

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tadej FEVŽER

**PROIZVODNJA DENDRITIČNIH CELIC Z VISOKO  
SPOSOBNOSTJO IZLOČANJA CITOKINA IL-12p70  
V BREZSERUMSKIH GOJIŠČIH**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tadej FEVŽER

**PROIZVODNJA DENDRITIČNIH CELIC Z VISOKO  
SPOSOBNOSTJO IZLOČANJA CITOKINA IL-12p70 V  
BREZSERUMSKIH GOJIŠČIH**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**PRODUCTION OF DENDRITIC CELLS WITH A HIGH ABILITY OF  
RELEASING THE CYTOKINE IL-12p70 IN SERUM-FREE MEDIUM**

M. Sc. thesis  
Master study programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je nastalo v okviru magistrskega študija Strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, oddelku za terapevtske storitve, specialnem laboratoriju za razvojno celično biotehnologijo.

Študijska komisija podiplomskega študija Strukturne in funkcionalne biologije je na seji, dne 21. 2. 2014, odobrila naslov magistrskega dela. Za mentorja je bil imenovan doc. dr. Urban Švajger in za recenzenta prof. dr. Rok Kostanjšek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Urban ŠVAJGER  
Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 31. 3. 2016

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tadej FEVŽER

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 6:577(043.2)=163.6
- KG citokini/inhibitorne molekule/kostimulatorne molekule/limfociti  
T/monociti/protitumorska cepiva
- AV FEVŽER, Tadej, diplomirani biolog (UN)
- SA ŠVAJGER, Urban (mentor)/KOSTANJŠEK, Rok (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
- LI 2016
- IN PROIZVODNJA DENDRITIČNIH CELIC Z VISOKO SPOSOBNOSTJO  
IZLOČANJA CITOKINA 12p70 V BREZSERUMSKIH GOJIŠČIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP XI, 93 str., 23 preg., 33 sl., 60 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Z namenom raziskav novih metod za odstranjevanje tumorskih celic so se s svojimi lastnostmi izkazale dendritične celice (DC) kot uporabno biotehnološko orodje za protitumorska cepiva. Lastnosti DC, ki so ene od specializiranih antigen predstavitev celic, so ključne za nadaljnjo aktivacijo specifičnih protitumorskih CD8<sup>+</sup> limfocitov T. Bistvene značilnosti DC, ki so pomembne za razvoj takšnih cepiv, so popolni zrelostni status, migratorna sposobnost in visoke koncentracije sproščanja citokina IL-12p70. Glavni namen dela je bil določiti primerno kombinacijo agonistov »toll« podobnih receptorjev (TLR) in vnetnih citokinov, ki bodo vodile v čim večje izločanje IL-12p70, po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L, ki simulira vezavo DC z naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T (CD4 T). Sočasno pa smo preverjali še izločanje citokina IL-10, test migracije DC, izražanje površinskih kostimulatornih in inhibitornih molekul ter sposobnost polarizacije naivnih CD4 T celic v podtip Th1 s kokulturo DC. Ključna gojišča za gojenje DC za klinično uporabo so brezserumska gojišča. V našem primeru smo uporabljali gojišče CellGro<sup>®</sup> z dodanim 1% AB- človeškim serumom. Vir DC so bili monociti, ki smo jih predhodno z metodo imunomagnetne selekcije ločili od drugih mononuklearnih celic periferne krvi. Te smo 5 dni inkubirali ob dodatku citokinov GM-CSF (rastni dejavnik za granulocite in monocite) in IL-4 pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Pridobili smo diferencirane nezrele DC, ki smo jih zorili z različnimi kombinacijami agonistov TLR in vnetnih citokinov. Rezultati so pokazali, da skupine zrelih DC (mDC), ki so bile predhodno tretirane z agonistom TLR3 in po dveh urah še z TLR8 in vnetnimi citokini, izločale največ IL-12p70 po aktivaciji DC kot tudi po ligaciji s CD40L. Vse skupine mDC, ki so bile tretirane tako z agonistom TLR3 kot tudi TLR8, izločajo večjo količino IL-10, kot skupine, ki so bile tretirane samo z enim, kar velja tudi za izločanje IL-10 po ligaciji s CD40L. Test migracije je pokazal dobro migratorno odzivnost mDC na kemokin CCL21. DC izražajo na površini največ kostimulatorne molekule CD86 in inhibitorne molekule PD-L1. Polarizacija CD4 T s strani DC vodi v Th1, kar nakazuje izločanje citokina IFN $\gamma$ . To je tudi posledica izločanja IL-12p70 in izražanja molekule CD86 s strani DC.

### KEY WORD DOCUMENTACION (KWD)

DN Du2

DC UDC 6:577(043.2)=163.6

CX cytokines/inhibitory molecules/costimulatory molecules/lymphocytes  
T/monocytes/antitumor vaccines

AU FEVŽER, Tadej

AA ŠVAJGER, Urban (supervisor)/KOSTANJŠEK, Rok (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme of  
Structural and functional biology

PY 2016

TI PRODUCTION OF DENDRITIC CELLS WITH A HIGH ABILITY OF  
RELEASING THE CYTOKINE IL-12p70 IN SERUM-FREE MEDIUM

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)

NO XI, 93 p., 23 tab., 33 fig., 60 ref.

LA SI

AL sl/en

AB Dendritic cells (DC) have proven to be a valuable biotechnological asset for antitumor vaccination. The properties of DC are significant for activation of specific antitumor CD8<sup>+</sup> lymphocytes T. The characteristics of DC that are important for the development of these types of vaccines are a fully mature status, migratory ability and high concentration in the release of cytokine IL-12p70. The main purpose of the research was to determine a suitable combination of agonists toll-like receptors (TLR) and inflammatory cytokines, which will increase the release of IL-12p70 after activation of DC and after the ligation with CD40L which simulates a binding of DC to the naive CD4<sup>+</sup> lymphocytes T (CD4 T). We have also monitored the release of cytokine IL-10, the migration test of DC, the surface expression of costimulatory and inhibitory molecules, and the ability of the polarization of naive CD4 T into Th1 subtype with a co-culture of DC. For cell cultivation we used medium CellGro<sup>®</sup> with 1% AB- human serum. The source of DC were monocytes that were previously separated from other mononuclear peripheral blood cells by using imunomagnetic selection. We incubated them for 5 days while adding cytokines GM-CSF (a growth factor for granulocytes and monocytes) and IL-4 at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. We have acquired differentiated immature dendritic cells which we matured with different combinations of agonists TLR and inflammatory cytokines. Results showed that the groups of mature DC (mDC), that were previously treated with agonist TLR3 and after two hours also with agonist TLR8 and inflammatory cytokines, were releasing the most of IL-12p70 onto the medium, as also upon the ligation with CD40L. All the mDC groups which were treated with both agonist TLR3 and TLR8 release a higher amount of IL-10 than the groups which were treated with just one, that is also the case for the releasing of IL-10 after the ligation with CD40L. The migration test showed good responsiveness mDC to chemokine CCL21. On the surface DC express a high amount of costimulatory molecule CD86 and inhibitory molecule PD-L1. The polarization of CD4 T leads to Th1 subtype which indicates the release of the cytokine IFN $\gamma$ . That is also the consequence of the release of IL-12p70 and express CD86 molecule by DC.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b> .....	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTACION (KWD)</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 CILJI NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>4</b>
2.1 IMUNSKI SISTEM IN IMUNOST .....	4
<b>2.1.1 Naravna ali prirojena odpornost</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.2 Specifična ali pridobljena imunost</b> .....	<b>4</b>
2.2 DENDRITIČNE CELICE.....	5
<b>2.2.1 Značilnosti nezrelih dendritičnih celic</b> .....	<b>6</b>
2.2.1.1 Receptorji, ki prepoznavajo vzorce ali PRR (angl. <i>pattern recognition receptors</i> ).....	6
2.2.1.2 »Toll« podobni receptorji (angl. <i>Toll-like receptors</i> ) .....	7
2.2.1.3 Pomembni citokini, ki vplivajo na zorenje dendritičnih celic .....	9
<b>2.2.2 Značilnosti zrelih dendritičnih celic</b> .....	<b>12</b>
2.2.2.1 Pomembne kostimulatorne molekule na površini zrelih dendritičnih celic .....	12
2.2.2.2 Pomembne inhibitorne molekule na površini zrelih dendritičnih celic .....	14
2.3 IL-12p70 IN IL-10 .....	15
2.4 MIGRACIJA DENDRITIČNIH CELIC.....	16
2.5 IMUNOLOŠKA SINAPSA.....	18
2.6 DENDRITIČNE CELICE KOT PROTITUMORSKA VAKCINA.....	21
<b>2.6.1 Diferenciacija monocitov v dendritične celice</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.2 Aktivacija citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocitov T (CTL)</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>25</b>

3.1	MATERIAL.....	25
3.1.1	<b>Biološki material .....</b>	<b>25</b>
3.1.2	<b>Kemikalije .....</b>	<b>25</b>
3.1.3	<b>Laboratorijska oprema .....</b>	<b>26</b>
3.1.4	<b>Sestava gojišča.....</b>	<b>27</b>
3.2	METODE.....	27
3.2.1	<b>Izolacija mononuklearnih celic perifene krvi (PBMC) .....</b>	<b>27</b>
3.2.2	<b>Imunomagnetna izolacija monocitov .....</b>	<b>29</b>
3.2.3	<b>Štetje monocitov z Bürker-Türkovo števno ploščico.....</b>	<b>29</b>
3.2.4	<b>Diferenciacija monocitov v nezrele dendritične celice .....</b>	<b>30</b>
3.2.5	<b>Zorenje nezrelih dendritičnih celic .....</b>	<b>31</b>
3.2.6	<b>Tretiranje zrelih dendritičnih celic z multimernim ligandom CD40.....</b>	<b>32</b>
3.2.7	<b>Zbiranje supernatantov za analizo IL-12p70 in IL-10 s testom ELISA ....</b>	<b>33</b>
3.2.8	<b>Analiza koncentracije IL-12p70 in IL-10 s testom ELISA .....</b>	<b>33</b>
3.2.9	<b>Imunooznačevanje označevalcev zorenja (kostimulatornih molekul in kemokinskega receptorja CCR7) na površini zrelih dendritičnih celic za analizo s pretočnim citometrom .....</b>	<b>34</b>
3.2.10	<b>Imunooznačevanje inhibitornih molekul na površini zrelih dendritičnih celic za analizo s pretočnim citometrom.....</b>	<b>35</b>
3.2.11	<b>Test migracije zrelih dendritičnih celic .....</b>	<b>35</b>
3.2.12	<b>Kokultura dendritičnih celic in naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T .....</b>	<b>36</b>
3.2.13	<b>Tretiranje aktivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T z <math>\alpha</math>TCR makrokroglice.....</b>	<b>37</b>
3.2.14	<b>Zbiranje supernatantov limfocitov T, ki so bili sedem dni v kokulturi z zreli dendritičnimi celicami ter 48 ur tretirani z <math>\alpha</math>TCR makrokroglicami za analizo izbranih sproščenih citokinov v vzorcu.....</b>	<b>37</b>
3.2.15	<b>Analiza citokinov v supernatantih limfocitov T, ki so bili sedem dni v kokulturi z zreli dendritičnimi celicami ter 48 ur tretirani z <math>\alpha</math>TCR makrokroglicami.....</b>	<b>38</b>
3.2.16	<b>Analiza s pretočnim citometrom .....</b>	<b>38</b>
3.2.17	<b>Statistična analiza podatkov .....</b>	<b>39</b>
4	<b>REZULTATI.....</b>	<b>40</b>

4.1	KONCENTRACIJA IL-12P70 IN IL-10.....	40
4.2	TEST MIGRACIJE DENDRITIČNIH CELIC.....	48
4.3	ANALIZA POVRŠINSKIH OZNAČEVALCEV ZORENJA (KOSTIMULATORNIH MOLEKUL IN KEMOKINSKEGA RECEPTORJA CCR7).....	49
4.4	ANALIZA POVRŠINSKIH INHIBITORNIH MOLEKUL.....	56
4.5	KONCENTRACIJE CITOKINOV, SPROŠČENIH IZ AKTIVIRANIH LIMFOCITOV TH1/TH2/TH17.....	64
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>72</b>
5.1	KONCENTRACIJA IL-12P70 IN IL-10.....	72
5.1.1	<b>Koncentracija citokina IL-12p70, merjena neposredno po 48 urnem zorenju dendritičnih celic.....</b>	<b>72</b>
5.1.2	<b>Koncentracija citokina IL-12p70, merjena po 24 urnem zorenju dendritičnih celic in 48 urnem tretiranju z mCD40L.....</b>	<b>73</b>
5.1.3	<b>Koncentracija citokina IL-10, merjena neposredno po 48 urnem zorenju dendritičnih celic.....</b>	<b>74</b>
5.1.4	<b>Koncentracija citokina IL-10, merjena po 24 urnem zorenju dendritičnih celic in 48 urnem tretiranju z mCD40L.....</b>	<b>75</b>
5.2	TEST MIGRACIJE DENDRITIČNIH CELIC.....	75
5.3	ANALIZA POVRŠINSKIH OZNAČEVALCEV ZORENJA (KOSTIMULATORNIH MOLEKUL IN KEMOKINSKEGA RECEPTORJA CCR7).....	77
5.4	ANALIZA POVRŠINSKIH INHIBITORNIH MOLEKUL.....	79
5.5	ANALIZA CITOKINOV, SPROŠČENIH IZ AKTIVIRANIH LIMFOCITOV TH1/TH2/TH17.....	81
<b>6</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>89</b>
	<b>ZAHVALA</b>	



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Primerjava delovanja zaščitnega cepiva proti patogenom in terapevtskega cepiva.....	2
Sl. 2: Signaline poti nekaterih »toll« podobnih receptorjev .....	9
Sl. 3: Primer migracije zrelih dendritičnih celic.....	17
Sl. 4: Imunološka sinapsa med naivnim CD4 <sup>+</sup> limfocitom T in zrelo dendritično celico ...	20
Sl. 5: Povprečne koncentracije izločenega citokina IL-12p70 in IL-10 s strani zrelih DC, po aktivaciji in po tretiranju s CD40L.....	41
Sl. 6: Koncentracije izločenega citokina IL-12p70 po aktivaciji DC.....	42
Sl. 7: Koncentracije izločenega citokina IL-12p70 po tretiranju s CD40L.....	43
Sl. 8: Koncentracije izločenega citokina IL-10 po aktivaciji DC.....	45
Sl. 9: Koncentracije izločenega citokina IL-10 po tretiranju s CD40L.....	46
Sl. 10: Število zrelih DC, ki so migrirale .....	48
Sl. 11: Prikaz srednjih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za izražanje posameznega označevalca zorenja.....	49
Sl. 12: Povprečne vrednosti MFI za posamezen površinski označevalec zorenja.....	50
Sl. 13: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo CD80.....	51
Sl. 14: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo CD83.....	52
Sl. 15: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo CD86.....	53
Sl. 16: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo HLA-DR .....	54
Sl. 17: MFI za površinski kemokinski receptor CCR7.....	55
Sl. 18: Prikaz srednjih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za izražanje posamezne površinske inhibitorne molekule.....	56

Sl. 19: Povprečne vrednosti MFI za posamezno površinsko inhibitorno molekulo .....	57
Sl. 20: MFI za površinsko inhibitorno molekulo ILT-2 .....	58
Sl. 21: MFI za površinsko inhibitorno molekulo ILT-3 .....	59
Sl. 22: MFI za površinsko inhibitorno molekulo ILT-4 .....	60
Sl. 23: MFI za površinsko inhibitorno molekulo PD-L1 .....	61
Sl. 24: MFI za površinsko inhibitorno molekulo HLA-G .....	62
Sl. 25: MFI za površinsko inhibitorno molekulo FasL.....	63
Sl. 26: Povprečne vrednosti koncentracij posameznih citokinov, sproščenih s strani aktiviranih CD4 <sup>+</sup> limfocitov .....	64
Sl. 27: Koncentracije citokina IL-2 pri posameznih skupinah .....	65
Sl.28: Koncentracije citokina IL-4 pri posameznih skupinah .....	66
Sl. 29: Koncentracije citokina IL-6 pri posameznih skupinah .....	67
Sl. 30: Koncentracije citokina IL-10 pri posameznih skupinah .....	68
Sl. 31: Koncentracije citokina TNF $\alpha$ pri posameznih skupinah.....	69
Sl. 32: Koncentracije citokina IFN $\gamma$ pri posameznih skupinah .....	70
Sl. 33: Koncentracije citokina IL-17A pri posameznih skupinah .....	71

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-12p70 za posamezne skupine, po aktivaciji DC .....	42
Pregl. 2: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-12p70 za posamezne skupine, po tretiranju s CD40L.....	43
Pregl. 3: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-10 po aktivaciji DC	45
Pregl. 4: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-10 po tretiranju s CD40L .....	46
Pregl. 5: Povprečja in standardne deviacije za število migriranih DC .....	48
Pregl. 6: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule CD80.....	51
Pregl. 7: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule CD83.....	52
Pregl. 8: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule CD86.....	53
Pregl. 9: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule HLA-DR .....	54
Pregl. 10: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinskega kemokinskega receptorja CCR7 .....	55
Pregl. 11: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule ILT-2.....	58
Pregl. 12: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule ILT-3.....	59

Pregl. 13: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule ILT-4.....	60
Pregl. 14: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule PD-L1 .....	61
Pregl. 15: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule HLA-G.....	62
Pregl. 16: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule FasL .....	63
Pregl. 17: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-2 .....	65
Pregl. 18: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-4 .....	66
Pregl. 19: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-6 .....	67
Pregl. 20: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-10 .....	68
Pregl. 21: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina TNF $\alpha$ .....	69
Pregl. 22: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina INF $\gamma$ .....	70
Pregl. 23: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-17A.....	71

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen predstavitvene celice
CCL	kemokin
CCR	kemokinski receptor
CD40L	CD40 ligand
CD	označevalec pripadnosti (angl. <i>cluster of differentiation</i> )
CTL	CD8 <sup>+</sup> citotoksični limfociti T (angl. <i>cytotoxic lymphocyte T</i> )
DC	dendritične celice
DMSO	dimetilsulfoksid
DPBS	Dulbeccov fosfatni pufer (angl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered Saline</i> )
FasL	ligand Fas receptorja
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	fluorescein izotiocianat
GM-CSF	granulocitno monocitni kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
HLA-DR	humani poglavitni kompleks tkivne skladnosti razreda II
HLA-G	humani levkocitni antigen G
IFN	interferon
IL	interlevkin
ILT	imunoglobulinom podobni transkript (angl. <i>immunoglobuline-like transcript</i> )
LPS	lipopolisaharid
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. <i>major histocompatibility complex</i> )
NK	naravna celica ubijalka (angl. <i>natural killer cell</i> )
PD-L1	ligand programirane smrti 1 (angl. <i>programmed death ligand 1</i> )
PE	fikoeritrin
pI:C	poliinozinična:policitidilična kislina
PRR	receptorji, ki prepoznavajo vzorce (angl. <i>pattern recognition receptors</i> )
R848	imidazokinolin
TCR	T-celični receptor (angl. <i>T-cell receptor</i> )

TLR	»toll« podobni receptorji (angl. <i>toll-like receptors</i> )
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl. <i>tumor necrosis factor</i> )
$\alpha$ DC1	poliinozinična:policitidilična kislina ob dodatku vnetnih citokinov TNF $\alpha$ , INF $\alpha$ , INF $\gamma$ in IL-1 $\beta$

## 1 UVOD

Kompleksnost in raznolikost rakavih obolenj je poznana že dalj časa. Kompleksnost se kaže v različnih časovnih potekih ter napredovanju bolezni. Različne onkogene mutacije vodijo v celično proliferacijo ter s tem do različnih tipov rakavih obolenj, kar spremlja tudi izguba tumor supresorskih funkcij imunskega sistema (De Palma in Hanahan, 2012).

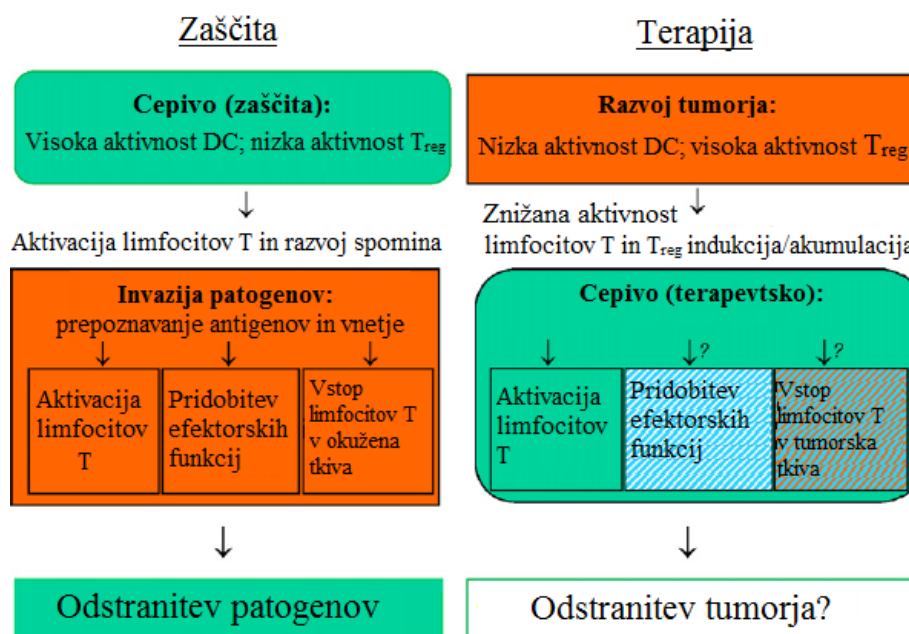
Uveljavljene terapije za rakava obolenja kot so kirurgija, kemoterapija in radioterapija so običajno učinkovite pri zmanjšanju večjih tumorskih mas vendar pogosto s temi metodami ne odstranimo vseh rakavih celic in s tem ne preprečimo ponovitve bolezni. Napredovana bolezen med drugim vodi tudi do oslabitve pacientovega imunskega sistema, ki je ključen za obrambo pred mikroorganizmi in lastnimi rakavimi celicami (Kalinski in Okada, 2010).

