, Nicolo C, De Maria R, Corinti S, Testi R: Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 2411–2416
 19. Caux C et al.: B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1841–1847
 20. Inaba K et al.: The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1849–1860
 21. Granelli-Piperno A, Pope M, Inaba K, Steinman RM: Coexpression of REL and SP1 transcription factors in HIV-1 induced, dendritic cell-T cell syncytia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92: 1094–10948
 22. Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2001; 2: 675-680
 23. Muzio M et al.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 2000; 164: 5998-6004
 24. Visintin A et al.: Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 2001; 166: 249-255
 25. Reis e Soussa C, Sher A, Kaye P: The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11: 392-399
 26. Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-787

27. Wong BR et al.: TRANCE, a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell specific survival factor. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 2075–2080
28. Anderson DM et al.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175–179
29. Caux C et al.: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1263–1272
30. Kitajima T, Arizumi K, Bergstresser PR, Takashima A: A novel mechanism of glucocorticoidinduced immune suppression: The inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 142–147
31. Adema GJ et al.: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387: 713–717
32. Brocker T: Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on MHC class II expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1223–1232
33. de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Aït-Yahia S, Jacques Banchereau, Yong-Jun Liu, Serge Lebecque and Christophe Caux: The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *The Journal of Immunology* 1998; 160: 1666-1676
34. Jensen SS, Gad M: Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *Journal of Inflammation* 2010; 7: 37
35. Russell JH, Ley TJ: Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 323–70
36. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ: Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994; 76: 977–987
37. Sutton VR, Vaux DA, Trapani JA: *Bcl-2* prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol.* 1997; 158: 5783–5790
38. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA: Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of Bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med.* 2000; 192: 1403–1414
39. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MIE et al.: High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node

- metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Research* 2007; 67: 354–361
40. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 2004; 22: 329–360
 41. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP: Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Medicine* 2005; 2: 0904–0919
 42. Klemi PJ, Pylkkänen L, Kiilholma P, Kurvinen K, Joensuu H: p53 Protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 1201–1208
 43. Whiteside TL: Immune responses to malignancies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125: S272–S283
 44. Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB: Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clinical Cancer Research* 2003; 9, 6453–6460
 45. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB: Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annual Review of Immunology* 2007; 25: 587–617
 46. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K: Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet* 2000; 356: 1795–1799
 47. Roithmaier S, Haydon AM, Loi S et al.: Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2007; 26: 845–849
 48. Strausberg RL: Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. *Genome Biology* 2005; 6: 211
 49. Badoual C, Hans S, Rodriguez J et al.: Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 465–472
 50. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y et al.: Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *British Journal of Cancer* 2006; 94: 275–280

51. Tomšová M, Melichar B, Sedláková I, Šteiner I: Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2008; 108: 415–420
52. Linn YC, Hui KM: Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2003; 44: 1457–1462
53. Lu PH, Negrin RS: A novel population of expanded human CD3CD56 cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *Journal of Immunology* 1994; 153: 1687–1696
54. Nesbeth YC, Martinez DG, Toraya S et al.: CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II—ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells. *Journal of Immunology* 2010; 184: 5654–5662
55. Sato E, Olson SH, Ahn J et al.: Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 18538–18543
56. Kryczek I, Liu R, Wang G et al.: FOXP3 defines regulatory t cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Research* 2009; 69: 3995–4000
57. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ et al.: Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research* 2011; 61: 4766–4772
58. Bamias A, Tsiantas ML, Kafantari E et al.: Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. *Gynecologic Oncology* 2007; 106: 75–81
59. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 2004; 10: 942–949
60. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA et al.: Recruitment of latent pools of high-avidity CD8+ T cells to the antitumor immune response. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 201: 1591–1602
61. Kim R, Emi M, Tanabe K: Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 2006; 119: 254–264

62. Wei S, Kryczek I, Zou L et al.: Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Research* 2005; 65: 5020–5026
63. Emens LA, Jaffee EM: Leveraging the activity of tumor vaccines with cytotoxic chemotherapy. *Cancer Research* 2005; 65: 8059–8064
64. Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT et al.: Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro. *Journal of Immunology* 2005; 175: 820–828
65. Correale P, Cusi MG, Tsang KY et al.: Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 8950–8958
66. Romagnani S: The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today* 1997; 18: 263–266
67. Pisa P, Halapi E, Pisa EK et al.: Selective expression of interleukin 10, interferon γ , and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89: 7708–7712
68. Chen LL, Ye F, Lü WG, Yu Y, Chen HZ, Xie X: Evaluation of immune inhibitory cytokine profiles in epithelial ovarian carcinoma. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2009; 35: 212–218
69. Zeimet AG, Widschwendter M, Knabbe C et al.: Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16: 1861–1868
70. Chen JJW, Yao PL, Yuan A et al.: Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 729–737
71. Asschert JGW, Vellenga E, Hollema H, van der Zee AGJ, de Vries EGE: Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-11 (IL-11) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) in p53-characterised human ovarian carcinomas. *European Journal of Cancer* 1997; 33: 2246–2251