V imunskem sistemu so dendritične celice specializirane antigen predstavitvene celice, ki vplivajo na aktivacijo CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> limfocitov T. Njihova narava zajema privzem okoljskih antigenov, zorenje, migracijo s perifernih tkiv v sekundarne limfatične organe ter aktivacijo naivnih limfocitov T s predstavljanjem antigenov, izražanjem kostimulatornih molekul ter izločanjem različnih citokinov, med katerimi je pomemben IL-12p70. Tako lahko dendritične celice s svojimi lastnostmi vplivajo tudi na aktivacijo specifičnih protitumorskih CD8<sup>+</sup> limfocitov T, ki sodelujejo pri apoptozi tumorskih celic (Mailliard in sod., 2004; Berk in sod., 2012).

Zaradi sposobnosti dendritičnih celic, da izzovejo specifične odzive limfocitov T, jih lahko uporabljamo v raziskovalnih in kliničnih preizkušnjah kot protitumorska cepiva (slika 1). Raziskave o sposobnosti dendritičnih celic, da sintetizirajo in izločajo visoke koncentracije citokina IL-12p70 sovпада z indukcijo protitumorskih odzivov in s tem nakazuje velik potencial v terapevtski uporabi (Kalinski in Okada, 2010).

Mnogo laboratorijskih protokolov je bilo narejenih za proizvodnjo polariziranih dendritičnih celic tipa 1 za protitumorska cepiva, pridobljenih z diferenciacijo monocitov v laboratorijskih pogojih, ki imajo visoko sposobnost sinteze ter izločanja IL-12p70.

Protokoli temeljijo na uporabi ligandov »toll« podobnih receptorjev in vnetnih citokinov, kot so IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  in drugi (Kalinski in Okada, 2010; Berk in sod., 2012).



Slika 1: Primerjava delovanja zaščitnega cepiva proti patogenom in terapevtskega cepiva proti tumorju (prirejeno po Kalinski in Okada, 2010)

## 1.1 CILJI NALOGE

Namen uporabe dendritičnih celic (DC) v klinične namene zahteva uporabo brez serumskih celičnih gojišč. Znano je, da so lastnosti aktiviranih (zrelih) DC in s tem povezan citokinski profil močno povezani z načinom gojenja. V magistrskem delu bomo iz tega razloga preverili sposobnost zrelih DC, pripravljenih v brez serumskem gojišču na različne načine, da proizvajajo IL-12p70 med samo aktivacijo in po dodatni stimulaciji z ligandom CD40 (simulacija interakcije z limfociti T). Glavni namen dela je določiti primerno kombinacijo ligandov »toll« podobnih receptorjev ob podpori vnetnih citokinov, za zorenje DC, ki bo vodila v proizvodnjo cepiva na bazi DC s čim večjo sposobnostjo izločanja citokina IL-12p70. Tako bomo preverili izločanje citokina IL-12p70 s strani zrelih DC, po aktivaciji in po ligaciji z ligandom CD40 (CD40L). Hkrati bomo preverili tudi izločanje citokina IL-10, po aktivaciji ter po ligaciji s CD40L, migratorno sposobnost zrelih DC kot odziv na kemokin CCL21, izražanje določenih površinskih kostimulatornih



in inhibitornih molekul ter sposobnost zrelih DC, da izzovejo polarizacijo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- predpostavljamo, da bodo skupine zrelih DC, pripravljene v brez serumskem gojišču, po stimulaciji z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, izkazovale večjo sposobnost sproščanja citokina IL-12p70 in nižjo stopnjo sproščanja citokina IL-10 kot DC skupine »αDC1«. Predpostavka velja za koncentracijo citokinov IL-12p70 in IL-10, po aktivaciji DC kot tudi po stimulaciji s CD40L.
- predpostavljamo, da bodo skupine zrelih DC, pripravljene v brez serumskem gojišču, po stimulaciji z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, izkazovale večjo migratorno odzivnost na kemokin CCL21, izražale več površinskih kostimulatornih molekul (označevalcev zorenja) in površinskih inhibitornih molekul ter boljšo sposobnost polarizacije naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip, v primerjavi z DC skupine »αDC1« in »NT«.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 IMUNSKI SISTEM IN IMUNOST**

Za zaščito telesa pred patogenimi organizmi, kot so bakterije, virusi in paraziti, smo vretenčarji razvili kompleksen imunski sistem. Kompleksnost takega imunskega sistema se kaže v funkciji različnih celic in topnih mediatorjev, ki so vpleteni v imunske odzive ter razvoj specifičnega imunskega spomina.

#### **2.1.1 Naravna ali prirojena odpornost**

Sistem naravne odpornosti je prva obrambna linija proti patogenom, ki vdirajo v telo. Je evolucijsko starejši sistem, ki vključuje različne komponente. Sistem naravne odpornosti predstavljajo vse fizične in kemične bariere (epiteliji in antimikrobne snovi), ki preprečujejo vstop mikroorganizmom v telo, različne celice (monociti, nevtrofilci, makrofagi, naravne celice ubijalke (NK) in druge z izjemo celic s specifičnim spominom), citokini ter proteini akutne faze. Ta sistem sproži vnetne reakcije ter komunicira s specifičnim imunskim sistemom preko predstavljanja antigenov ter izločanja citokinov. Delovanje sistema temelji na zaznavi tujih antigenov z receptorji, ki prepoznajo vzorce ali PRR (ang. *pattern recognition receptors*), ki se izražajo na površini določenih celic imunskega sistema (Portou in sod., 2015).

#### **2.1.2 Specifična ali pridobljena imunost**

Sistem specifične imunosti predstavljajo za antigene specifični limfociti T in B. Za razvoj tega sistema po prvem srečanju z antigenom so potrebni dnevi ali pa tedni, da se razvije. Po uspešni prepoznavi tujih antigenov razvije ta sistem celic dolg in trajen spomin. Limfociti T so ključne celice specifične imunosti, ki izražajo površinski T celični receptor ali TCR (angl. *T-cell receptor*). Preko tega receptorja prepoznajo antigene, ki jim jih predstavijo celice naravne odpornosti kot so makrofagi in DC, antigene pa jim predstavljajo tudi limfociti B. TCR prepozna antigene v kompleksu z molekulami

poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa ali MHC (angl. *major histocompatibility complex*), ki je izražen na površini antigen predstavitevni celic (APC). Limfociti B so efektorske celice humoralnih odzivov specifičnega sistema. So celice, ki proizvajajo protitelesa za specifične antigene ter so poznani po površinskem B celičnem receptorju ali BCR (angl. *B-cell receptor*). Za ta receptor je značilno, da prepozna en specifični antigen. Zreli limfociti B krožijo po krvi dokler se ne aktivirajo z vezavo specifičnega antigena in s signaliziranjem limfocitov T. Po aktivaciji se limfociti B diferencirajo v plazma celice, ki proizvajajo protitelesa za specifičen antigen ter spominske celice B, ki se aktivirajo ob ponovnem srečanju z antigenom (Kuehn in sod., 2014).

## 2.2 DENDRITIČNE CELICE

Dendritične celice so skupina hematopoetskih celic, ki poleg makrofagov in limfocitov B spadajo v družino specializiranih APC. Delimo jih v dve veliki populaciji. Prva predstavlja skupino nelimfoidnih tkivno migratornih DC ter skupino limfoidnih DC, druga populacija pa predstavlja plazmacitoidne DC. Za prvo populacijo DC sta značilni dve bistveni lastnosti: vzdrževanje imunske tolerance do telesu lastnih antigenov ter indukcija specifičnih imunskih odzivov proti okoljskim patogenom. Za drugo populacijo DC je značilno izločanje interferona- $\alpha$ , ki je pomemben pri signaliziranju aktivacije limfocitov T ob virusnih okužbah. Tkivne DC na svojih področjih vzorčijo prisotne tuje antigene ter ob aktivaciji migrirajo po aferentnih limfnih žilah do bezgavk, kjer interagirajo z naivnimi limfociti T ter s signaliziranjem omogočajo aktivacijo le-teh (Merad in Manz, 2009). Vsem tipom DC je skupno, da stimulirajo primarne odzive limfocitov T; migrirajo skozi tkiva ter v predele bezgavk z limfociti T, fagocitirajo, interagirajo z limfociti T, imajo specifične površinske antigene, ki jih ločijo od ostalih levkocitov ter imajo specifične citokemične reakcije (Hart, 1997). Aktivirane DC vplivajo na aktivacijo in polarizacijo limfocitov T. Aktivacija in polarizacija limfocitov T je odvisna od izločanja različnih citokinov in izražanja kostimulatornih molekul na površini aktiviranih DC. Aktivirane DC izločajo citokin IL-12p70 ter izražajo visoko koncentracijo površinske kostimulirajoče molekule CD86, pa tudi CD80, CD83, HLA-DR in CCR7 (Lichtenegger in sod., 2012).

## 2.2.1 Značilnosti nezrelih dendritičnih celic

Dendritične celice nastajajo iz hematopoetskih progenitorskih celic v kostnem mozgu (De Kleer in sod., 2014). Od tu potujejo v periferna tkiva in postanejo nezrele DC. Značilnosti teh celic so visoka endocitotska in makropinocitotska aktivnost ter nizek potencial aktivacije limfocitov T. Celice v svoji okolici zaznavajo viruse in bakterije s PRR kot so »toll« podobni receptorji. S fagocitozo zajamejo patogene ter njihove proteine z molekulami MHC predstavijo na svoji površini. V primeru, da ne pride do vnetnih dražljajev, te celice migrirajo med tkivi in limfatičnimi organi približno dva dni. Na tej poti vzorčijo telesu lastne antigene, ki vključujejo tudi neinfekcijske okoljske proteine. Večina nezrelih DC nato migrira v bezgavke po aferentni limfatični žili, kjer predstavljajo antigene, ki so jih vzorčile na poti, limfocitom T. S tem dejanjem vplivajo na toleranco limfocitov T do telesu lastnih antigenov (Mahnke in sod., 2002).

### 2.2.1.1 Receptorji, ki prepoznavajo vzorce ali PRR (angl. *pattern recognition receptors*)

Receptorji, ki prepoznavajo vzorce ali PRR so receptorji prirojene oziroma naravne odpornosti, ki prepoznajo evolucijsko ohranjene komponente mikroorganizmov, ki jih imenujemo PAMPs (angl. *pathogen associated molecular patterns*). Receptorji so se razvili zgodaj v evoluciji pod močnim selekcijskim pritiskom koevolucije gostiteljev ter njegovih patogenov in komenzalov. Ti receptorji se nahajajo v organizmu na različnih lokacijah. Tako poznamo humoralne PRR, ki se nahajajo v serumu, na membrano vezane PRR in citoplazemske PRR (Sellge in Kufer, 2015). Primeri humoralnih PRR so kolektini, fikolini, pentraksini in komponente komplekta (Jaillon in sod., 2007). Na membrano vezani PRR so različne receptorske kinaze (Dardick in Ronald, 2006), »toll« podobni receptorji (TLR) in lektinski receptorji tipa C (CLR), med katere spadajo manozni receptorji in asialoglikoproteinski receptorji. Med citoplazemske PRR spadajo »NOD« podobni receptorji (NLR) in »RIG-1« podobni receptorji (RLR) (Geijtenbeek in Gringhuis, 2009).

### 2.2.1.2 »Toll« podobni receptorji (angl. *Toll-like receptors*)

»Toll« podobni receptorji ali toll-like receptors (TLR) so receptorji za zaznavo evolucijsko ohranjenih mikrobnih komponent. Te mikrobnne komponente preko TLR sprožijo zorenje nezrelih DC ter posledično izražanje nekaterih citokinov, ki regulirajo pridobljeno in prirojeno odpornost. TLR so specifični za različne mikrobnne komponente. Pri človeku je znanih deset TLR. V signalno transdukcijo preko TLR so vključeni MyD88 adaptorski proteini z izjemo TLR3. TLR3 in včasih tudi TLR4, sta vezana na TRIF protein, ki sproži izražanje citokina IFN $\beta$ . TLR se v celici nahajajo na različnih lokacijah. Večina receptorjev je na celični membrani, TLR7, TLR8 in TLR9 pa se nahajajo na membrani endosoma. Dendritične celice tako s TLR prepoznavajo mikrobove in tako pod vplivom mikrobov in vnetnih dejavnikov zorijo ter migrirajo iz perifernih tkiv v sekundarne limfatične organe, kjer z izražanjem molekul MHC in kostimulatornih molekul omogočijo polarizacijo limfocitov T. Zrele DC so s tem tudi pomemben vir citokina IL-12p70, ki je ključen pri polarizaciji limfocitov T tipa 1 (Th1) (Napolitani in sod, 2005). TLR so značilni po zunajcelični domeni, ki je bogata z leucinom, transmembranskim delom, ki je bogat s cisteinom ter citoplazemski domeni Toll/IL-1 receptorju (TIR) (Divanovic in sod., 2005).

#### **Pomembni TLR pri DC človeka:**

TLR3 zaznava dvojnovijačno RNA, ki je v glavnem produkt replikacije RNA virusov. Receptor se izraža na DC, limfocitih B, epitelijih in endoteliju. Kot agonist za ta receptor se v laboratoriju v raziskovalne namene uporabljaja pI:C (Israely in sod, 2014).

TLR4 zaznava bakterijski lipopolisaharid. Receptor je izražen na površini celične membrane. Signalna transdukcija poteka preko MyD88 ali pa preko TRIF proteina. Za delovanje potrebuje receptor še zunajcelični protein MD-2 (Divanovic in sod., 2005).

TLR8 je endosomalni receptor, ki zaznava z gvanozini bogate enoverižne oligonukleotide RNA virusov. Ob aktivaciji signalizira preko MyD88 in NF- $\kappa$ B ter sproži protivirusne imunske odzive.

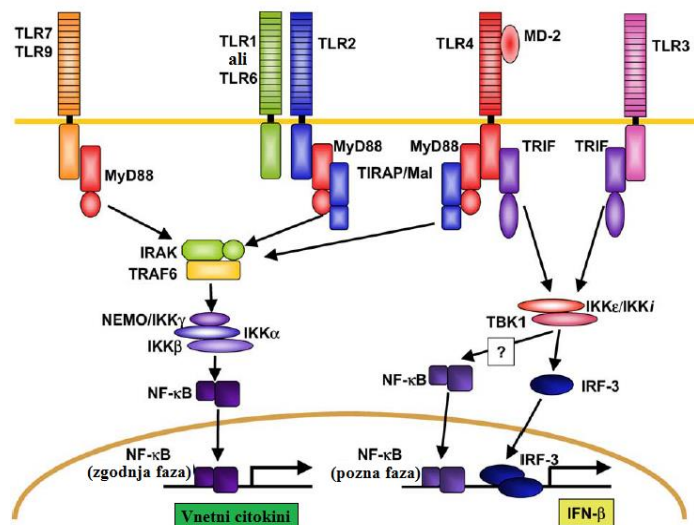
TLR9 zaznava nemetilirane oligonukleotide CpG, ki so pogostejši pri mikrobih kot sesalcih. Receptor je pretežno izražen na plazmocitoidnih DC, monocitih, limfocitih B in makrofagih. Kot agonist za ta receptor se uporabljajo oligonukleotidi, ki vsebujejo regije CpG (Israely in sod, 2014).

### **TLR signaliziranje:**

Signaliziranje preko TLR (slika 2) poteka preko dveh adaptorskih proteinov: MyD88 in TRIF. Na TRIF adaptorski protein je vedno vezan TLR3 in včasih tudi TLR4. Ostali TLR signalizirajo preko MyD88 adaptorskega proteina. Ob aktivaciji TLR se citoplazemska domena TIR poveže in aktivira adaptorski protein, ki je odvisen od vrste TLR.

Ob aktivaciji TLR adaptorski protein MyD88 aktivira protein IRAK (angl. *interleukin-1 receptor-associated kinase*) s fosforilacijo. IRAK se nato poveže s TRAF6 (angl. *TNF receptor associated factor 6*), ki vodi do aktivacije dveh neodvisnih signalnih poti ter na koncu privede do aktivacije JNK (angl. *c-Jun N-terminal kinases*) in NF- $\kappa$ B (angl. *nuclear factor kappa B*). Signaliziranje preko MyD88 vodi v sintezo TNF $\alpha$  in IL-12.

Pri signaliziranju preko TLR3 in TLR4 se aktivira adaptorski protein TRIF, ki vodi do aktivacije transkripcijskega faktorja IRF-3 ter s tem indukcijo sinteze IFN $\beta$ . Razlika med signaliziranjem preko TLR3 in TLR4 (kadar signaliziranje poteka preko proteina TRIF) je v tem, da je pri signaliziranju preko TLR3 vključen tudi NF- $\kappa$ B (Takeda in Akira, 2004).



Slika 2: Signalne poti nekaterih »toll« podobnih receptorjev (prirejeno po Takeda in Akira, 2004)

### 2.2.1.3 Pomembni citokini, ki vplivajo na zorenje dendritičnih celic

Citokini so glikoproteini, ki igrajo ključno vlogo pri komunikaciji med celicami imunskega sistema ter med celicami tkiv in celicami imunskega sistema. Preko svojih receptorjev signalizirajo celicam, ki te receptorje izražajo ter omogočijo spremembo funkcije ali pa fenotipa celice. Citokine delimo v različne skupine in so si med seboj strukturno podobni vendar so v funkcijah precej raznoliki. Citokini imajo plejotropne efektorske funkcije pri akutnih in kroničnih vnetnih odzivih. Različne celice, ki so udeležene v prirojene obrambne odzive, kot so nevtrofilci, NK, makrofagi, celice mast in eozinofilci, proizvajajo citokine in se na citokine tudi odzivajo. Pri levkocitih, ki se odzivajo na mikrobnne in kemične signale, citokini vplivajo na izražanje adhezivnih molekul tako na levkocitih kot tudi na endoteliju, sproščanje reaktivnih kisikovih zvrsti, dušikovega oksida, vazoaktivnih aminov, neuropeptidov, derivatov arahidonske kisline, prostaglandinov in mnogih drugih snovi. Pomembni so tudi pri signaliziranju za izražanje komponentnega sistema, obrambnih membranskih molekul, TLR in NLR. Citokine delimo v različne skupine, med katerimi so pomembni interleukini, interferoni, kemokini, transformirajoči rastni faktorji, tumor nekrozni faktorji in kolonije stimulirajoči faktorji (McInnes, 2012).

### **Signaliziranje citokinov**

Citokinske receptorje delimo v več skupin glede na tip receptorja. Tako ločimo:

- citokinske receptorje tipa I
- citokinske receptorje tipa II
- receptorje družine TNF
- receptorje TGF $\beta$
- kemokinske receptorje
- receptorje imunoglobulinske superdružine

Signaliziranje preko citokinskih receptorjev tipa I in II vključuje signalne kaskade preko JAK/STAT poti. Receptorji TNF družine imajo značilno domeno, bogato s cisteini, ki tvorijo tri disulfidne vezi. Signalizirajo preko prokaspaz z adaptorskimi proteini kot so FADD, TRADD. Signaliziranje vodi v apoptozo celice. Receptorji TGF $\beta$  so serin/treonin kinazni receptorji. Receptorji imunoglobulinske družine so strukturno homologni protitelesom in adhezivnim molekulam. Kemokinski receptorji pa predstavljajo 7-transmembranske receptorje, ki so povezani s proteinom G (Vozelj, 2000).

### **Interferoni (IFN)**

Interferoni so citokini z antivirusnimi lastnostmi, ki jih izločajo različni tipi celic pod vplivom različnih dražljajev. Poznanih je več razredov interferonov (alfa, beta, gama, tau in omega), ki jih delimo v dva tipa, tip I in tip II interferoni. V tip II interferonov spada samo IFN $\gamma$  (Caraglia in sod., 2005). Za signaliziranje z interferoni tipa I so značilni odzivi celic, kot so protivirusno delovanje okužene celice ter njenih sosednjih celic, ki preprečujejo virusne pomnožitve; modulirajo odzive prirojene odpornosti tako, da sprožijo predstavljanje antigenov, regulirajo delovanje NK; aktivirajo pridobljeni imunski sistem z aktivacijo visoko antigen specifičnih limfocitov T in B; imajo antiproliferativno in avtofagno funkcijo pri različnih vrstah raka. Tako igrajo interferoni tipa I pomembno vlogo pri odstranjevanju virusov, predstavitvi antigenov z APC ter inhibicijo proliferacije (Capobianchi in sod., 2014).



### **Interferon alfa (IFN $\alpha$ )**

IFN $\alpha$  je neglikoliziran monomerni citokin (Capobianchi in sod., 2014), ki ima pomembne funkcije pri aktivaciji prirojene odpornosti proti virusnim okužbam, regulaciji izražanja MHC tipa I, aktivaciji NK in citotoksičnih limfocitov T ter antiproliferativne učinke. Pri zoritvi DC ima IFN $\alpha$  pomembno vlogo saj vpliva na sintezo IL-12p70 (Heystek in sod., 2003). Receptor za IFN $\alpha$  sestavljata podenoti IFNAR1 (interferon alfa receptor 1) in IFNAR2 (interferon alfa receptor 2). Vezava na receptor omogoči vezavo podenot ter posledično fosforilacijo tirozinskih ostankov na znotrajceličnem delu obeh podenot. Aktivni podenoti v kaskadi naprej aktivirata Janus kinazi (JAK) TYK2 in JAK1. Aktivni JAK aktivirata različne STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) proteine in tako aktivirajo različne faktorje, ki v jedru celice delujejo kot transkripcijski faktorji za gene, ki so pod kontrolo signaliziranja alfa interferonov (Caraglia in sod., 2005; Capobianchi in sod., 2014).

### **Interferon gama (IFN $\gamma$ )**

IFN $\gamma$  je plejotropni citokin, ki ga proizvajajo različni celični tipi in ima pomembno vlogo pri signaliziranju v procesih prirojene odpornosti in pridobljene imunosti. Glavni vir IFN $\gamma$  v pridobljeni imunosti so limfociti T, v prirojeni odpornosti pa so poglavitni vir IFN $\gamma$  NK in APC. Signalna kakada receptorja za IFN $\gamma$  poteka preko JAK/STAT signalne poti. IFN $\gamma$  inducira fosforilacijo proteinov STAT1, STAT3 in STAT5 preko JAK1 in JAK2 (Kim in sod., 2015). Signaliziranje z IFN $\gamma$  ima poleg antimikrobnih učinkov tudi pomembne antiproliferativne, antiangiogenezne in antitumorske efekte. Aktivni IFN $\gamma$  je nekovalentni 34 kDa homodimer, ki inducira gensko izražanje MHC II molekul in sintezo dušikovega oksida (Jahromi in sod., 2014). Pri zrelih DC IFN $\gamma$  ojačuje sproščanje IL-12p70, inducirane preko CD40/CD40L sistema ter inhibira izločanje IL-10 (Conzelmann in sod., 2010; Hansen in sod., 2012).

### **Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF $\alpha$ -tumor necrosis factor alpha)**

TNF $\alpha$  je plejotropni citokin, ki regulira mnoge celične odzive, vključno z vnetnimi odzivi, celičnim preživetjem ali pa apoptozo celic. TNF $\alpha$  ima dva receptorja, TNF $\alpha$  receptor 1 (TNFR1) in TNF $\alpha$  receptor 2 (TNFR2). TNFR1 je izražen na vseh celicah človeka,

medtem ko je TNFR2 izražen na celicah imunskega sistema, endotelijskih celicah in mikroglijii. Vezava TNF $\alpha$  na TNFR1 omogoča celično preživetje preko NF- $\kappa$ B ali pa apoptozo preko aktivne kaspaze 8. Vezava TNF $\alpha$  na TNFR2 pa aktivira samo NF- $\kappa$ B in ne inducira apoptoze (Kitagawa in sod., 2015).

### **Interlevkin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

IL-1 $\beta$  je pomemben citokin, ki regulira izražanje genov, udeleženih v imunske odzive in vnetna stanja. IL-1 $\beta$  učinkuje preko receptorja tip 1 IL-1 (IL-1R1), ki je poznan tudi kot IL-1R/Toll-like receptor. Vezava IL-1 $\beta$  na receptor aktivira citoplazemske efektorske proteine kot so IL-1RacP, MyD88 in Tollp, ti pa naprej IRAK. IRAK v signalni kaskadi aktivira protein TRAF6. To je protein, ki je povezan z receptorjem za TNF. Kompleks IRAK-TRAF6 aktivirata različne proteine, ki vodijo v aktivacijo NF- $\kappa$ B in AP-1, ki regulirata gene, udeležene v vnetne procese (Chen in sod., 2015).

## **2.2.2 Značilnosti zrelih dendritičnih celic**

Za zrele DC je značilna fagocitna aktivnost, izražanje molekul MHC ter specifičnih površinskih označevalcev. Ti označevalci so razne kostimulatorne molekule (CD80, CD83, CD86) in kemokinski receptor 7 (CCR7). Zrele DC sintetizirajo in izločajo citokin IL-12p70 po ligaciji CD40/CD40L in prisotnosti IFN $\gamma$ . Zrele DC tako postanejo občutljive na kemokine, ki se proizvedejo v limfatičnih organih in tako migrirajo v bezgavke, v področja limfocitov T ter reagirajo z naivnimi limfociti T. Tako zrele DC vplivajo na pridobljene imunske ter prirojene obrambne odzive (Dauer in sod., 2003).

### **2.2.2.1 Pomembne kostimulatorne molekule na površini zrelih dendritičnih celic**

Kostimulatorne molekule se izražajo na površini APC in predstavljajo pomembno vlogo pri interakciji z limfociti T. Tako posredujejo pozitivne signale za aktivacijo, diferenciacijo, specifično odzivanje ter preživetje limfocitov T (Chen in Flies, 2013).

### **CD80 (B7-1) in CD86 (B7-2)**

CD80 in CD86 sta predstavnika B7 imunoglobulinske superdružine, ki delujeta tandemsko. Oba proteina sta membranska proteina tipa I in sta pomembni površinski molekuli na APC, ki omogočata aktivacijo naivnih limfocitov T (Taylor in sod., 2004; Radziewicz in sod., 2010). V fiziološki funkciji sta liganda za dva receptorja na površini naivnih limfocitov T. Prvi je CD28, drugi pa CTLA-4. CD28 ima pomembno funkcijo pri aktivaciji in preživetju limfocitov T. Je edini B7 receptor, ki je izražen na naivnih limfocitih T in sproži sintezo interleukinov. CTLA-4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) je inhibitorski receptor, ki inhibira delovanje limfocitov T, ko se nanj veže ligand (Girard in sod., 2014).

### **CD83**

CD83 je glikoprotein imunoglobulinske superdružine, ki se izraža na zrelih DC, aktiviranih limfocitih B in aktiviranih limfocitih T. Protein je prisoten tudi v citoplazmi monocitov, makrofagov in nezrelih DC. Funkcija proteina še ni povsem poznana. Raziskave so pokazale, da utišanje proteina z interferenčno RNA vodi do znižanja sposobnosti proliferacije limfocitov T, znižanja sinteze IFN $\gamma$ , in znižanja aktivnosti CD8<sup>+</sup> limfocitov T, ki so specifični za tumorske antigene (Aerts-Toegaert in sod., 2007).

### **CD40 ligand in CD40 receptor**

CD40 ligand (CD40L) sproži predvnetne procese na APC, kot so DC, monociti in limfociti B, ki izražajo površinsko molekulo CD40. CD40 je transmembranski protein tipa II s 45-50 kDa in je homologen receptorju za TNF. Ta ligand se izraža na aktiviranih CD4<sup>+</sup> limfocitih T in trombocitih, lahko ga izražajo tudi monociti, makrofagi, DC, NK, limfociti B, CD8<sup>+</sup> limfociti T, mast celice, bazofilne celice in endotelijske celice. Vezava CD40L na CD40 povzroči aktivno trimerno CD40 molekulo, ki aktivira signalno kaskado preko TRAF proteinov, ki omogočijo fosforilacijo različnih kinaz, kot so ERK, JNK, p38K. To vodi do aktivacije različnih transkripcijskih faktorjev, med drugim tudi NF- $\kappa$ B, NFAT in AP-1 (Conzelmann in sod., 2010).

#### 2.2.2.2 Pomembne inhibitorne molekule na površini zrelih dendritičnih celic

Inhibitorne molekule so ključni del imunskega sistema, ki vplivajo na inhibicijo limfocitov T ter s tem preprečujejo avtoimunost in škodljiv vplive vnetnih odzivov. Pomembne pa so tudi v tumorski imunosti, saj je eden od mehanizmov, s katerim se tumor izogiba imunskemu sistemu, signalizacija z inhibitornimi molekulami (Pico de Coana in sod., 2015).

##### **ILT-2, ILT-3 in ILT-4 (angl. immunoglobuline-like transcripts 2, 3 in 4)**

ILT so receptorji, ki se izražajo na mieloidnih in limfoidnih celicah. Imajo pomembno vlogo pri modulaciji funkcije limfocitov B ter signalni transdukciji med DC in limfociti T. So inhibitorni receptorji z značilno citoplazemsko domeno, zgrajeno iz tirozinov. Ta domena se fosforilira ob vezavi z ligandom in sproži inhibitorne odzive znotraj celice. Ligandi za ILT receptorje vključujejo MHC I razred ter sorodne molekule (Si in sod., 2012).

##### **PD-L1 (angl. programmed death ligand 1) in PD-1 (angl. programmed death 1)**

PD-L1 je protein, prisoten na površini APC in tumorskih celic. Veže se na PD-1 receptor, ki ga izražajo aktivirani limfociti T in B. Vezava PD-L1 in PD-1 povzroči razne imunosupresivne odzive ter omogoča izogibanje tumorskih celic imunskemu sistemu (Swaika in sod., 2015).

##### **HLA-G (angl. human leukocyte antigen-G)**

HLA-G je netipičen protein poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa. S svojimi imunosupresivnimi lastnostmi sproži toleranco pri vseh celicah imunskega sistema. Poznan je tudi kot pomemben protein pri vzdrževanju tolerance materinega imunskega sistema proti plodu. HLA-G ima tri receptorje, ki so prisotni na celicah imunskega sistema: ILT-2, ILT-4 in KIR2DL4 (Amiot in sod., 2015).

### **FasL in Fas receptor**

Fas ligand je transmembranski protein iz TNF superdružine. Zunajcelična domena liganda deluje kot homotrimerni ligand za vezavo na receptor, znotrajcelična domena pa sodeluje pri obratnem signaliziranju, naprimer pri aktivaciji limfocitov T deluje kot kostimulatorna molekula za TCR. Ligand je lahko vezan na membrano celice ali pa je topen. Na membrano vezan ligand deluje na celico z receptorjem apoptotično medtem ko topen ligand ne spodbudi apoptoze. Vezava na Fas receptor povzroči združitev smrtnih receptorjev in njihovih smrtnih domen. Aktivacija omogoči signaliziranje preko adaptorske molekule FADD (angl. *fas-associated death domain*), ki posredno ali pa neposredno aktivira TRAD (angl. *TNFR-associated death domain*). FADD imajo domeno, ki vežejo kaspazo 8 in kaspazo 10, ter tvori kompleks, imenovan DISC (angl. *death-inducing signaling complex*). Kompleks vodi v aktivacijo kaspaz, kar posledično vodi v apoptozo celice (Calmon-Hamaty in sod., 2015).

### 2.3 IL-12p70 IN IL-10

#### **IL-12p70**

IL-12p70 je heterodimer, ki je pomemben mediator imunskih odzivov in ključni mediator pri razvoju limfocitov Th1. Sestavljen je iz glikolizirane p40 in p35 podenote, ki sta povezani z disulfidno vezjo. Podenota IL-12-p40 ima homologno aminokislinsko zaporedje z receptorjem za IL-6. Bioaktivni IL-12p70 izločajo makrofagi, zrele DC in aktivni limfociti B. Je pomemben rastni faktor za limfocite T in NK, aktivira litično sposobnost NK ter stimulira sintezo IFN $\gamma$  pri mononuklearnih celicah periferne krvi. Receptor za IL-12p70 je citokinski receptor tipa I, sestavljen iz dveh verig: IL-12R $\beta$ 1 in IL-12R $\beta$ 2. Prva veriga je povezana z JAK Tyk2, druga pa z Jak2. IL-12 receptor signalizira preko različnih STAT proteinov (1, 3, 4 in 5) vendar večina bioloških odzivov na IL-12 signalizira preko STAT4 (ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets-Human IL-12 (p70); Interleukin Receptors, 2015).

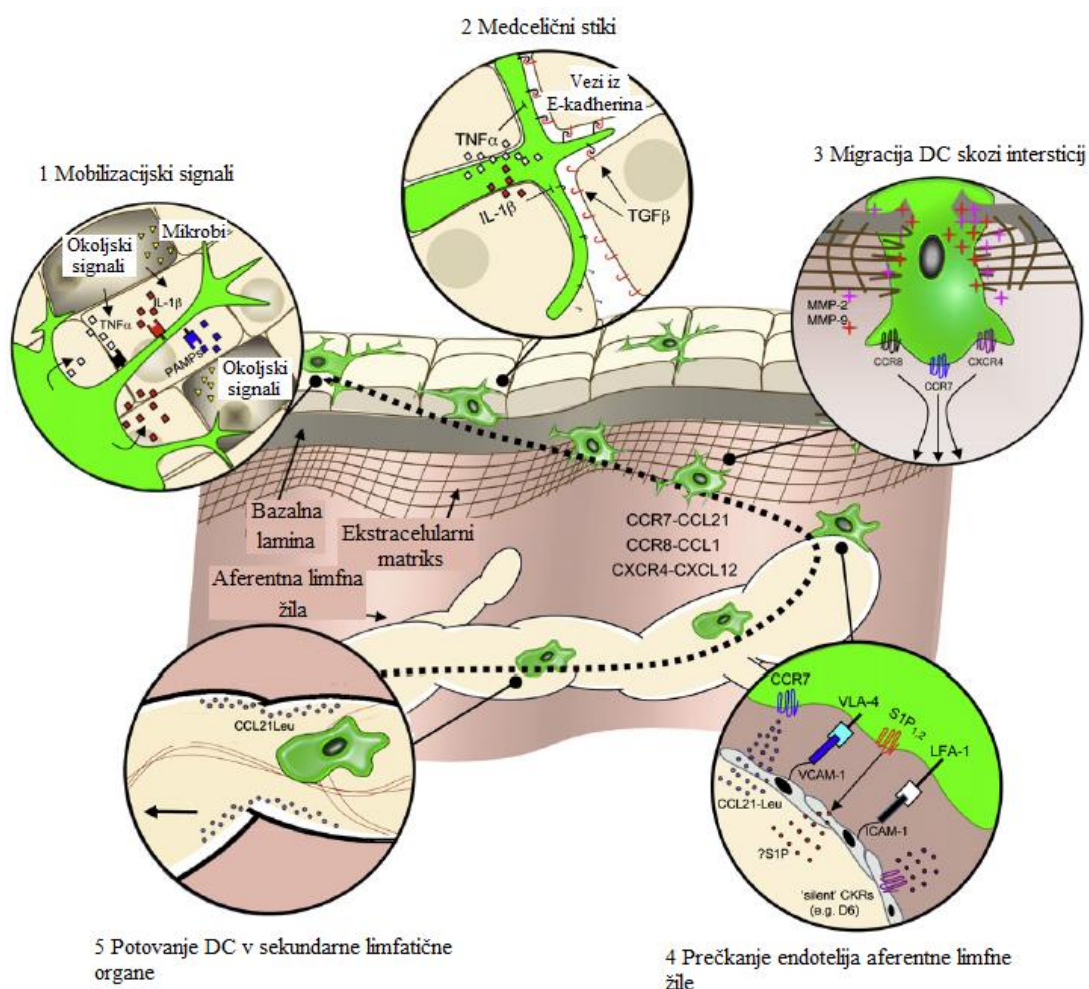
## **IL-10**

IL-10 je bil sprva opisan kot citokin, ki ga izločajo Th2 celice. Je inhibitor sinteze IFN $\gamma$  pri Th1 celicah zato je bil na začetku poimenovan kot CSIF (angl. *cytokine synthesis inhibiting factor*). Poglavitni vir IL-10 so makrofagi, pri katerih se lahko sproži sinteza IL-10 s signaliziranjem preko TLR, s TNF $\alpha$ , kateholamini in IL-1, drugi viri pa so še aktivni CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> limfociti T, aktivni monociti, mast celice in Ly-1 B celice. Njegovo delovanje inhibira sintezo vnetnih citokinov, kemokinov, adhezivnih molekul, kostimulatornih molekul in drugih. IL-10 ima več kot 80% aminokislinskih zaporedij homolognih z Epstein-Barr virusnim proteinom BCRFI. Receptor za IL-10 je citokinski receptor razreda II, sestavljen iz IL-10R $\alpha$  in IL-10R $\beta$  podenote. Receptor aktivira Tyr in Jak1 kinazi, ki aktivirata naprej STAT1a in STAT3 (ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets-Human IL-10; Interleukin Receptors, 2015).

## 2.4 MIGRACIJA DENDRITIČNIH CELIC

Diferencirane DC in njihovi prekurzorji krožijo po krvi in nato potujejo na mesta delovanja v perifernih tkivih. Po aktivaciji z antigeni potujejo v sekundarne limfatične organe, kjer aktivirajo limfocite ter s tem vplivajo na aktivacijo pridobljenega imunskega sistema. Migracija DC oziroma njihovih prekurzorjev skozi njihov življenjski cikel zajema migracijo z mesta nastanka (kostni mozeg, morda tudi priželjc) v krvožilje, izstop iz žil ter migracija v periferna tkiva na mesta delovanja, vstop zrelih DC v limfne ali pa krvne žile ter s tem migracija v sekundarne limfatične organe. Migracijo DC omogočajo izražene adhezivne molekule na površini celic in receptorji, ki zaznavajo kemoatraktivne signale. Nezrele DC izražajo na svoji površini receptorje za kemokine CCL2, CCL5 in CCL20, ki jih pripeljejo v tkiva na mesto delovanja. Zrele DC v tkivih nato izražajo receptor CCR7, na katerega se vežeta kemokina CCL19 in CCL21. Ta receptor in njegova liganda vodijo zrele DC v bezgavke. Pri vstopu v in iz žile igrajo ključno vlogo adhezivne molekule, med katerimi so pomembni integrini in selektini. Pomembni integrini, ki sodelujejo pri migraciji DC so LFA-1, VLA-4, Mac-1 in  $\alpha\beta 7$ . Ti integrini interagirajo z različnimi adhezivnimi molekulami na površini epitelijev, kot so ICAM-1, VCAM-1 in MAdCAM ter sodelujejo pri adheziji na žilni endotel. Selektine delimo v tri skupine: P, E in L. P in E-

selektina se izražata na aktiviranem endoteliju, medtem ko se L-selektin izraža na površini DC. Interakcija med selektini na površini celic omogoča adhezijo celic, čemur sledi izstop iz žile z diapedezo. Pomembna signala za izražanje CCR7 na zrelih DC sta IL-1 $\beta$  in TNF $\alpha$ . Pomemben pa je tudi TREM (angl. *triggering receptors expressed on myeloid cells-2*), ki tudi regulira izražanje CCR7 in pa kostimulatorne molekule. Pri potovanju DC skozi kožo (slika 3), interagirajo s keratinociti preko molekul E-kadherina. Na poti skozi ekstracelularni matriks izločajo encime metaloproteinaze, še posebej MMP-2 in MMP-9 za razgradnjo ekstracelularnega matriksa. Pri vstopu v žile sodelujejo enake molekule kot pri izstopu iz žile (VLA-4, LFA-1...). Pri prehodu skozi endotel DC interagirajo s tesnimi in adherentnimi stiki endotelnih celic in tako vstopijo v lumen žile ter potujejo v sekundarne limfatične organe (Alvarez in sod., 2008).



Slika 3: Primer migracije zrelih dendritičnih celic iz epitelijskega tkiva v sekundarne limfatične organe (prirejeno po Alvarez in sod., 2008)

## 2.5 IMUNOLOŠKA SINAPSA

Za optimalno aktivacijo limfocitov T so s strani DC potrebni trije tipi signaliziranja. Prvi signal predstavljajo peptidi znotraj MHC II, drugi signal predstavljajo kostimulatorne molekule na površini DC, tretji signal pa je izločanje citokina IL-12p70 (Zobywalski in sod., 2007). Zrele DC za uspešno signaliziranje tvorijo z naivnimi limfociti T imunološko sinapso. Imunološko sinapso sestavljajo področja adhezivnih molekul in proteinske komponente, povezane s TCR. Ta področja imenujemo supramolekularni aktivacijski skupki ali SMAC (angl. *supramolecular activation clusters*). Ločimo dve vrsti SMAC. Prva je centralni SMAC, ki je bogat s TCR ter periferni SMAC, ki je bogat z LFA-1 proteinom (angl. *lymphocyte function associated-1*) in proteinom talinom na limfocitih T. Na APC pa predstavljajo centralni SMAC predeli, bogati z MHC molekulami ter periferni SMAC, ki je bogat z molekulami ICAM-1 (angl. *intercellular adhesion molecule-1*) (slika 4). V imunološki sinapsi se pojavljajo tudi kostimulatorne molekule na DC kot so CD80, CD83, CD86. Ob tvorbi imunološke sinapse se kompleks MHC-TCR pomakne v središče sinapse. To naj bi omogočal aktinski citoskelet, ki tudi omogoča lokalizacijo ostalih pomembnih receptorjev v sinapsi in tako oblikuje sinaptične rafte (Dustin, 2002).

### **LFA-1 in ICAM-1**

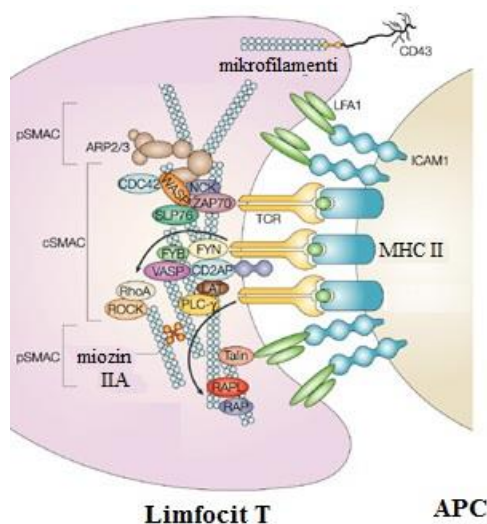
LFA-1 je integrin, ki igra ključno vlogo pri migraciji limfocitov. Izraža se na limfocitih T in B, makrofagih ter nevtrofilcih. Veže se na ICAM-1 in med drugim omogoča pritrjevanje limfocitov na steno žil ter migracijo v periferne bezgavke. Je nekakšen sklopitveni protein, ki na zunanji strani plazmaleme veže ICAM-1, na notranji strani pa se veže na aktinski citoskelet ter tako omogoča adhezijo in migracijo celice (Ishibashi in sod., 2015). ICAM-1 je glikoprotein na površini različnih tipov celic kot so endotelijske celice, makrofagi, DC, fibroblasti, epitelne celice in gladke mišične celice žil. Je ligand za LFA-1 in spada v superdružino imunoglobulinov (Lim in sod., 2015).