72. Milliken D, Scotton C, Raju S, Balkwill F, Wilson J: Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. *Clinical Cancer Research* 2002; 8: 1108–1114
73. Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T et al.: Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *Journal of Immunotherapy* 2004; 27: 452–459
74. Dou J, Wang Y, Wang J et al.: Antitumor efficacy induced by human ovarian cancer cells secreting IL-21 alone or combination with GM-CSF cytokines in nude mice model. *Immunobiology* 2009; 214: 483–492
75. Tempfer C, Zeisler H, Sliutz G, Haeusler G, Hanzal E, Kainz C: Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncology* 1997; 66: 27–30
76. Scambia G, Testa U, Panici PB et al.: Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors. *International Journal of Cancer* 1994; 57: 318–323
77. Marth C, Zeimet AG, Herold M et al.: Different effects of interferons, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in normal (OSE) and malignant human ovarian epithelial cells. *International Journal of Cancer* 1996; 67: 826–830
78. Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Ohtani K, Rutherford T, Naftolin F: Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and ezrin translocation are stimulated by interleukin 1 α and epidermal growth factor. *Cancer* 2001; 92: 3068–3075
79. Rowley J, Monie A, Hung CF, Wu TC: Inhibition of tumor growth by NK1.1+ cells and CD8+ T cells activated by IL-15 through receptor β /common γ signaling in trans. *Journal of Immunology* 2008; 181: 8237–8247
80. Kriegel MA, Li MO, Sanjabi S, Wan YY, Flavell RA: Transforming growth factor- β : recent advances on its role in immune tolerance. *Current Rheumatology Reports* 2006; 8: 138–144
81. Rodriguez GC, Haisley C, Hurteau J et al.: Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor- β . *Gynecologic Oncology* 2001; 80: 245–253, 2001
82. Pepper MS: Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 1997; 8: 21–43, 1997
83. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, Fujii T, Nagai N, Ohama K: Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncology Reports* 2005; 13: 1153–1158

84. Wu S, Boyer CM, Whitaker RS et al.: Tumor necrosis factor α as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor α expression. *Cancer Research* 1993; 53: 1939–1944
85. Naylor MS, Stamp GWH, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR: Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer: potential role in disease progression. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 2194–2206
86. Goldstein I, Ben-Horin S, Koltakov A et al.: $\alpha\beta 1$ integrin+ and regulatory Foxp3+ T cells constitute two functionally distinct human CD4 + T cell subsets oppositely modulated by TNF α blockade. *Journal of Immunology* 2007; 178: 201–210
87. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S et al.: Interferon- γ reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *International Journal of Cancer* 2009; 125: 367–373
88. Schuurhuis DH, Van Montfoort N, Ioan-Facsinay A et al.: Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *Journal of Immunology* 2006; 176: 4573–4580
89. Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN: Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2004; 53: 176–186
90. Lim H, Newland AC, Kelsey S et al.: Continuous intravenous infusion of high-dose recombinant interleukin-2 for acute myeloid leukaemia—a phase II study. *Cancer Immunology Immunotherapy* 1992; 34: 337–342
91. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD et al.: Vascular endothelial growth factor C gene expression is closely related to invasion phenotype in gynaecological tumor cells. *Blood* 2003; 101: 4878–4886
92. Dikov MM, Ohm JE, Ray N et al.: Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *Journal of Immunology* 2005; 174: 215–222
93. Lissoni P, Malugani F, Bonfanti A et al.: Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2001; 15: 140–144

94. Trinh XB, Tjalma WAA, Vermeulen PB et al.: The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 2009; 100: 971–978
95. Suzuki H, Onishi H, Wada J et al.: VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3^{high} CD4+ Treg. *European Journal of Immunology* 2010; 40: 197–203
96. <http://www.hindawi.com/journals/cdi/2010/516768/fig3/>, povzeto junija 2012
97. Condamine T, Gabrilovich DI: Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011; 32: 19-25
98. Gabrilovich D: Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 941-952
99. Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 162-174
100. Mellor AL, Munn DH: IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 762-774
101. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA: Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol.* 2000; 164: 3596-3599
102. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S: Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol.* 2007; 179: 977-983
103. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC: Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 721s-726s
104. Bronte V, Zanovello P: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 641-654
105. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P et al.: Mechanism regulation reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2009; 182: 5693-5701
106. Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P: Tumor-induced immune dysfunction caused by myeloid suppressor cells. *J Immunother.* 2001; 24: 431-446
107. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI: Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol.* 2005; 175: 4583-4592