### **Interakcija MHC-TCR**

MHC molekule so površinski celični proteini, ki imajo ključno vlogo v imunskem sistemu vretenčarjev saj tako organizem z njihovo funkcijo loči lastne antigene od tujih. Ločimo MHC I in MHC II razred. Prvega izražajo vse celice z jedrom ter predstavljajo antigene CD8<sup>+</sup> limfocitom T. MHC II se izraža na specializiranih APC ter predstavljajo antigene CD4<sup>+</sup> limfocitom T. MHC molekule imajo imunoglobulinsko strukturo. MHC I je sestavljen iz ene  $\alpha$  verige, ki je sestavljena iz treh domen:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  in  $\alpha_3$ . Na  $\alpha_1$  domeno je vezan  $\beta$ -mikroglobulin.  $\alpha_3$  domena veže kompleks na celično membrano, predel med  $\alpha_1$  in  $\alpha_2$  pa predstavlja vezavno mesto za antigen. MHC II je zgrajen iz dveh verig,  $\alpha$  in  $\beta$ . Vsaka veriga ima dve podenoti:  $\alpha_1$  in  $\alpha_2$  ter  $\beta_1$  in  $\beta_2$ .  $\alpha_2$  in  $\beta_2$  podenoti vežeta MHC II molekulo na membrano celice,  $\alpha_1$  in  $\beta_1$  pa predstavljata vezavno mesto za antigen (Roitt in sod., 1998). Aktivacija CD4<sup>+</sup> limfocitov T temelji na interakciji med TCR na površini limfocitov T ter MHC II kompleksom, izraženim na specializiranih APC. Dendritične celice kot specializirane APC vzorčijo antigene, jih po endocitotski poti predelajo in jih izražajo preko molekul MHC II na svoji površini. Po prevzemu antigenov se oblikujejo endosomi, ki vsebujejo zajete antigene. Takšni endosomi tvorijo intraluminalne vezikle (ILV), ki oblikujejo multivezikularna telesca (MVB), ki se v končni fazi zlijejo z lizosomi za lizosomsko razgradnjo. MHC II molekule se v DC nahajajo v MIIC organelih (angl. *MHC II containing compartments*). MHC II molekule se sintetizirajo v endoplazemskem retikulumu in so povezane z Ii proteinom (angl. *invariant chain*). Vloga tega proteina je preprečevanje prezgodnje vezave peptidov na molekulo MHC II ter sodeluje pri transportu molekul na površino celice ali pa v MIIC. Na novo sintetizirane molekule MHC II se preko golgijevega omrežja transportirajo na celično površino ali pa v MIIC, vključno z endosomi, kjer se vežejo z antigeni. Molekule MHC II, ki so dosegle celično površino se preusmerijo v MIIC po endocitotski poti. Kompleks MHC II-antigen se nato transportira na celično površino ali pa v multivezikularna telesca. MHC II molekule, ki so v multivezikularnih telescih, se razgradijo z lizosomi. Po izpostavitvi antigena na površini, se kompleks endocititsko vrne in razvršča v MIIC, od kjer se manjši procent molekul lahko ponovno izpostavi na celični površini, večina pa se razgradi z lizosomom (Hennies in sod., 2015).

Receptorska enota limfocitov T ima dve podenoti: kompleks TCR, ki se poveže s polimorfno regijo MHC molekul ter CD4<sup>+</sup> ali pa CD8<sup>+</sup> molekulo, ki se veže na konstantni del MHC molekule. CD4<sup>+</sup> limfociti T prepoznavajo MHC molekule razreda II in so značilni za celice pomagalk, medtem ko CD8<sup>+</sup> molekule prepoznavajo MHC molekule razreda I in se izražajo na citotoksičnih limfocitih T. TCR je heterodimer iz  $\alpha$  (49 kDa) in  $\beta$  (43 kDa) podenote. TCR ni fizično povezan s CD4<sup>+</sup> oziroma CD8<sup>+</sup> molekulo, je pa nekovalentno povezan s CD3 molekulo (Reinherz in Wang, 2015). Ključna vloga koreceptorskih molekul je v pomiku tirozinske kinaze Ick v področje kompleksa MHC-TCR, kar privede do fosforilacije ITAM (angl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) na citoplazemski strani molekule CD3. Fosforilirana CD3 molekula aktivira Zap-70 protein kinazo (angl. *zeta chain associated protein kinase*), ki fosforilira različne proteine v signalni kaskadi, med katerimi sta tudi transmembranski adaptorski protein LAT (angl. *linker for the activation of T cells*) in citoplazemski protein SH2 (angl. *src homology 2*). Signalna kaskada vodi do izražanja genov, ki so vključeni v aktivacijo limfocitov T (Smith-Garvin in sod., 2009).



Slika 4: Imunološka sinapsa med naivnim CD4<sup>+</sup> limfocitom T in zrelo dendritično celico (prirejeno po Vicente-Manzanares in Sanched-Madrid, 2004)

## 2.6 DENDRITIČNE CELICE KOT PROTITUMORSKA VAKCINA

Dendritične celice s svojimi fiziološkimi funkcijami predstavljajo uporabno orodje za razvoj protitumorskih cepiv. Pri odstranjevanju tumorskih celic je ključen celični odziv z mehanizmi citotoksičnosti. Lastnosti DC, kot so zrelostni status, migratorni potencial in sinteza citokinov so ključne za polarizacijo CD4<sup>+</sup> limfocitov Th1 in citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocitov T, ki omogočajo učinkovit celični imunski odziv. Zrele DC v tkivih izražajo na svoji površini kostimulatorne molekule ter se odzivajo na kemokine, proizvedene v bezgavkah. S sintezo citokina IL-12p70 inducirajo tumor-specifične Th1 limfocite in citotoksične T limfocite in omogočajo zaviranje tumorske rasti. Tako so ključne lastnosti DC, ki se uporabljajo kot protitumorsko cepivo, visoka imunostimulirajoča funkcija, migratorna aktivnost in visoka sposobnost sinteze citokina IL-12p70 (Mailliard in sod., 2004).

Tumorje v zgodni fazi razvoja odstranjuje imunski sistem. Tumorske celice pa se lahko izognejo uničenju tako, da blokirajo funkcije imunskih celic, razvojem tolerance imunskih celic do tumorskih celic in tvorbo tumorskih rastnih dejavnikov. Učinkovito protitumorsko cepivo temelji na dobri aktivaciji DC. Ta vključuje pomembne lastnosti DC kot so zajem in predstavitev tumorskih antigenov, ki so v laboratorijskih pogojih dodani kot del cepiva in sposobnost aktivacije specifičnih odzivov limfocitov T v sekundarnih limfatičnih organih proti tumorskim celicam. Pri tem je pomembna tako aktivacija CD8<sup>+</sup> kot tudi CD4<sup>+</sup> limfocitov T, pri čemer vplivajo DC na izražanje specifičnih kemokinskih receptorjev in integrinov na limfocitih T ter jih s tem usmerjajo v tkiva. Aktivirane DC sprožijo ob tem tudi ustrezno sintezo specifičnih protiteles in odzive NK, ki sodelujejo pri tumorski imunosti. Te lastnosti so ključne za imunoterapijo, ki temelji na DC. Razvoj cepiva poteka z izolacijo avtolognih monocitov ali DC iz pacienta, čemur sledi diferenciacija monocitov v nezrele DC in zorenje DC ob dodatku tumorskih antigenov ter v končni fazi vrnitev celic v pacienta. Limfociti T in DC na svoji površini izražajo tudi inhibitorne molekule, ki inhibirajo delovanje limfocitov T. Takšne molekule izražajo tudi tumorske celice v svojem mikrookolju, ki ga tvorijo tumorske celice, fibroblasti, endotelijske celice in infiltrirajoče imunске celice skupaj z ekstracelularnim matriksom ter s tem inhibirajo aktivnost

protitumorskih odzivov imunskega sistema. Zaradi inhibitornih učinkov tumorskih celic na imunski sistem z izražanjem inhibitornih molekul, se pri protitumorskih vakcinah poslužujejo kombinirane imunoterapije. Kombinirana imunoterapija vključuje poleg cepiva z aktiviranimi DC tudi blokadna monoklonska protitelesa proti inhibitornim molekulam in njihovim ligandom. S tem se doseže boljša učinkovitost imunskih celic v tumorskem mikrookolju (Vasaturo in sod., 2013).

### **2.6.1 Diferenciacija monocitov v dendritične celice**

Dendritične celice v raziskovanju za protitumorska cepiva pridobivamo iz monocitov avtologne periferne krvi v dveh korakih. Prvi je diferenciacija monocitov v nezrele DC ob dodatku GM-CSF in IL-4 za 5-6 dni. V drugem koraku DC zorimo ob dodatku citokinov in različnih dodatkov za 24-48 ur (Lichtenegger in sod., 2012).

#### **GM-CSF (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)**

GM-CSF je pomemben citokin, ki deluje kot rastni faktor v procesih hematopoeze in modulator imunskega sistema. Sintetizira se v različnih tipih celic, kot so fibroblasti, endotelijske celice, limfociti T in makrofagi (Shi in sod., 2006).

#### **Interlevkin 4 (IL-4)**

IL-4 ima pomembno fiziološko funkcijo pri usmerjanju odzivov Th2 celic ter pri uravnavanju alergijskih reakcij. Izdelujejo ga mastociti in aktivirane celice T. Igra pomembno vlogo pri sintezi IgE v limfocitih B. IL-4 preprečuje aktivacijo makrofagov ter inhibira večino učinkov IFN $\gamma$ . Je tudi pomemben rastni faktor za mastocite (Vozelj, 2000).

### **2.6.2 Aktivacija citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocitov T (CTL)**

Dendritične celice najpogosteje aktivirajo citotoksične CD8<sup>+</sup> limfocite T (angl. *cytotoxic lymphocyte T* ali *CTL*) preko predhodne aktivacije CD4<sup>+</sup> limfocitov T. Aktivni CD4<sup>+</sup> limfociti T izločajo IFN $\gamma$ , ki je pomemben za povečano izločanje IL-12p70 in kemokinov s strani zrelih DC, ki bodo interagirale s CTL. Prav tako IFN $\gamma$  pri zrelih DC inhibira

izločanje IL-10, ki je inhibitorni citokin. V primeru znotrajceličnih parazitov in tumorskih celic predstavljajo DC antigene CTL v procesu »cross-priming«. V tem primeru DC predstavijo antigene, vezane na MHC II naivnim CD4<sup>+</sup> limfocitom T. Interakcija CD40L na CD4<sup>+</sup> limfocitih T in CD40 receptorjem na DC ter predhodna aktivacija preko TLR vodi do izražanja MHC I razreda in CD80 ter CD86, ki omogočajo predstavljanje antigenov ter aktivacijo CTL. Pri interakciji DC in CTL so pomembni trije signali, podobno kot pri interakciji s CD4<sup>+</sup> limfociti T. Prvi signal predstavljajo kompleks antigen in MHC razreda I, drugi signal so kostimulatorne molekule, ki so enake kot pri interakciji s CD4<sup>+</sup> limfocitih T, tretji signal pa predstavljajo citokini (IL-12, IFN razreda I in IL-2). PRR so ključnega pomena za izražanje kostimulatornih molekul na površini DC in s tem interakcijo s CTL. Poleg TLR, predvsem TLR3 in TLR9, so za ojačane odzive CTL pomembni še lektinski receptorji tipa C in znotrajceličen receptor RIG-1. Poleg fizičnega stika DC in CTL pa so za aktivacijo CTL pomembni razni kemokini in njihovi receptorji. Odzivnost CTL s kemokinskimi receptorji je odvisna od signaliziranja z IFN $\gamma$ , ki ga izločajo aktivni CD4<sup>+</sup> limfociti T. Na APC in limfocitih T je pomemben CCR7 receptor, ki vodi celice v sekundarne limfatične organe. CCR5 je pomemben za odzivanje CTL saj ligande (CCL3 in CCL4) za ta receptor izločajo aktivirane DC, ki so predhodno aktivirale CD4<sup>+</sup> celice ter same aktivirane CD4<sup>+</sup> celice. CCR4 je pomemben kemokinski receptor za CCL17. CCL17 izločajo aktivirane DC, ki bodo interagirale s CTL. V signaliziranje so udeleženi še CXCR3 in XCR1 receptorji (A. Thaiss in sod., 2011). Aktivirani CTL napadejo tarčne celice na dva načina: s proteazami, imenovanimi grancimi ali pa z ligandi TNF superdružine, v katero spada tudi sistem Fas-FasL. Grancimi so skupina serinskih proteaz, ki so udeleženi v citotoksične mehanizme. Proizvajajo jih CTL in NK. V CTL se nahajajo znotraj citotoksičnih granul. Ko CTL zazna tarčno celico, se citotoksične granule z aktivnostjo sistema mikrotubulov premaknejo na stran celičnega stika med CTL in tarčno celico ter se sprostijo v imunološko sinapso med celicama. Vsebina citotoksičnih granul zajema grancime ter perforine. Perforini so proteini, ki se po sprostitvi iz granul vežejo na membrano tarčne celice ter oblikujejo pore za dostop grancimov do citoplazme tarčne celice. Iz skupine grancimov po zastopanosti najbolj izstopata grancim A in B. Grancim A ob vstopu v celico povzroči znižanje mitohondrijskega transmembranskega potenciala in poveča koncentracijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Zvišanje ROS vodi do

translokacije kompleksa SET iz endoplazmatskega retikuluma v jedro celice, kjer je verjetno udeležen v izražanje genov, povezanih z oksidativnim stresom. Pri tem pride do fragmentacije DNK in porušene strukture jedra, kar vodi v celično smrt. Ko grancim B preide v citoplazmo tarčne celice, povzroči apoptozo celice preko dveh poti. Prva zajema signalno pot preko proteina BID, druga pa je direktna aktivacija kaspaz 3 in 7. Protein BID povzroči oligomerizacijo proteina BAX in BAK v zunanji mitohondrijski membrani. Posledica je permeabilnost mitohondrijske membrane, skozi katero se sprosti citokrom c, ki je ključen za aktivacijo kaspaznih poti. Aktivirane kaspazne poti vodijo v programirano celično smrt tarčne celice. Grancim B pa vpliva tudi na zaviranje mnogih proteinov, ki v normalni celici preprečujejo programirano celično smrt ter tako aktivirajo procese, ki pripeljejo do nje (Cullen in sod., 2010).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Biološki material**

Zgoščeni levkociti zdravih prostovoljnih krvodajalcev različnih spolov in krvnih skupin, ki so bili obdelani in pripravljene z levkoferezo.

##### **3.1.2 Kemikalije**

- Sterilen dimetilsulfoksid DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Nemčija)
- Fetalni goveji serum (Gibco, ZDA)
- Rastopina triptanskega modrila (Gibco, Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- Fikol (Cedarlane, Kanada)
- Antibiotik gentamicin (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Brezserumsko gojišče CellGro® (CellGenix™, Nemčija)
- Pufer DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (PAA Laboratories GmbH, Avstrija)
- GM-CSF (PeproTech EC, ZDA)
- IL-4 (PeproTech EC, ZDA)
- IFN $\alpha$  (PeproTech EC, ZDA)
- IFN $\gamma$  (PeproTech EC, ZDA)
- TNF $\alpha$  (PeproTech EC, ZDA)
- IL-1 $\beta$  (PeproTech EC, ZDA)
- Poliinozinična:policitidilična kislina pI:C; agonist TLR3 (Invivogen, Kalifornija)
- Imidazokinolin R848; agonist TLR8 (Invivogen, Kalifornija)
- Lipopolisaharid (Sigma-Aldrich, ZDA)
- $\alpha$ TCR makrokroglice (Miltenyi Biotec, Nemčija)
- multimerni CD40 ligand (Miltenyi Biotec, Nemčija)

- BioLegend Human IL-12 (p70) ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe set (BioLegend<sup>®</sup> European Distribution Center, Velika Britanija)
- BioLegend Human IL-12 (p70) ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe set (BioLegend<sup>®</sup> European Distribution Center, Velika Britanija)
- imunomagnetna protitelesa CD14 (Miltenyi Biotec, Nemčija)
- protitelesa za pretočno citometrijo proti kostimulatornim (CD80, CD83, CD86, HLA-DR in CCR7) in inhibitornim molekulam (ILT-2, ILT-3, ILT-4, PD-L1, HLA-G in FasL) (Biogeneral, ZDA)
- set BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Bioscience, Kalifornija)

### 3.1.3 Laboratorijska oprema

- Svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse Ti - S, Japonska)
- Bürker-Türkova števna ploščica (Blau Brandt, Nemčija)
- Hladilnik in zamrzovalnik (Electrolux, Nemčija)
- Inkubator (Heraeus, Nemčija)
- Komora z laminarnim pretokom zraka Iskra (PIO, Slovenija)
- Avtomatske pipete: 0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 10 - 100 µl; 100 - 1000 µl (Eppendorf, Nemčija)
- Plastični nastavki za pipete: do 10 ul, 100 ul, 1000 ul (Eppendorf, Nemčija)
- Pipete boy (Integra science, Švica)
- Serološke pipete 10 in 25 ml (Greiner Bio One, Avstrija)
- Avtomatski števec za štetje celic Vi-Cell<sup>TM</sup> XR, Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, ZDA)
- Centrifuga Jouan CR4i (Thermo Electron Industries SAS, Francija)
- Centrifugirke: 15 in 50 ml (Sarstedt, Nemčija)
- Mikrotitrne ploščice za gojenje celic in test migracije (Thermo Fischer Scientific, Danska)
- Stresalnik (IKA Works INC, ZDA)
- Namizna centrifuga Mini SPIN PLUS (Eppendorf, Nemčija)



- Pasterijeve pipete (Copan, ZDA)
- Magnetno stojalo, magnet in kolona MACS MicroBeads (Miltenyi Biotec, Nemčija)
- Naprava za spiranje 96-mikrotitrskih ploščic hydro FLEX TECAN (Tecan, Švica)
- Spektrofotometer (Epoch Biotek, ZDA)
- Pretočni citometer FACS Calibur (Beckton Dickinson, ZDA)

### 3.1.4 Sestava gojišča

Gojišče CellGro<sup>®</sup> je gojišče, namenjeno gojenju humanih dendritičnih celic, pridobljenih z diferenciacijo CD14<sup>+</sup> monocitov ter ekspanziji limfocitov T. Sestava gojišča CellGro<sup>®</sup>:

- osnovne sestavine: soli, aminokisljine, vitamini, pufri, fenol rdeči pH indikator, L-glutamin
- humani proteini: transferin (pridobljen iz človeške plazme), albumin (pridobljen iz človeške plazme), inzulin (humani rekombinantni produkt kvasovk)
- osmolarnost: 260 – 320 mOsm/kg H<sub>2</sub>O
- pH: 7,2-7,5
- endotoksin:  $\leq 1$  EU/ml (GMP Serum-free Dendritic Cell Medium Data Sheet, 2015)

Osnovnemu gojišču smo dodali 1% človeški AB- serum.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija mononuklearnih celic perifere krvi (PBMC)

Mononuklearne celice periferne krvi ali PBMC (angl. *peripheral blood mononuclear cells*) smo izolirali iz zgoščenih levkocitov (angl. *buffy coat*) z uporabo centrifugalnega ločevanja s fikolom. Uporabljali smo zgoščene levkocite zdravih prostovoljnih krvodajalcev različnih spolov in krvnih skupin. Uporabljali smo sveže zgoščene levkocite, ki so bili obdelani in pripravljani z levkoferezo na dan izolacije PBMC. Zgoščeni levkociti se nahajajo v krvni vrečki, v kateri je približno 50 ml volumna le-teh. V nadaljevanju je potrebno zgoščene

levkocite iz vrečke za kri prenesti v posodico za kulture. Pri postopku smo imeli sterilno izvodilo vrečke in škarje. S škarjami smo prijeli izvodilo vrečke ter zarezali, da smo spustili v cevko zrak. Nato smo odrezali izvodilo do konca, primerno prijeli vrečko in vsebino prelili v posodico za kulture. Ko smo imeli zgoščene levkocite v posodici za kulture, smo jih razredčili s pufrom DPBS do oznake 175 ml. Za ločevanje mononuklearnih celic od ostalih komponent smo uporabili gradientno centrifugiranje s fikolom. Pomembno je, da je fikol pred uporabo ogret na sobno temperaturo saj je optimalna gostota fikola za izolacijo pri sobni temperaturi. Fikol smo vnašali v 50 ml centrifugirke. Pomembno je razmerje med fikolom in krvjo. To znaša 1 : 2. Fikol smo zaradi boljšega izkoristka redčili s pufrom DPBS. Tako smo dodali v centrifugirko 11.5 ml fikola, 1 ml pufru DPBS ter 25 ml redčenih zgoščenih levkocitov. Zgoščene levkocite smo vnašali v centrifugirke s serološkimi pipetami z avtomatskim pipetnim sistemom »pipet boy«. Njegovo hitrost smo nastavili na minimalno ter spuščali vsebino počasi in pod kotom 45° tik nad gladino redčenega fikola. Tako pripravljeno mešanico fikola in zgoščenih levkocitov smo centrifugirali 15 min pri pospešku 950 x g. Pri tem je pomembno, da sta pospešek in zaviranje centrifuge na minimalni vrednosti, da se zgoščeni levkociti in fikol ne pomešajo med seboj. Po centrifugiranju dobimo izrazite komponente krvi. V peletu so zbrani eritrociti ter večina granulocitov. Nad peletom se nahaja plast fikola. Nad fikolom so zbrane mononuklearne celice periferne krvi ter bazofilne celice. Nad to plastjo pa se nahaja plazma, ki vsebuje še določen delež trombocitov. S pasterjevimi pipetami smo pobirali plast PBMC ter jih prenašali v nove 50 ml centrifugirke. V eno centrifugirko smo prenašali PBMC iz po dveh centrifugirk po ločevanju s fikolom. Zbrane mononuklearne celice smo nato redčili s pufrom DPBS do oznake 50 ml. To je postopek spiranja celic. Po ločitvi s fikolom smo centrifugirali 10 min pri 660 x g ter največjem pospešku in zavori centrifuge (oznaka 5). Po centrifugiranju smo odlili supernatant s posamezne centrifugirke ter resuspendirali pelete celic. Najprej smo resuspendirali prvo centrifugirko ter s to celično suspenzijo še ostali centrifugirki. Nato smo dodali pufer DPBS do oznake 50 ml ter ponavljali spiranje celic. V tej fazi smo centrifugirali 10 min pri 300 x g ter polnem pospešku in zaviranju centrifuge. Ta postopek smo ponavljali do zbistritve supernatanta. To smo dosegli po približno treh spiranjih od ločitve fikola.

### 3.2.2 Imunomagnetna izolacija monocitov

Po izolaciji PBMC sledi imunomagnetna izolacija monocitov. Pred postopkom se pripravi 0.5% fetalni bovini serum ali FBS (angl. *fetal bovine serum*) za spiranje kolone. To smo pripravili v 50 ml centrifugirki tako, da smo dodali 30 ml hladnega DPBS ter 150  $\mu$ l FBS. Serum mora biti ohlajen na 4 °C. Na podlagi velikosti celičnega pelta PBMC se določi volumen, v katerem se resuspendira pelt z 0.5% FBS. Ta volumen znaša okoli 700  $\mu$ l. S tem volumnom smo celice fino resuspendirali ter jih za 10 min postavili v hladilnik na 4 °C. Po 10 min smo dodali magnetne mikrokroglice s protitelesi proti CD14<sup>+</sup> molekulam. Gre za CD14<sup>+</sup> protitelesa, vezana na mikrokroglice železovega oksida (FeO). Volumen protiteles smo dodali desetkrat manj kot je volumen, v katerem smo resuspendiral celice. Ko smo dodali protitelesa na magnetnih delcih, smo vzorec 20 min ohlajali v hladilniku. Med inkubacijo smo pripravili ločevalno kolono. Najprej smo pripravili magnetno stojalo z magnetom MACS, na katrega smo dodali LD MACS kolono. V tako pripravljeno kolono smo vnesli 2 ml 0.5% FBS, da smo kolono omočili. Po 20 min inkubaciji smo vzorcu dodali 20 ml hladnega pufra DPBS ter centrifugirali pri 400 x g, 7 min ter zavora/pospešek 5. Po centrifugiranju smo resuspendirali pelet v 950  $\mu$ l 0.5% FBS ter nanесли na kolono. Po izteku smo dodali 1 ml 0.5% FBS ter nato še dvakrat po 5 ml. Odpadno tekočino smo zbirali v centrifugirko pod kolono. Po izteku smo na kolono dodali približno 3 ml gojišča CellGro<sup>®</sup> ter iztislili monocite v novo centrifugirko.

### 3.2.3 Štetje monocitov z Bürker-Türkovo števno ploščico

Po imunoagnetni izolaciji monocitov smo preverili številčno uspešnost izolacije monocitov. Pripravili smo Bürker-Türkovo števno ploščico. Omočili smo robove števne ploščice ter nanjo položili krovno stekelce. Vzorec monocitov smo pred štetjem barvali s tripanskim modrilom. Zaradi pričakovanega velikega števila celic smo vzorec redčili desetkrat. Pri tem smo uporabili 180  $\mu$ l tripanskega modrila ter 20  $\mu$ l vzorca celic. Vzorec smo dobro premešali v tripanskem modrilu ter nanесли na števno ploščico. Kapljico smo nanесли na rob krovnega stekelca, pri čemer je kapilarni tok potegnil kapljico pod krovnik. Pod mikroskopom smo prešteli 12 kvadratkov nad gosto mrežo ter 13 kvadratek, ki se

nahaja nad dvanajstim in 12 kvadratkov pod gosto mrežo. Vsak kvadrataček ima površino 0,0025 mm<sup>2</sup>. Upoštevali smo tudi celice, ki so ležale na zgornji in levi meji posameznega kvadratka. Število celic v vzorcu smo izračunali po enačbi:

$$\text{Št. celic} = (N/\text{fr}) \times V(\text{ml}) \times 10^6 \quad \dots(1)$$

N = število prešteti celic v 25 kvadratih

fr = faktor redčenja; 180 µl tripanskega modrila : 20 µl vzorca celic = 10 X

V = volumen vzorca v mililitrih

### 3.2.4 Diferenciacija monocitov v nezrele dendritične celice

Diferenciacija monocitov v nezrele DC poteka pet dni ob dodatku ustreznih citokinov. Za diferenciacijo v DC sta potrebna citokina IL-4 ter GM-CSF. Gojili smo 24 x 10<sup>6</sup> monocitov v mikrotitrski plošči s šestimi vdolbinami. V posamezni vdolbini smo gojili 4 x 10<sup>6</sup> monocitov, v gojišču CellGro<sup>®</sup>. Celice smo gojili tako, da smo imeli 1 x 10<sup>6</sup> celic v 1.6 ml gojišča. Tako smo imeli v posamezni vdolbini 4 x 10<sup>6</sup> monocitov v 6.4 ml gojišča CellGro<sup>®</sup>. V posamezno vdolbino smo dodali citokina IL-4 in GM-CSF. IL-4 smo dodali 1000 U/ml, GM-CSF pa 800 U/ml. Citokina sta bila raztopljena tako, da je bila začetna koncentracija 1000 in 800 U/µl. Tako smo v vsako vdolbino dodali 6.4 µl posameznega citokina. Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo gojili v inkubatorju pri 37 °C ter 5% CO<sub>2</sub>. Po dveh dneh smo celicam menjali gojišče. Iz vsake vdolbine smo odpipetirali polovico gojišča v centrifugirko, kar je v našem primeru znašalo 3.2 ml ter centrifugirali pri 400 x g, 7 min, zavora/pospešek 5. Celice so v vdolbinah ležale na dnu, nekatere so pa bile tudi suspendirane v gojišču, zaradi česar smo preventivno centrifugirali, da smo se izognili morebitnim izgubam celic. Nato smo morebitni pelet celic resuspendirali v svežem gojišču ter vnesli po 3.2 ml v posamezno vdolbino. Na koncu smo v posamezno vdolbino dodali še začetne koncentracije IL-4 in GM-CSF, kar je znašalo 6.4 µl posameznega citokina na vdolbino. Celice smo dali gojit v inkubator pri 37 °C ter 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.5 Zorenje nezrelih dendritičnih celic

Po petih dneh smo pridobili diferencirane nezrele DC, kar smo na začetku preverjali tudi z dokazovanjem posameznih označevalcev zorenja na površini celic (rezultati niso prikazani). Celice smo dobro sprali s površin mikrotitrne plošče s pufrom DPBS. Celice smo zbirali v 50 ml centrifugirki. Po spiranju smo celice centrifugirali pri 400 x g, 7 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo pelet v prvi centrifugirki resuspendirali z 900 µl gojišča CellGro<sup>®</sup> ter s to suspenzijo še celice v drugi centrifugirki. Ponovno smo pripravili celice za štetje v Bürker-Türkovi števni ploščici. Vzorec smo redčili petkrat v tripanskem modrilu (20 µl vzorca v 80 µl tripanskega modrila). Število celic smo izračunali po enačbi 1. Z informacijo o številu DC smo določili izkoristek celic (rezultati niso prikazani). Dendritične celice smo gojili v mikrotitrskih ploščah, kjer smo jih razvrstili v različne skupine:

- NT (netretirana skupina nezrelih DC)
- LPS/INF $\gamma$  (lipopolisaharid in interferon gama)
- IC (poliinozinična:policitidilična kislina)
- $\alpha$ DC1 (patent Pawla Kalinskega; poliinozinična:policitidilična kislina ob dodatku vnetnih citokinov TNF $\alpha$ , INF $\alpha$ , INF $\gamma$  in IL-1 $\beta$ ; Pawel Kalinski, 2011, Mature type-1 polarized dendritic cells with enhanced IL-12 production and methods of serum-free production and use, United States Patent Kalinski, US 7,972,847 B2, 23 str.)
- R848 (imidazokinolin)
- IC/R848 (poliinozinična:policitidilična kislina in imidazokinolin)
- IC/R848, TNF $\alpha$ , INF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-1 $\beta$  (poliinozinična:policitidilična kislina in imidazokinolin ob dodatku vnetnih citokinov)
- pred IC/R848 (predinkubirana skupina poliinozinična:policitidilična kislina in imidazokinolin)
- pred IC/R848, TNF $\alpha$ , INF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-1 $\beta$  (predinkubirana skupina poliinozinična:policitidilična kislina in imidazokinolin ob dodatku vnetnih citokinov)

Koncentracije posameznih komponent so bile sledeče:

- IC: 20 µg/ml gojišča
- R848: 2.5 µg/ml gojišča
- TNF $\alpha$ : 1000 U/ml gojišča
- INF $\alpha$ : 3000 U/ml gojišča
- INF $\gamma$ : 1000 U/ml gojišča
- IL-1 $\beta$ : 25 ng/ml gojišča
- LPS: 20 ng/ml gojišča

V vsako skupino smo dodali še GM-CSF, ki je preživetveni dejavnik za DC. Dodali smo 1 µl GM-CSF/ml gojišča. Predinkubirane skupine z oznako »pred« smo inkubirali dve uri ob dodatku pI:C in GM-CSF. Po dveh urah predinkubacije smo dodali še preostale komponente. Celice smo gojili 24 ur pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> za skupine, ki so bile namenjene tretiranju z multimernim CD40L (mCD40L), analizo površinskih označevalcev zorenja, analizo površinskih inhibitornih molekul, test migracije in kokulturo z naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T ter 48 ur za merjenje koncentracije IL-12p70 in IL-10 v gojišču po aktivaciji DC.

### **3.2.6 Tretiranje zrelih dendritičnih celic z multimernim ligandom CD40**

En dan po zoritvi celic smo označeno skupino za mCD40L tretirali z multimernim ligandom CD40. Celice smo dobro sprali s površin vdolbin mikrotitrne plošče s pufrom DPBS. Celice smo zbirali v 15 ml centrifugirke. Po spiranju smo celice centrifugirali pri 400 x g, 7 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo pelete resuspendiral z 950 µl gojišča CellGro<sup>®</sup>. Pripravili smo multimerni CD40 ligand. Po navodilih smo raztopil liofiliziran CD40L (100 µg) v 200 µl pufru DPBS. Dobljena koncentracija je 0.5 µg/ml. Koncentracija mCD40L, ki smo jo vnašali posameznim skupinam, je bila 1 µg/ml gojišča. Gojili smo 100 000 celic v 200 µl gojišča CellGro<sup>®</sup>. Tako smo posamezni skupini vnesli 0.2 µg mCD40L. Pri pripravi smo si izračunali skupno maso potrebnega mCD40L (9 skupin x 0.2 µg). Tako smo dobili maso liganda oziroma volumen, ki ga potrebujemo za vse skupine. Nato smo zmešali mešanico, v katerem je določena masa CD40L ter enak

volumen multimernih protiteles. Tako pripravljeno mešanico smo nato inkubirali 30 min pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo posameznim skupinam dodali 0.2 µg mCD40L ter 0.2 µl GM-CSF. Celice smo gojili pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> 48 ur.

### **3.2.7 Zbiranje supernatantov za analizo IL-12p70 in IL-10 s testom ELISA**

Zbirali in redčili smo supernatante DC, ki so bile 48 ur tretirane z agonisti TLR in citokini ter DC, ki so bile 24 ur tretirane s TLR agonisti in citokini ter 48 ur z mCD40L. Vzorce smo petkrat redčili. Redčili smo jih v 96 mikrotitrskih ploščah tako, da smo v posamezno vdolbino dodali 200 µl pufru DPBS in 50 µl vzorca ter tako imeli na koncu 250 µl petkrat redčenega vzorca. Vsak vzorec smo dali v par, pokrili ploščo s pokrovom, jo oblepili z lepilnim trakom, da smo se izognili morebitnim hlapenjem vzorcev ter dali vzorce zamrzniti pri – 20 °C do analize s testom ELISA.

### **3.2.8 Analiza koncentracije IL-12p70 in IL-10 s testom ELISA**

Z encimskim imunoabsorpcijskim testom ali testom ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) smo merili koncentracije citokina IL-12p70 in IL-10. Test ELISA smo opravljali s setom ELISA IL-12p70 in IL-10 Biolegend. Postopka za določevanje obeh citokinov v vzorcih sta podobna. En dan pred testom ELISA smo pripravili testne mikrotitrne ploščice. Pripravili smo »Coating buffer«, v katerem smo raztopili »Capture Antibody« v razmerju 1 : 200. Tako pripravljeno raztopino smo vnašali na mikrotitrne ploščice po 100 µl/vdolbino. Tako smo pripravili testno ploščo za IL-12p70 in IL-10. Mikrotitrne plošče smo čez noč inkubirali v hladilniku pri 4 °C. Naslednji dan smo izvedli test ELISA. Pripravili smo pufer »Assay Diluent A«, ki smo ga uporabljal skozi celoten postopek ELISA. »Assay Diluent A« iz seta smo redčili petkrat (10 ml Assay diluent A in 40 ml pufru DPBS). V naslednjem koraku smo trikrat spirali mikrotitrne plošče na spiralni napravi za mikrotitrne plošče hydro FLEX TECAN. Po spiranju smo v vsako vdolbino z multikanalsko pipeto vnesli 200 µl pufru »Assay Diluent A« ter inkubirali eno uro na stesalniku in pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo pripravili standarde za oba citokina ter odmrznili vzorce. Za IL-12p70 smo pripravili sledeče standarde: 0; 15.6; 31.3;

62.5; 125; 250; 500 in 1000 pg/ml (ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets-Human IL-12 (p70), 2015). Za IL-10 smo pripravili 0; 3.9; 7.8; 15.6; 31.3; 62.5; 125 in 250 pg/ml (ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets-Human IL-10, 2015). Sledilo je trikratno spiranje mikotitrskih ploščic. Po spiranju smo nanесли standarde in vzorce po 100 µl/vdolbino ter inkubirali dve uri na stresalniku in pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo redčil »Detection Antibody« v »Assay Diluent A« v razmerju 1 : 200. Sledilo je trikratno spiranje mikotitrskih ploščic. Vnos 100 µl »Detection Antibody«/vdolbino ter inkubacija eno uro na stresalniku in pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo redčili »Avidin-HRP« v »Assay Diluent A« v razmerju 1 : 1000. Sledilo je trikratno spiranje mikotitrskih ploščic. Vnos 100 µl »Avidin-HRP«/vdolbino ter inkubacija 30 min na stresalniku in pri sobni temperaturi. Sledilo je šestkratno spiranje mikotitrskih ploščic. Med spiranjem smo pripravili »TMB Substrate Solution«, ki je mešanica enakih volumnov »Substrate Solution A« in »Substrate Solution B«. Rastopino je treba pripraviti takoj pred uporabo. Nanos po 100 µl »TMB Substrate Solution«/vdolbino ter inkubacija pri sobni temperaturi in v temi. Mikrotitrsko ploščico za analizo IL-12p70 smo inkubirali po navodilih 20 min, mikrotitrsko ploščico za analizo IL-10 pa 30 min. Dodajanje po 100 µl »Stop Solution« (0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/vdolbino. Merjenje absorbance vzorcev s spektrofotometrom na 450 nm. Urejanje podatkov v Microsoft Office Excel-ovi tabeli.

### **3.2.9 Imunooznačevanje označevalcev zorenja (kostimulatornih molekul in kemokinskega receptorja CCR7) na površini zrelih dendritičnih celic za analizo s pretočnim citometrom**

Dendritične celice, ki smo jih zorili 24 ur, smo barvali za označevalce zorenja, ki se preverjajo s pretočno citometrijo. Celice smo dobro sprali z gojiščem in DPBS. Celične suspenzije smo zbirali v 15 ml centrifugirke. Vzorce smo dali centrifugirati pri 400 x g, 5 min ter pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo resuspendirali v 2 ml pufru DPBS ter še enkrat centrifugirali pri 400 x g, 5 min ter pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo pelete celic resuspendirali v 650 µl DPBS. Za vsako skupino smo imeli 6 epruvet. V vsako epruveto smo vnesli 100 µl celične suspenzije. Prva epruveta je bila izotipska kontrola, ostale so bili posamezni označevalci zorenja. Barvali smo za posamezne označevalce:



CD80, CD83, CD86, HLA-DR in CCR7. Barvili za CD80 (FITC) in CD83 (PE) smo dodali po 2  $\mu$ l, brvila za CD86 (PE), HLA-DR (PE) in CCR7 (PE) pa po 1  $\mu$ l. Nato smo vzorce postavili za 15 min v temo pri sobni temperaturi. Po 15 min smo dodali 2 ml pufra DPBS ter centrifugirali pri 1100 x g, 3,5 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo sunkovito odlili supernatant ter dodali po 300  $\mu$ l 2% PFA v vsako epruveto. Epruvete smo zatesnili s pokrovčki ter shranili v hladilnik do analize s pretočnim citometrom.

### **3.2.10 Imunooznačevanje inhibitornih molekul na površini zrelih dendritičnih celic za analizo s pretočnim citometrom**

Dendritične celice, ki smo jih zorili 24 ur smo barvali z imunobarvili za inhibitorne molekule na površini zrelih DC. Barvali smo za naslednje inhibitorne molekule: ILT-2, ILT-3, ILT-4, PD-L1, HLA-G in FasL. Celice smo dobro sprali s pufrom DPBS. Celične suspenzije smo zbirali v 15 ml centrifugirke ter centrifugirali pri 400 x g, 7 min ter pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo celične pelete resuspendirali v 750  $\mu$ l pufra DPBS. Za vsako tretirano skupino smo imeli sedem epruvet. V vsako epruveto smo vnesli 100  $\mu$ l celične suspenzije. Prva epruveta predstavlja izotipsko kontrolo, ostale pa posamezne inhibitorne molekule. Barvila za inhibitorne molekule ILT-2 (PE), PD-L1 (PE) in HLA-G (PE) smo dodal po 2  $\mu$ l, ILT-3 (PE), ILT-4 (PE) in FasL (PE) pa po 1  $\mu$ l. Vzorce smo dobro pretresli in jih inkubirali 15 min v temi. Po inkubaciji smo dodali 2 ml pufra DPBS v vsako epruveto ter centrifugirali pri 1100 x g, 3,5 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo sunkovito odlili supernatant ter v vsako epruveto dodali 300  $\mu$ l 2% PFA (paraformaldehid), da smo stabilizirali vzorce. Epruvete smo zatesnili s pokrovčki ter jih shranili v hladilnik pri 4 °C do analize s pretočnim citometrom.

### **3.2.11 Test migracije zrelih dendritičnih celic**

Zrele DC, ki smo jih zorili 24 ur, smo testirali s testom migracije skozi 8  $\mu$ m pore »transwell« mikrotitrne plošče. Celice smo dobro sprali s pufrom DPBS. Celične suspenzije smo zbirali v 15 ml centrifugirke ter centrifugirali pri 500 x g, 5 min ter pospešek/zavora 5. Nato smo pelet celic resuspendirali v 5 ml pufra DPBS, da smo dobro

sprali morebitne ostale citokine iz gojišča ter ponovili centrifugiranje. Po centrifugiranju smo celične pelete resuspendirali v 950  $\mu$ l gojišča CellGro<sup>®</sup>. V spodnje prekate »transwell« plošče smo odpipetirali 500  $\mu$ l gojišča CellGro<sup>®</sup> in dodali 300  $\mu$ g kemokina CCL21/ml. V zgornje prekate smo vnesli  $1 \times 10^5$  celic. V dodatno vdolbino brez prekata smo dodali enako število celic kot kontrolo. Nato smo celice inkubirali pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> 3 ure. Po inkubaciji smo s pufrom DPBS spirali spodnjo stran mrežice zgornjega prekata, da smo sprali morebitne še pritrjene DC, ki so prečkale membrano. Nato smo spirali še spodnje prekate, da smo resuspendirali DC, ki so prečkale membrano ter se pritrstile na površino. Celične suspenzije smo nato vnašali v epruvete za pretočno citometrijo. Ko smo zbrali celične suspenzije, smo centrifugiral pri 500 x g, 5 min ter pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo s pipeto previdno odstranili supernatant, dodali 300  $\mu$ l 2% PFA, zamašili epruvete s pokrovčki ter jih pospravili v hladilnik pri 4 °C do analize s pretočnim citometrom.

### **3.2.12 Kokultura dendritičnih celic in naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T**

Zrele DC, ki smo jih zorili 24 ur smo dobro sprali s površin mikrotitrne plošče s pufrom DPBS. Celice smo zbirali v 15 ml centrifugirke. Po spiranju smo celice centrifugirali pri 400 x g, 7 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo pelete resuspendirali z 2 ml gojišča CellGro<sup>®</sup>. Pripravili smo gojišče za naivne CD4<sup>+</sup> limfocite T. Ta je sestavljen iz 17 ml gojišča RPMI in 3 ml FBS. Pripravili smo led za hlajenje odmrznjenih naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T. Limfociti T so bili zamrznjeni v vialah pri – 80 °C v zamrzovalnem mediju, ki je sestavljen iz 50% gojišča ali pa pufra DPBS, 20% DMSO ter 30% FBS. V viali je bilo  $5 \times 10^6$  limfocitov T. Predpostavili smo, da jih je preživel približno  $3 \times 10^6$ . Limfocite smo odtajali v topli vodi pri približno 37 °C. Ko se je suspenzija odtalila, smo jo prenesli v 50 ml centrifugirko in to prenesli na led. Pomembno je, da so celice na ledu, da ne prihaja do odmiranja celic zaradi DMSO. Celični suspenziji naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T smo nato po kapljicah dodajali pripravljeno gojišče. Dodali smo po 10 kapljic ter jih prenesli za približno 30 sekund na led. Pomembno je, da se suspenzija z gojiščem redči enakomerno hitro. Postopek smo ponavljali, dokler ni nivo celične suspenzije dosegel 10 ml. Nato smo po kapljicah dodali 10 ml hladnega pufra DPBS. Sledilo je centrifugiranje pri 500 x g, 5

min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo pelet celic resuspendirali v 2,4 ml gojišča CellGro<sup>®</sup>. Vsako skupino DC in naivnih limfocitov T smo dali v par. Ker smo imeli štiri skupine, smo imeli 4 pare vzorcev, kar je skupaj 8 vzorcev. Imeli smo skupine »NT«, »LPS/INF $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848, TNF $\alpha$ , INF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «. Tako smo dali v posamezno uporabljeno vdolbino mikrotitrne plošče približno 375 000 limfocitov T in 15 000 zrelih DC. Celice smo inkubirali pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> 7 dni.