108. Goodwin JS, Ceuppens J: Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol.* 1983; 3: 295-315
109. Sugimoto Y, Narumiya S: Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 2007; 282: 11613-11617
110. Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M: Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med.* 1997; 186: 1603-1608
111. Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML: Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998; 161: 2804-2809
112. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML: 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: 28-35
113. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S: Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 4507-4513
114. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D et al.: Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med.* 2005; 202: 931-939
115. Eruslanov E, Daurkin I, Ortiz J, Vieweg J, Kusmartsev S: Pivotal advance: tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE2 catabolism in myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 2010; 88: 839-848
116. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P: Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2011; 118: 5498-5505
117. de Vries IJM, Krooshoop DJEB, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JHS, van Muijen GNP, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJG, Adema GJ, Punt CJA, Figdor CG: Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their aturation state. *Cancer research* 2003; 63: 12-17
118. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S, Brière F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C: Selective recruitment of immature and mature

- dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188: 373-386
119. Sallusto F, Schaefer P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A: Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-2769
120. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161: 1083-1086
121. MartIn-Fontech A, Sebastiani S, Höpken UE, Uggioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003; 198: 615-621
122. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST: Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162: 2472-2475
123. Vassileva G, Soto H, Zlotnik A, Nakano H, Kakiuchi T, Hedrick JA, Lira SA: The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes. *J Exp Med* 1999; 190: 1183-1188
124. Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE, Thrasher AJ: Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell motility and the cytoskeleton* 2004; 57:118–132
125. Buccione R Orth JD, McNiven MA: Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 647-657
126. van Helden SFG, Krooshoop DJEB, Broers KCM, Raymakers RAP, Figdor CG, van Leeuwen FN: A critical role of prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 2006; 177: 1567-1574
127. van Helden SFG, Oud MM, Joosten B, Peterse N, Figdor CG, van Leeuwen FN: PGE₂-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of RhoA-Rho-kinase axis. *Journal of Cell Science* 2008; 121: 1096-1106
128. Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84: 359–369

129. Chhabra ES, Higgs HN: The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 2007; 9 :1110–1121
130. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR: Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 778–790
131. Lammermann T et al.: Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 2008; 453: 51–55
132. Friedl P, Weigelin B: Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 2008; 9: 960–969
133. Lammermann T, Sixt M: Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 636–644
134. Lombardi ML, Knecht DA, Dembo M, Lee J: Traction force microscopy in Dictyostelium reveals distinct roles for myosin II motor and actin-crosslinking activity in polarized cell movement. *J Cell Sci* 2007; 120: 1624–1634
135. Smith LA, Aranda-Espinoza H, Haun JB, Dembo M, Hammer DA: Neutrophil traction stresses are concentrated in the uropod during migration. *Biophys J* 2007; 92: L58–60
136. Kovacs M, Toth J, Hetenyi C, Malnasi-Csizmadia A, Sellers JR: Mechanism of Blebbistatin inhibition of miozinII. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 35557-35563
137. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:ELISA-sandwich.svg>, povzeto junija 2012
138. <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>, povzeto junija 2012
139. Mehrotra PT, Wu D, Crim JA, Mostowski HS, Siegel JP: Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol.* 1993; 151: 2444-2452
140. Laderach D, Compagno D, Danos O, Vainchenker W, Galy A: RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J Immunol.* 2003; 171: 1750-1757
141. Burridge K, Wennerberg K: Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; 116: 167-179
142. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF: Inflammatory cytokines provide third signals for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 1999; 162: 3256

143. Schmidt CS, Mescher MF: Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* 1999; 163: 2561
144. Schmidt CS, Mescher MF: Peptide Ag priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-2. *J. Immunol.* 2002; 168: 5521
145. Sombroek CC, Stam AG, Masterson AJ, Lougheed SM, Schakel MJ, Meijer CJ et al.: Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol.* 2002; 168: 4333-4343
146. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J et al.: Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol.* 2000; 164: 361-370
147. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML et al.: Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 2004; 64: 5934-5937
148. Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML: Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th. *J Immunol.* 1999; 162: 3231-3236
149. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA: Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282: 480-483
150. Muller WA, Weigl SA: Monocyte-selective transendothelial migration: dissection of the binding and transmigration phases by an in vitro assay. *J Exp Med.* 1992; 176: 819-828
151. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993; 178: 449-460
152. Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M et al.: A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6924-6929