### **3.2.13 Tretiranje aktivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T z $\alpha$ TCR makrokroglice**

Po 7 dneh smo pare skupin sprali s pufrom DPBS. Celice obeh vzorcev v paru smo zbirali v 15 ml centrifugirke. Nato smo centrifugirali pri 400 x g, 7 min, pospešek/zavora 5. Ponovno smo celice sprali s 5 ml pufru DPBS ter ponovno centrifugirali. Po centrifugiranju smo pelete celic resuspendirali v 500  $\mu$ l gojišča CellGro<sup>®</sup>. Pripravili smo vzorec za štetje celic z napravo Vi-CELL<sup>™</sup> XR CELL VIABILITY ANALYZER. Vzorec celic smo dvajsetkrat redčili. Odpipetirali smo 25  $\mu$ l vzorca v 475  $\mu$ l pufru DPBS ter z napravo prešteli celice v posameznih skupinah. Pripravili smo  $\alpha$ TCR makrokroglice za ponovno aktivacijo limfocitov T. Potrebovali smo 100 000  $\alpha$ TCR makrokroglic/vzorec. Začetna koncentracija  $\alpha$ TCR je bila 100 000/  $\mu$ l. Dali smo gojit 200 000 limfocitov T v 300  $\mu$ l gojišča CellGro<sup>®</sup>. Tako smo  $\alpha$ TCR makrokroglice dobro pretresli na stresalniku ter odpipetirali 5  $\mu$ l za štiri skupine celic (1  $\mu$ l rezervnega volumna) in jih vnesli v 1000  $\mu$ l gojišča CellGro<sup>®</sup>, da smo jih sprali. Nato smo centrifugirali pri 300 x g, 5 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo resuspendirali makrokroglice v 50  $\mu$ l (10  $\mu$ l rezervnega volumna) gojišča CellGro<sup>®</sup> ter vnesli po 10  $\mu$ l v vsak vzorec na 96 mikrotitrski plošči. Vzorce smo inkubirali pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> 48 ur.

### **3.2.14 Zbiranje supernatantov limfocitov T, ki so bili sedem dni v kokulturi z zreli dendritičnimi celicami ter 48 ur tretirani z $\alpha$ TCR makrokroglicami za analizo izbranih sproščenih citokinov v vzorcu**

Zbirali in redčili smo supernatante limfocitov T, ki so bili 48 ur tretirani z  $\alpha$ TCR makrokroglicami. Vzorce smo redčili v 1,5 ml centrifugirke. V centrifugirke smo vnesli

100 µl pufru DPBS in 50 µl vzorca ter tako imel na koncu 150 µl trikrat redčenega vzorca. Vzorce smo dali zamrzniti pri – 20 °C do analize citokinov s setom BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.

### **3.2.15 Analiza citokinov v supernatantih limfocitov T, ki so bili sedem dni v kokulturi z zreli dendritičnimi celicami ter 48 ur tretirani z αTCR makrokroglicami**

V vzorcih smo analizirali citokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα, INFγ in IL-17A s setom BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Pripravili smo »Mixed capture beads«. Gre za mešanico kroglic za posamezne citokine. Za posamezen vzorec smo potrebovali 10 µl »Mixed capture beads«. Imeli smo 16 vzorcev. Tako smo za 16 vzorcev pripravili 175 µl mešanice  $((16 \times 10)/7$  (št. citokinov) = 22,85; zaradi rezervnega volumna smo odpipetirali 25 µl posameznih kroglic). Označili smo tubice za pretočno citometrijo ter v njih vnesli po 10 µl »Mixed capture beads«, 10 µl vzorca ter 10 µl »Human Th1/Th2/Th17 PE detection reagent«. Vzorce smo tri ure inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali v vsako tubico 1 ml pufru DPBS ter centrifugirali pri 200 x g, 5 min, pospešek/zavora 5. Po centrifugiranju smo odpipetirali supernatant ter dodali 300 µl »Wash buffer« v vsako tubico. Tubice smo nato zatesnili s pokrovčki ter jih pospravili v hladilnik pri 4 °C do analize s pretočnim citometrom.

### **3.2.16 Analiza s pretočnim citometrom**

Metoda pretočne citometrije je avtomatizirano odčitavanje odstotka obarvanih celic, ki so označene z monoklonskimi protitelesi. Glavni sestavni deli pretočnega citometra so vir svetlobe, pretočna komora z optičnim sistemom leč, ogledal in filtrov, elektronika za pretvorbo svetlobnih signalov v električne in nato v digitalne ter računalnik za analizo, usklajevanje podatkov ter delovanje sistema aparata. Za zaznavanje odbite ali lomljene svetlobe sta bistvena dva fotosprejemnika. Prvi je FALS (angl. *forward angle light scatter*), ki meri svetlobo iz smeri vira, drugi pa je RALS (angl. *right angle light scatter*), ki meri svetlobo, pravokotno na smer vpadne svetlobe. Prvi sprejemnik je bistven za zaznavo velikosti celic, drugi pa za granuliranost in površinsko strukturo celic. Diagram, ki

ga izriše pretočni citometer, je podan z oznako FCS-H, ki se nanaša na velikost celic in SSC-H, ki podaja informacijo zrnatosti (Kotnik in sod., 2010). S pretočno citometrijo smo analizirali izražanje površinskih kostimulatornih (označevalcev zorenja) in inhibitornih molekul. Predhodno smo jih barvali s fluorescenčnimi protitelesi s fikoeritriinom (PE, barvilo z emisijo fluorescence v rdečem delu spektra) ali fluorescein izocianatom (FITC, barvilo z emisijo fluorescence v zelenem delu spektra). Pri vsaki meritvi smo fluorescenco posameznega vzorca primerjali z izotipsko kontrolo, ki je bila opravljena tudi ob vsakem poskusu. S pretočno citometrijo smo merili tudi koncentracije sproščenih citokinov s strani polariziranih CD4<sup>+</sup> limfocitov T in pa prešteli celice, ki so migrirale v poskusu migracije. Za označevanje citokinov v vzorcu smo uporabili set BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Iz dobljenih podatkov smo odčitali srednjo vrednost fluorescenčne intenzitete ali MFI (angl. *mean fluorescence intensity*).

### 3.2.17 Statistična analiza podatkov

Statistična analiza podatkov je bila narejena s programom IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics 21. Zaradi nenormalne porazdelitve podatkov smo upodobili podatke v obliki »boxplot« grafov. Podatki za povprečne vrednosti in standardne deviacije so prikazani v tabelah nad »boxplot« grafi. Grafi s povprečji so prikazani s programom Microsoft Office Excell 2013. Za statistično analizo smo na podlagi razpršenih podatkov in nenormalnih porazdelitev uporabili neparametričen Mann-Whitney U test za dva neodvisna vzorca, ki je analogen Studentovem T-testu za normalno porazdeljene podatke. Vse vzorce pri posameznih analizah smo primerjali z vzorcem pod oznako »αDC1« (Kalinski, 2011), pri migraciji, površinskih inhibitornih molekulah in citokinih, sproščenih s strani aktivnih CD4<sup>+</sup> pa še s skupino »NT«. Primerjani podatki so prikazani v obliki »boxplot« grafov za posamezno skupino. »Boxplot« graf predstavlja podatke v kvartilnih porazdelitvah, srednja črta ponazarja mediano. Podatki pod in nad mediano predstavljajo porazdelitev polovice podatkov za vsako posamezno skupino. Statistično značilne razlike so označene na grafu z \* za  $p < 0.05$  in \*\* za  $p < 0.01$ .

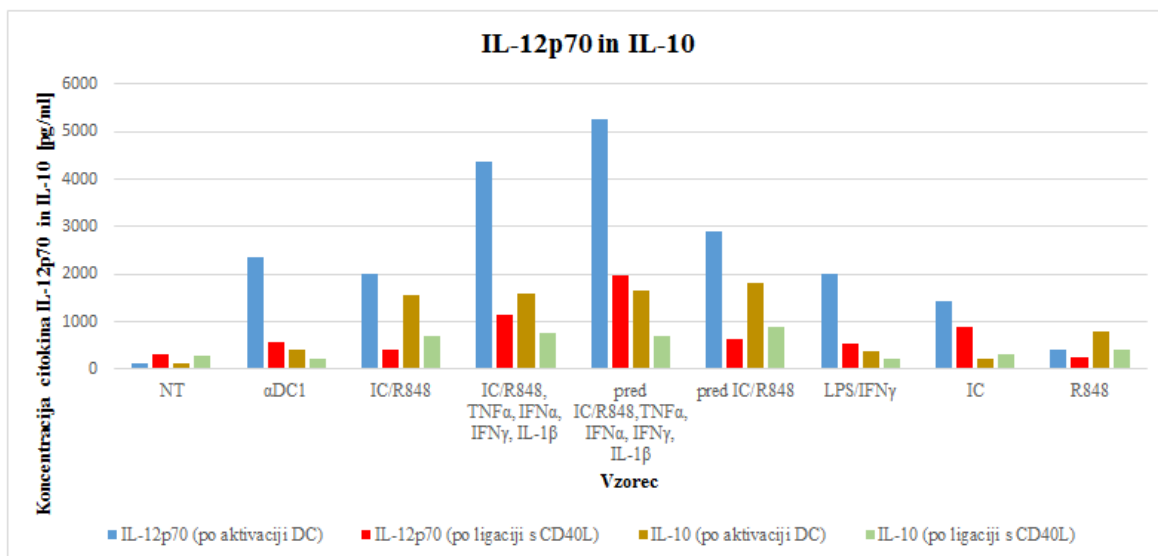
## 4 REZULTATI

V eksperimentalnem delu smo preverjali pomembne fiziološko-molekularne lastnosti DC, ki so ključne za delovanje imunskega sistema in so tudi pokazatelj uspešnosti razvoja DC kot protitumorskih cepiv. Analize eksperimentalnega dela so zajemale:

- merjenje koncentracije sproščenega citokina IL-12p70 in IL-10 v gojišče, neposredno po 48 urnem tretiranju DC z različnimi agonisti TLR in citokini ter po 24 urnem tretiranju DC z različnimi agonisti TLR in citokini in 48 urnem tretiranju z multimernim CD40L.
- preverjanje migratorne sposobnosti DC po 24 urnem tretiranju z različnimi agonisti TLR in citokini skozi 8  $\mu\text{m}$  pore »transwell« mikrotitrne plošče.
- preverjanje površinskih označevalcev zorenja, ki so značilni za zrele DC. Ti označevalci so molekule CD80, CD83, CD86, HLA-DR in CCR7.
- preverjanje površinskih inhibitornih molekul, ki so značilne za zrele DC. Te inhibitorne molekule so ILT-2, ILT-3, ILT-4, PD-L1, HLA-G in FasL.
- preverjanje sproščenih citokinov iz polariziranih limfocitov Th1/Th2/Th17, ki so bili 7 dni v kokulturi z DC posameznega vzorca in 48 ur tretirani z  $\alpha\text{TCR}$  makrokroglicami. Ti citokini so IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-17A.

### 4.1 KONCENTRACIJA IL-12p70 IN IL-10

Koncentracijo citokinov IL-12p70 in IL-10 smo merili neposredno po zorenju DC, ki so bile gojene 48 ur ter DC, ki so bile tretirane z mCD40L, ki simulira interakcijo DC z naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T. Celice, ki so bile tretirane z mCD40L, so bile v zorenju 24 ur ter 48 ur tretirane z mCD40L.

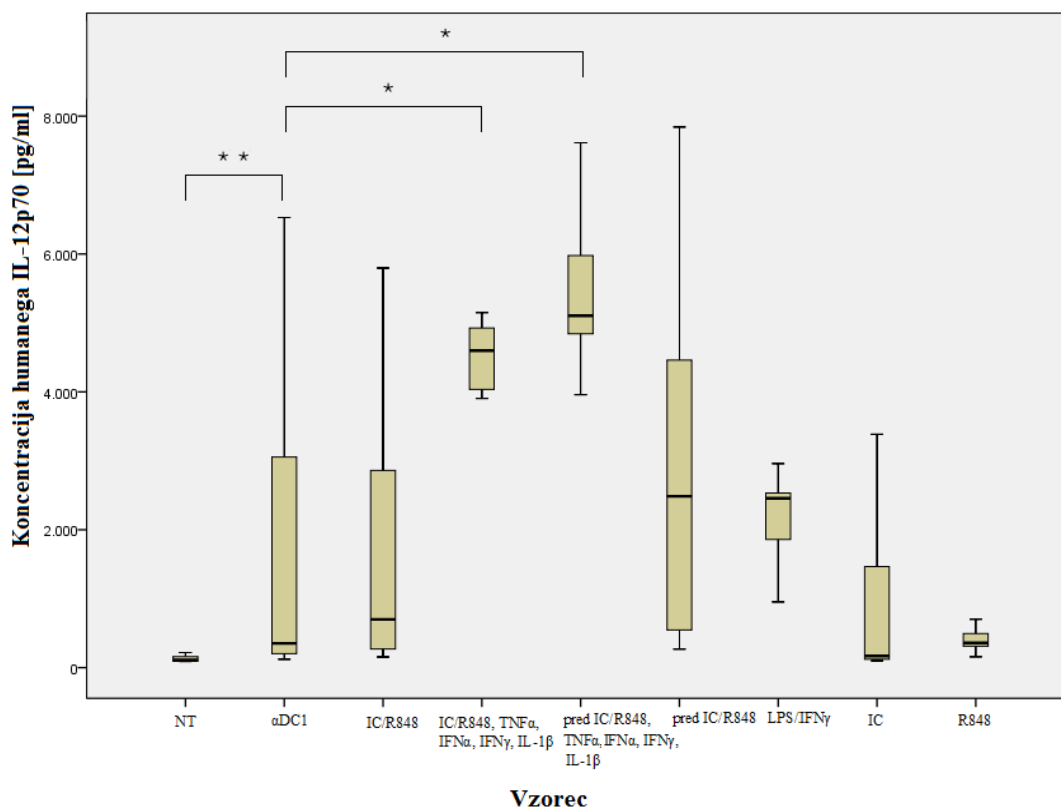


Slika 5: Povprečne koncentracije izločenega citokina IL-12p70 in IL-10 s strani zrelih DC, po aktivaciji in po tretiranju s CD40L

Graf (slika 5) prikazuje povprečne vrednosti koncentracij citokinov IL-12p70 in IL-10, merjeno po 48 urnem zorenju DC ter po 24 urnem zorenju DC in 48 urnem tretiranju z mCD40L (po ligaciji s CD40L). Iz grafa je razvidno, da se največ citokina IL-12p70, izloča pri skupini »pred IC/R848 + citokini«, po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L. Koncentracija IL-10, po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L, je višja pri skupinah, ki so imele dodan agonist za TLR3 (pI:C) in za TLR8 (R848).

Preglednica 1: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-12p70 za posamezne skupine, po aktivaciji DC

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-12p70 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	133,94	48,12
<b>αDC1</b>	2344,12	2471,81
<b>IC/R848</b>	2017,20	2262,47
<b>IC/R848 + citokini</b>	4654,30	2030,18
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	4974,89	1652,67
<b>pred IC/R848</b>	2900,99	2655,10
<b>LPS/IFNγ</b>	2011,02	782,67
<b>IC</b>	1427,85	1890,11
<b>R848</b>	404,13	191,32



Slika 6: Koncentracije izločenega citokina IL-12p70 za posamezne skupine, po aktivaciji DC

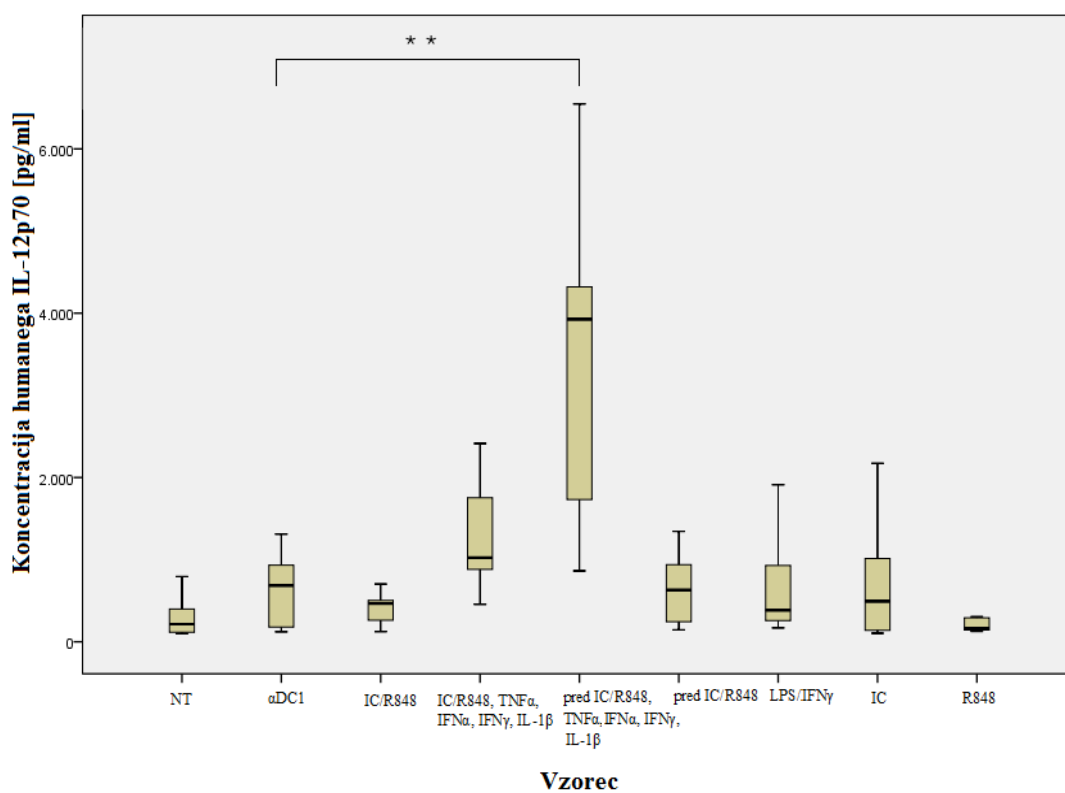
V tabeli (pregl. 1) so podana povprečja in standardne deviacije za koncentracije humanega citokina IL-12p70 za posamezne skupine, merjeno neposredno po 48 urnem zorenju DC. Graf (slika 6) prikazuje koncentracije IL-12p70 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno, da skupina »αDC1« izloča statistično značilno več citokina IL-12p70 kot netretirana skupina »NT« pri  $p < 0,01$ . Skupini »IC/R848 + citokini« in »pred IC/R848 +



citokini« izločata statistično značilno več citokina IL-12p70 kot skupina » $\alpha$ DC1« pri  $p < 0,05$ . Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni statistično značilnih razlik v koncentraciji IL-12p70. (n (NT) = 11, n ( $\alpha$ DC1) = 11, n (IC/R848) = 11, n (IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 11, n (pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 11, n (pred IC/R848) = 10, n (LPS/IFN $\gamma$ ) = 9, n (IC) = 9, n (R848) = 7).

Preglednica 2: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-12p70 za posamezne skupine, po tretiranju s CD40L

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-12p70 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	332,02	326,06
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	562,86	520,76
<b>IC/R848</b>	426,35	300,36
<b>IC/R848 + citokini</b>	1146,70	998,16
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	1982,99	1904,76
<b>pred IC/R848</b>	622,20	484,30
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	532,35	570,01
<b>IC</b>	887,71	872,02
<b>R848</b>	246,76	156,08

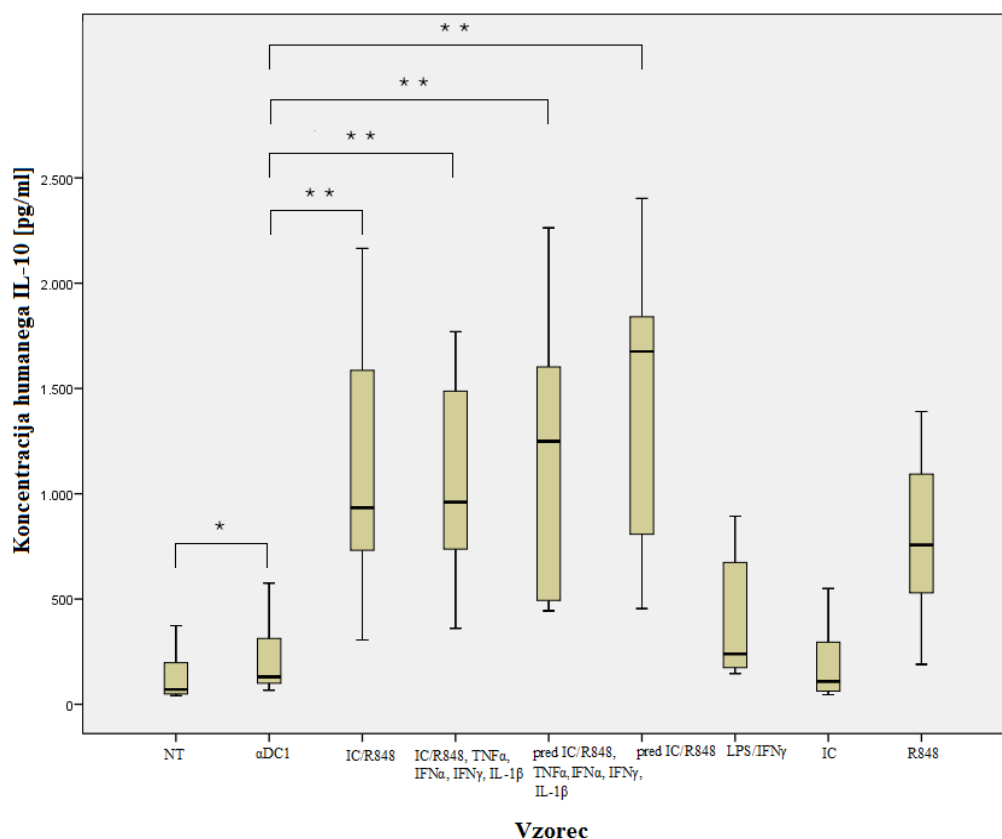


Slika 7: Koncentracije izločenega citokina IL-12p70 za posamezne skupine, po tretiranju s CD40L

V tabeli (pregl. 2) so podana povprečja in standardne deviacije za koncentracije humanega citokina IL-12p70 za posamezne skupine, merjeno po 24 urnem zorenju DC in 48 urnem tretiranju s CD40L. Graf (slika 7) prikazuje koncentracije citokina IL-12p70 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno, da skupina »pred IC/R848 + citokini« izloča statistično značilno več citokina IL-12p70 kot skupina » $\alpha$ DC1« pri  $p < 0,01$ . Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni signifikantnih statističnih razlik v koncentraciji IL-12p70. ( $n$  (NT) = 15,  $n$  ( $\alpha$ DC1) = 15,  $n$  (IC/R848) = 11,  $n$  (IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 11,  $n$  (pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 15,  $n$  (pred IC/R848) = 10,  $n$  (LPS/IFN $\gamma$ ) = 13,  $n$  (IC) = 9,  $n$  (R848) = 7).

Preglednica 3: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-10 za posamezne skupine, po aktivaciji DC

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-10 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	128,60	116,01
<b>αDC1</b>	397,95	368,98
<b>IC/R848</b>	1557,13	880,17
<b>IC/R848 + citokini</b>	1581,18	930,56
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	1668,42	1004,08
<b>pred IC/R848</b>	1810,15	891,06
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	387,62	293,87
<b>IC</b>	214,36	182,06
<b>R848</b>	797,49	450,77



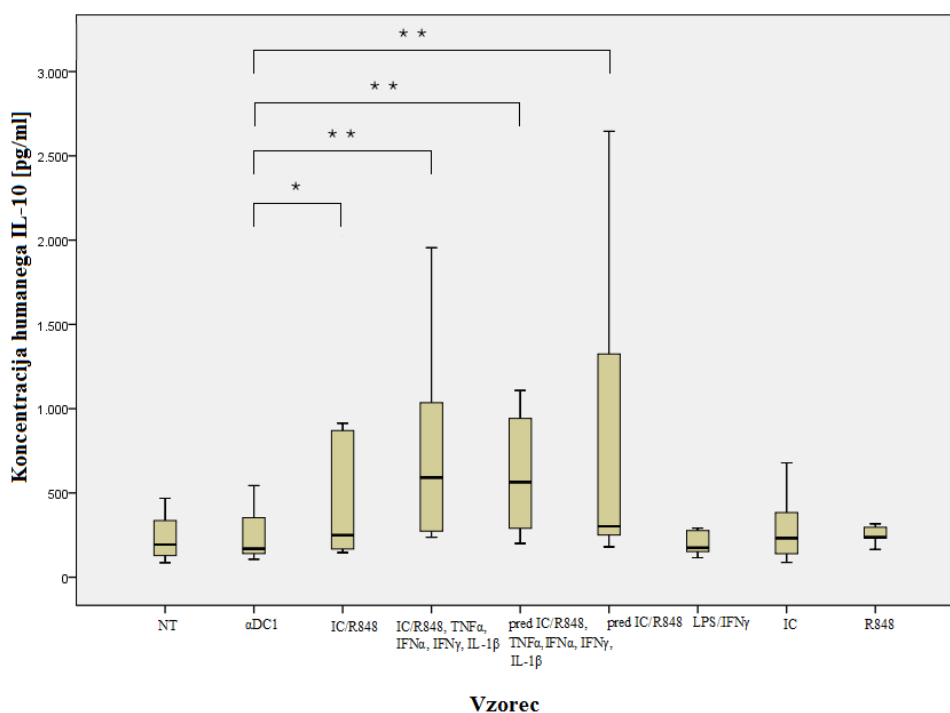
Slika 8: Koncentracije izločenega citokina IL-10 za posamezne skupine, po aktivaciji DC

V tabeli (pregl. 3) so podana povprečja in standardne deviacije za koncentracije humanega citokina IL-10 za posamezne skupine, merjeno neposredno po 48 urnem zorenju DC. Graf (slika 8) prikazuje koncentracije IL-10 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno, da skupina »αDC1« izloča statistično značilno več citokina IL-10 kot netretirana skupina »NT« pri  $p < 0,05$ . Skupine »IC/R848«, »IC/R848 + citokini«, »pred IC/R848 + citokini«

in »pred IC/R848« izločajo statistično značilno več citokina IL-10 kot skupina » $\alpha$ DC1« pri  $p < 0,05$ . Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni signifikantnih statističnih razlik v koncentraciji IL-10. (n (NT) = 10, n ( $\alpha$ DC1) = 10, n (IC/R848) = 10, n (IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 10, n (pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 10, n (pred IC/R848) = 10, n (LPS/IFN $\gamma$ ) = 9, n (IC) = 9, n (R848) = 7).

Preglednica 4: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-10 za posamezne skupine, po tretiranju s CD40L

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-10 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	291,88	234,85
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	219,20	148,10
<b>IC/R848</b>	686,41	674,33
<b>IC/R848 + citokini</b>	756,84	545,14
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	692,04	642,03
<b>pred IC/R848</b>	887,32	783,68
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	212,37	142,10
<b>IC</b>	326,27	195,24
<b>R848</b>	402,15	423,79



Slika 9: Koncentracije izločenega citokina IL-10 za posamezne skupine, po tretiranju s CD40L

V tabeli (pregl. 4) so podana povprečja in standardne deviacije za koncentracije humanega citokina IL-10 za posamezne skupine, merjeno po 24 urnem zorenju DC in 48 urnem

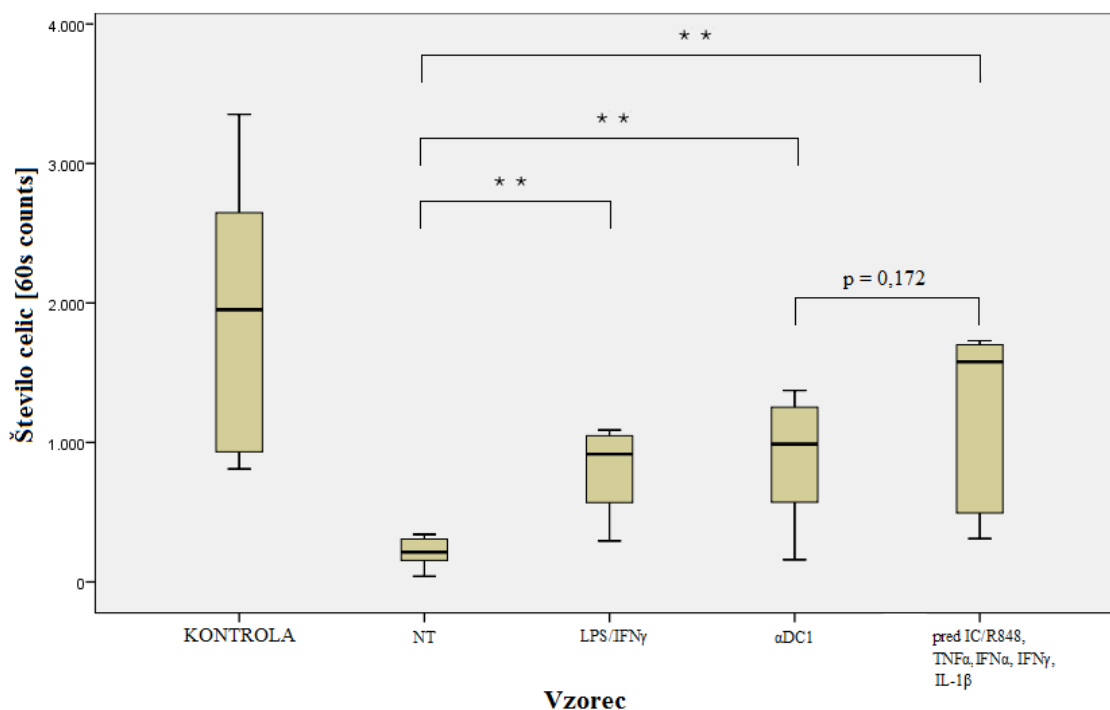
tretiranju s CD40L. Graf (slika 9) prikazuje koncentracije IL-10 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno, da vse skupine, ki so bile ob zorenju hkrati tretirani s TLR3 (pI:C) in TLR8 (R848) agonistoma, izločajo statistično značilno več citokina IL-10 kot skupina » $\alpha$ DC1« pri  $p < 0,05$  za skupino »IC/R848« in  $p < 0,01$  za skupine »IC/R848 + citokini«, »pred IC/R848 + citokini« in »pred IC/R848«. Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni signifikantnih statističnih razlik v koncentraciji IL-10. (n (NT) = 14, n ( $\alpha$ DC1) = 14, n (IC/R848) = 10, n (IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 10, n (pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 14, n (pred IC/R848) = 10, n (LPS/IFN $\gamma$ ) = 13, n (IC) = 9, n (R848) = 7).

#### 4.2 TEST MIGRACIJE DENDRITIČNIH CELIC

S »transwell« mikrotitrskimi ploščicami, ki so imele mrežico s porami z velikostjo 8  $\mu\text{m}$ , smo merili odzivnost DC na kemokin CCL21, ki se je kazala v migraciji DC skozi pore, na podlagi kemotaksije.

Preglednica 5: Povprečja in standardne deviacije za število migriranih DC posameznih skupin

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (število celic)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>KONTROLA</b>	1903,37	974,62
<b>NT</b>	242,37	153,98
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	1031,37	809,22
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	894,75	431,27
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	1475,87	1167,91



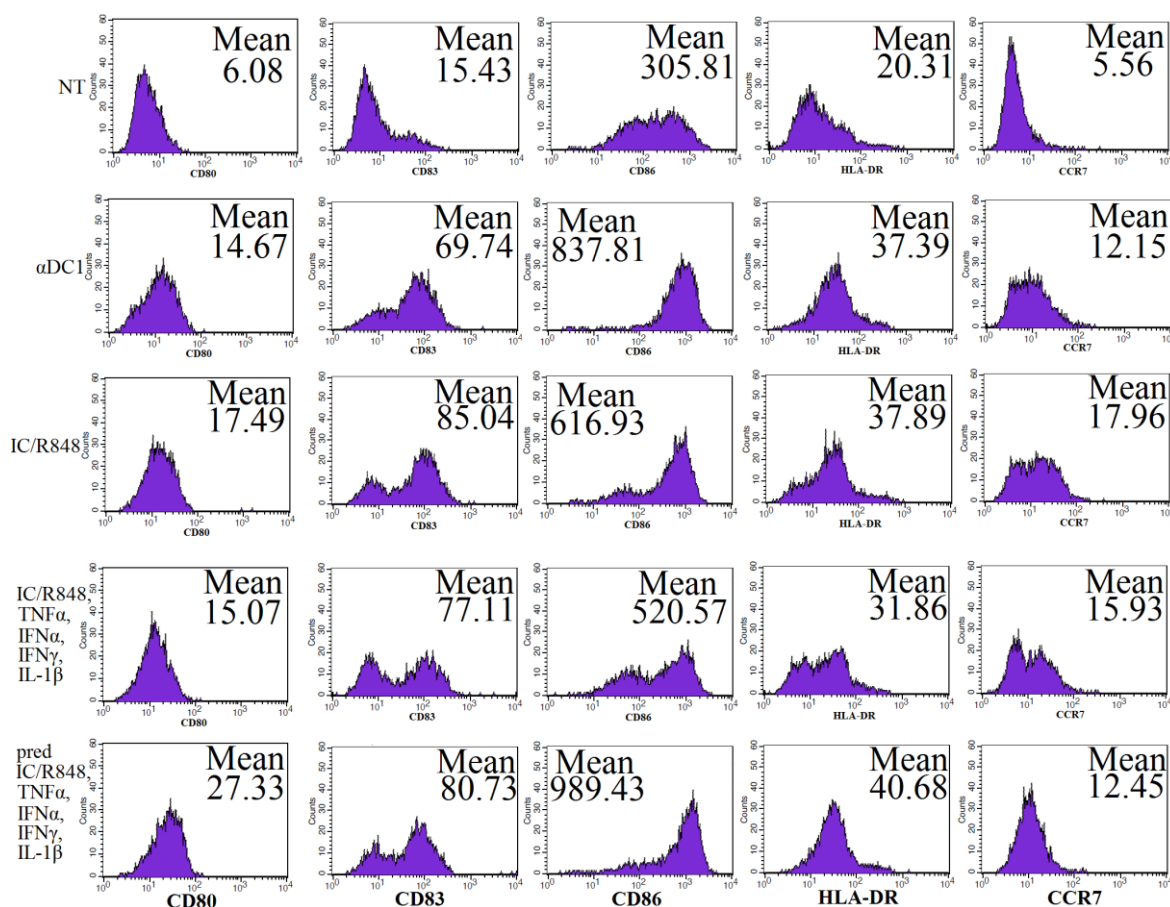
Slika 10: Število zrelih DC, ki so migrirale skozi 8  $\mu\text{m}$  pore »transwell« mikrotitrskje plošče

V tabeli (pregl. 5) so podana povprečja in standardne deviacije za število DC posameznih skupin, ki so migrirale skozi »transwell« mikrotitrsko ploščo. Graf (slika 10) prikazuje število DC za posamezne skupine. Celice smo prešteli na pretočnem citometru tako, da smo ustavili merjenje 60 sekund po začetku štetja. Iz grafa je razvidno, da imajo zrele DC

skupine »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini«, večjo migratorno sposobnost kot netretirana skupina »NT« pri  $p < 0,01$ . Med ostalimi testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni signifikantnih statističnih razlik v migracijski sposobnosti. Med skupino » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini« je označena p-vrednost. ( $n$  (KONTROLA; NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 8).

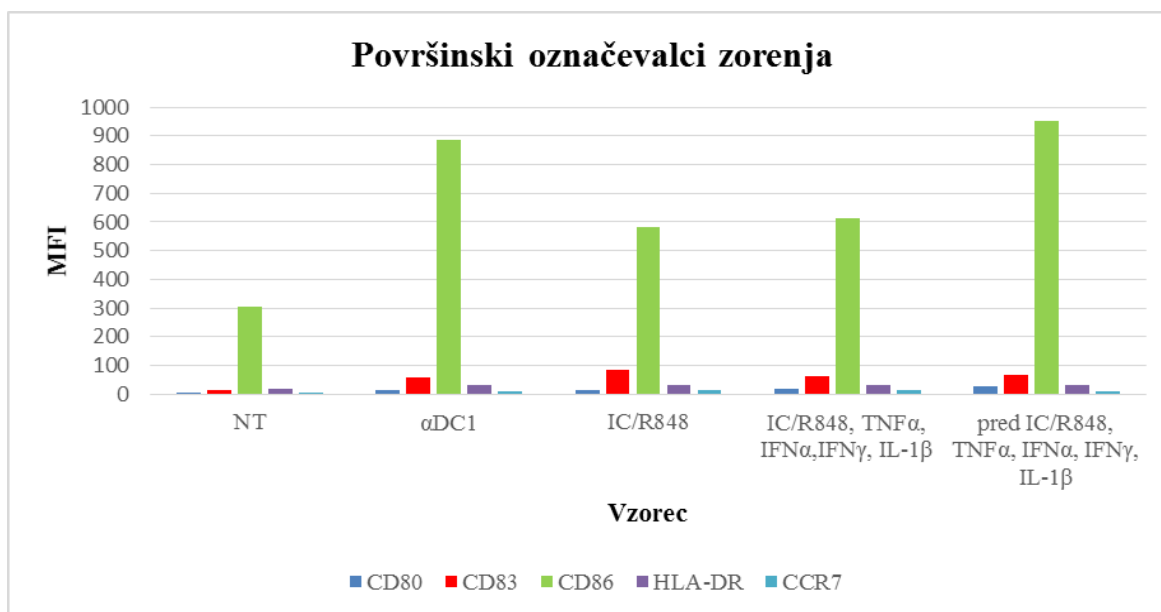
#### 4.3 ANALIZA POVRŠINSKIH OZNAČEVALCEV ZORENJA (KOSTIMULATORNIH MOLEKUL IN KEMOKINSKEGA RECEPTORJA CCR7)

S pretočno citometrijo smo preverjali izražanje površinskih označevalcev zorenja, ki so značilni za zrele DC. Ti označevalci so CD80, CD83, DC86, HLA-DR in CCR7.



Slika 11: Prikaz srednjih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za izražanje posameznega označevalca zorenja pri posameznih skupinah zrelih DC in nezrele skupine »NT«, kot ga izriše pretočni citometer po končani meritvi

Na sliki (slika 11) je prikaz izražanja posameznih površinskih označevalcev zorenja za posamezne skupine zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Grafi prikazujejo povprečno fluorescenčno intenziteto imunooznačenih označevalcev. Prikazani so podatki eksperimenta od skupaj dveh neodvisno opravljenih eksperimentov.



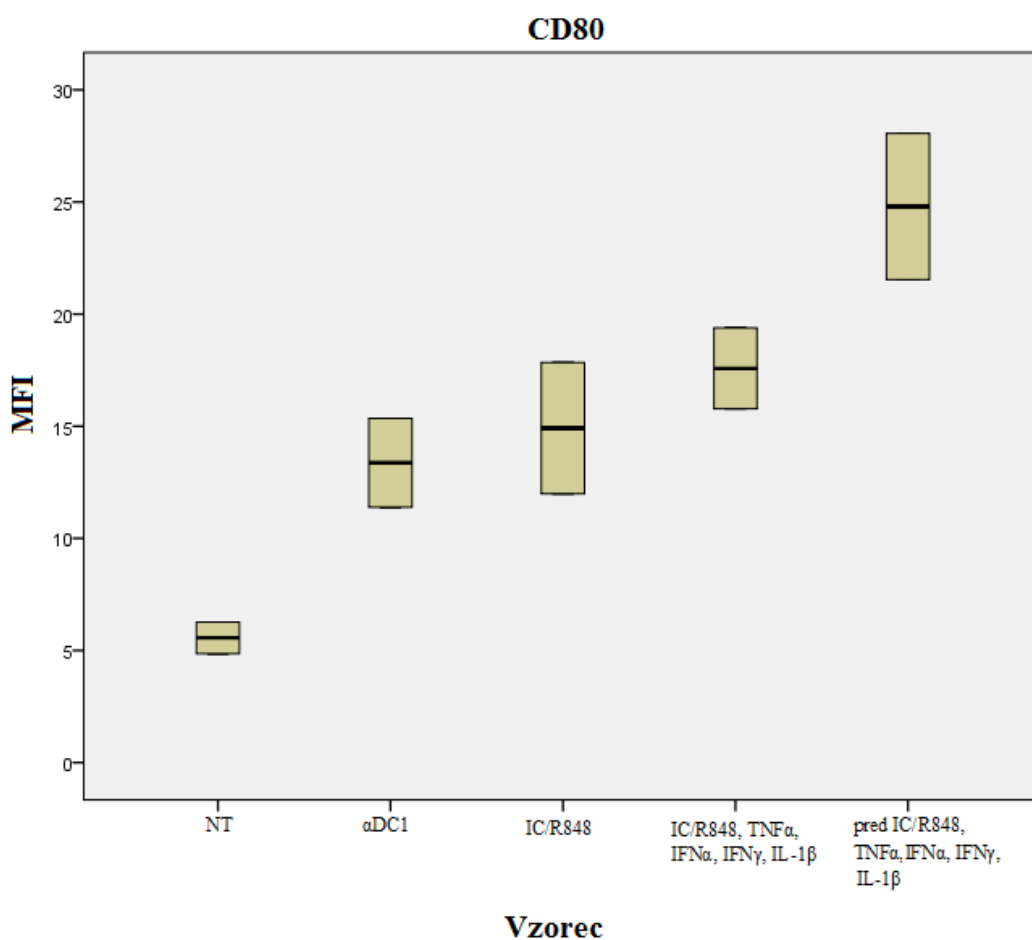
Slika 12: Povprečne vrednosti MFI za posamezen površinski označevalec zorenja pri posamezni skupini zrelih DC in nezrele skupine »NT«

Graf (slika 12) prikazuje povprečne vrednosti srednjih fluorescenčnih intenzitet za vsak diferenciacijski označevalec za posamezne skupine zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno, da se izraža največ kostimulatorne molekule CD86, najmanj pa receptorja CCR7, na površini zrelih in nezrelih (»NT«) DC.



Preglednica 6: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule CD80 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (CD80 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	5,56	0,99
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	13,37	2,80
<b>IC/R848</b>	14,91	4,13
<b>IC/R848 + citokini</b>	17,58	2,54
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	24,80	4,61

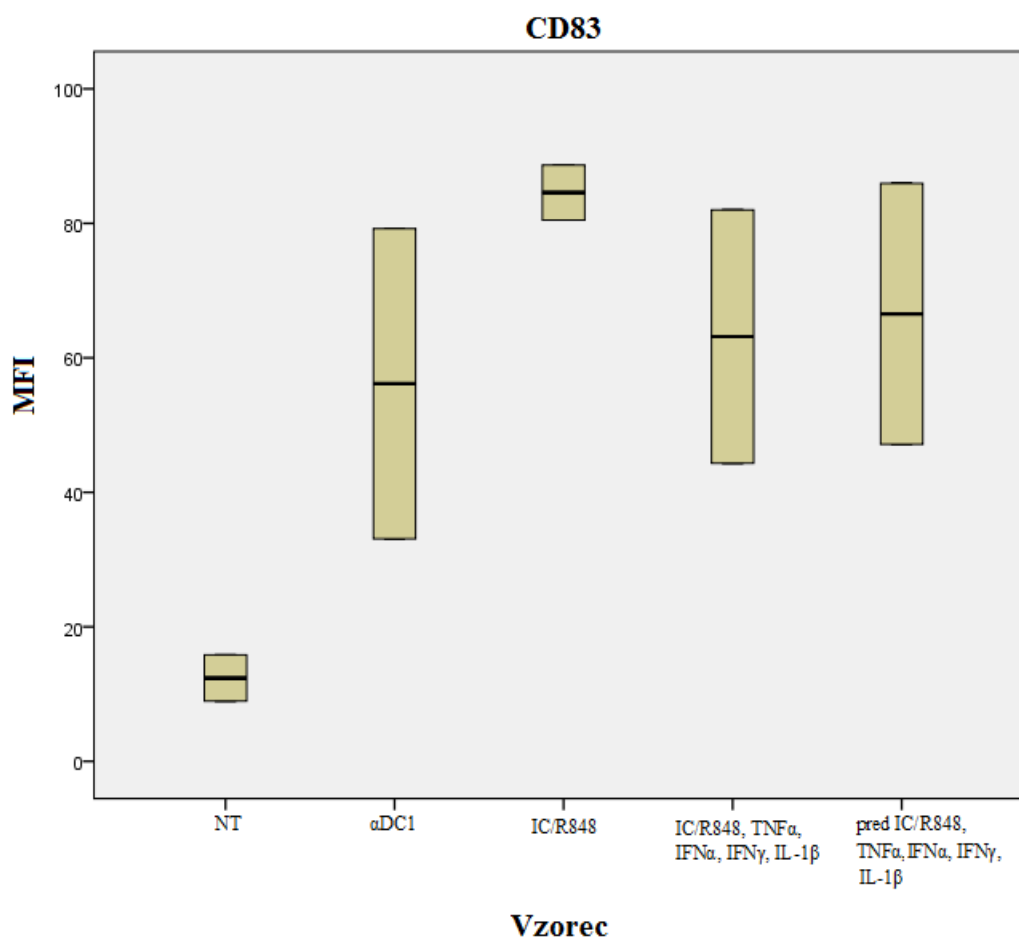


Slika 13: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo CD80 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 6) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule CD80. Graf (slika 13) prikazuje izražanje označevalca zorenja CD80 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinske kostimulatorne molekule CD80. (n (NT;  $\alpha$ DC1; IC/R848; IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 2).

Preglednica 7: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule CD83 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (CD83 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	12,38	4,87
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	56,15	32,59
<b>IC/R848</b>	84,56	5,79
<b>IC/R848 + citokini</b>	63,16	26,62
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	66,53	27,44

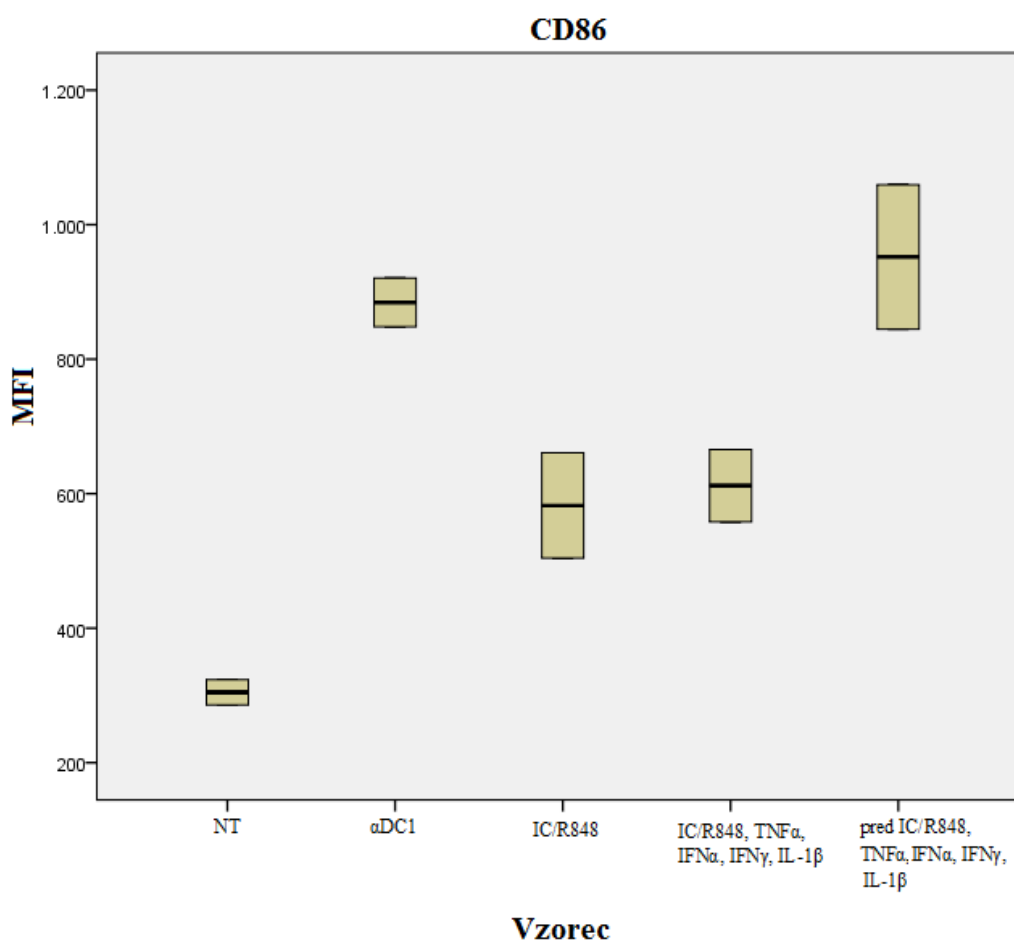


Slika 14: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo CD83 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 7) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule CD83. Graf (slika 14) prikazuje izražanje označevalca zorenja CD83 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinske kostimulatorne molekule CD83. (n (NT;  $\alpha$ DC1; IC/R848; IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 2).

Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule CD86 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (CD86 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	304,71	26,56
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	884,39	51,19
<b>IC/R848</b>	582,46	110,77
<b>IC/R848 + citokini</b>	612,00	76,07
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	951,99	151,74

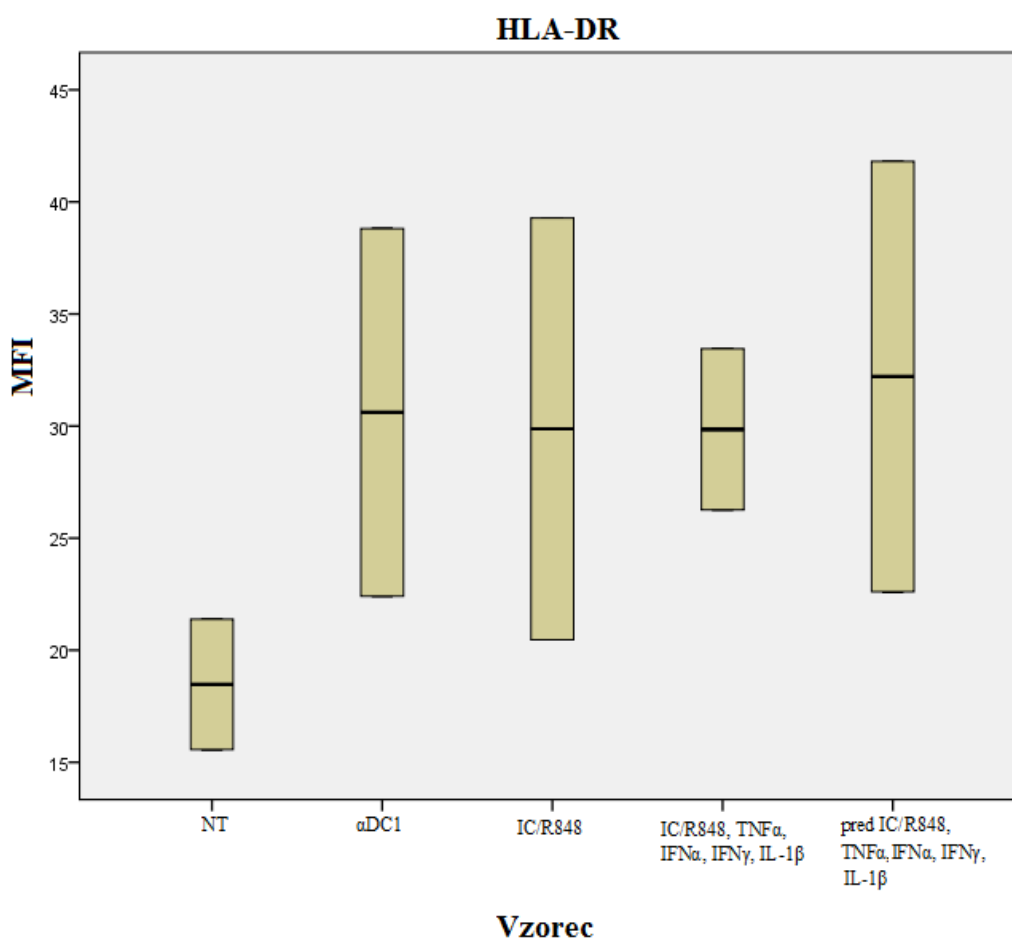


Slika 15: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo CD86 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 8) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule CD86. Graf (slika 15) prikazuje izražanje označevalca zorenja CD86 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinske kostimulatorne molekule CD86. (n (NT;  $\alpha$ DC1; IC/R848; IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 2).

Preglednica 9: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske kostimulatorne molekule HLA-DR pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (HLA-DR MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	18,47	4,10
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	30,61	11,59
<b>IC/R848</b>	29,87	13,30
<b>IC/R848 + citokini</b>	29,85	5,08
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	32,21	13,57

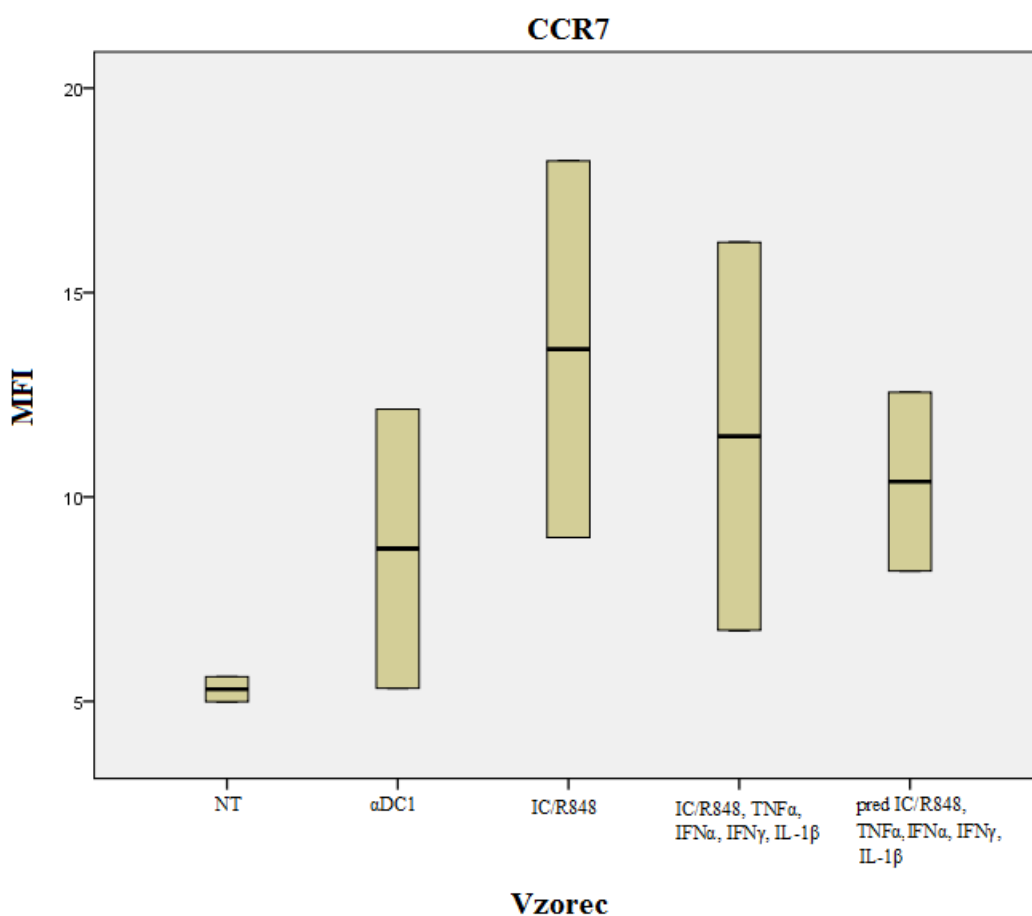


Slika 16: MFI za površinsko kostimulatorno molekulo HLA-DR pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 9) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule HLA-DR. Graf (slika 16) prikazuje izražanje označevalca zorenja HLA-DR na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinske kostimulatorne molekule HLA-DR. (n (NT;  $\alpha$ DC1; IC/R848; IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 2).

Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinskega kemokinskega receptorja CCR7 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (CCR7 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	5,29	0,43
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	8,73	4,82
<b>IC/R848</b>	13,61	6,51
<b>IC/R848 + citokini</b>	11,48	6,71
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	10,37	3,09

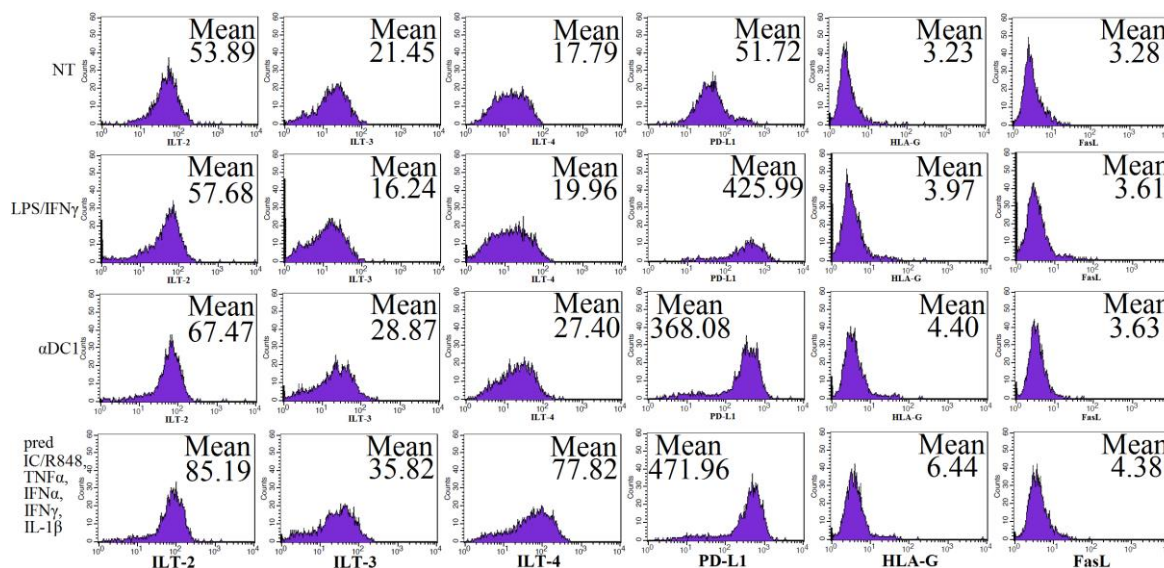


Slika 17: MFI za površinski kemokinski receptor CCR7 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 10) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule CCR7. Graf (slika 17) prikazuje izražanje označevalca zorenja CCR7 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinskega receptorja CCR7. (n (NT;  $\alpha$ DC1; IC/R848; IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 2).

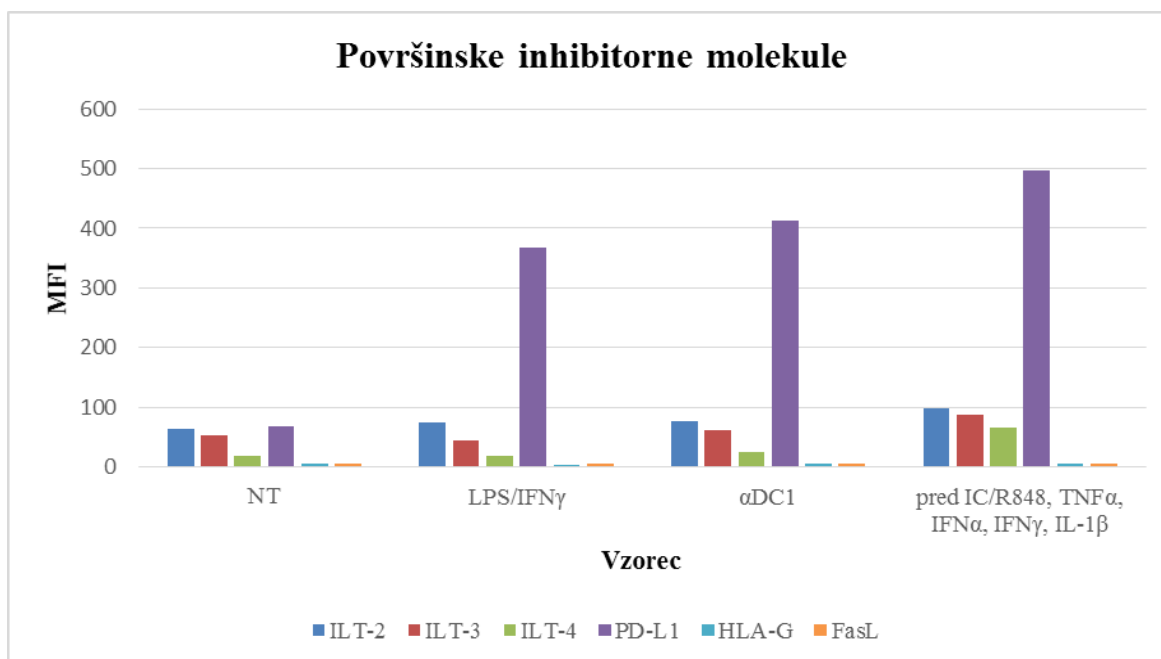
#### 4.4 ANALIZA POVRŠINSKIH INHIBITORNIH MOLEKUL

S pretočno citometrijo smo preverjali izražanje površinskih inhibitornih molekul, ki so značilni za zrele DC. Te inhibitorne molekule so ILT-2, ILT-3, ILT-4, PD-L1, HLA-G in FasL.



Slika 18: Prikaz srednjih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za izražanje posamezne površinske inhibitorne molekule za posamezno skupino zrelih DC in nezrele skupine »NT«, kot ga izriše pretočni citometer po končani meritvi

Na sliki (slika 18) je prikaz izražanja posameznih površinskih inhibitornih molekul za posamezno skupino tretiranih DC. Grafi prikazujejo povprečno fluorescentno intenziteto. Prikazani so podatki eksperimenta od skupaj štiri neodvisno opravljenih eksperimentov.

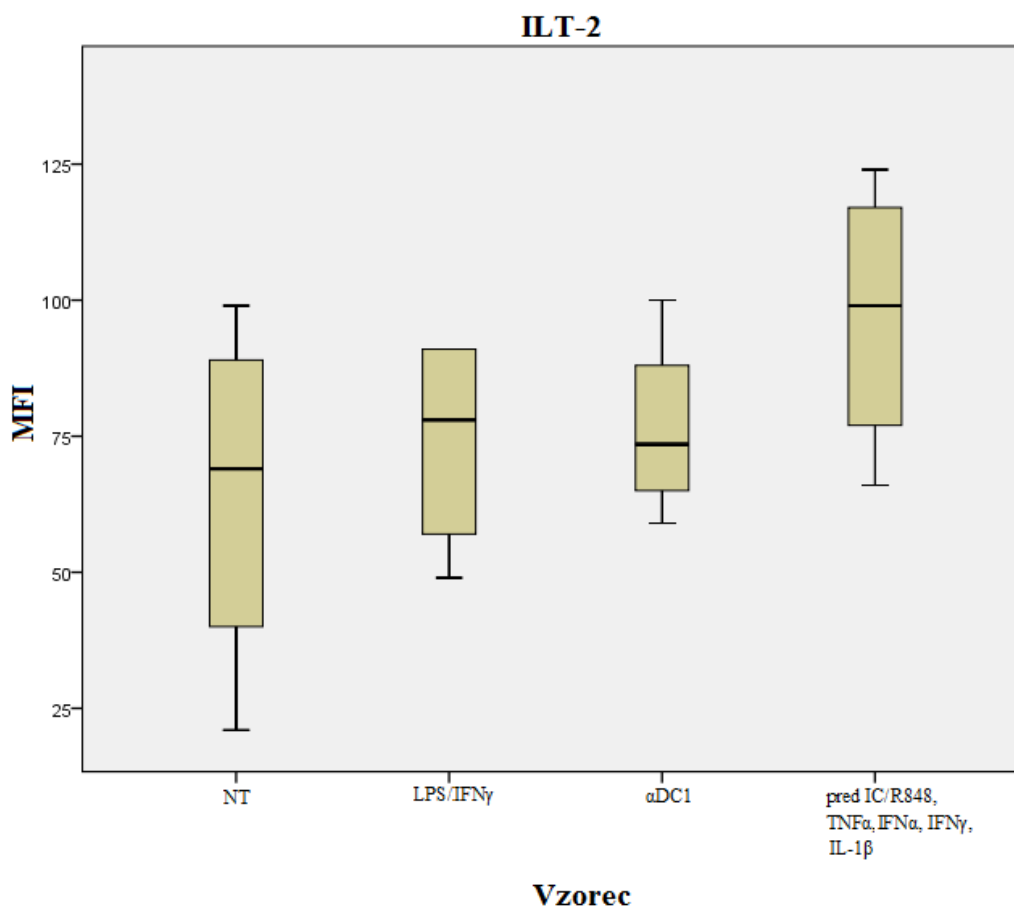


Slika 19: Povprečne vrednosti MFI za posamezno površinsko inhibitorno molekulo pri posameznih skupinah zrelih DC in nezrele skupine »NT«

Graf (slika 19) prikazuje povprečne vrednosti srednjih fluorescenčnih intenzitet za vsako inhibitorno molekulo za posamezne skupine zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno, da se izraža največ inhibitorne molekule PD-L1, najmanj pa inhibitorne molekule FasL, na površini zrelih in nezrelih (»NT«) DC.

Preglednica 11: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule ILT-2 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (ILT-2 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	64,50	33,28
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	74,00	20,68
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	76,50	17,21
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	97,00	25,42



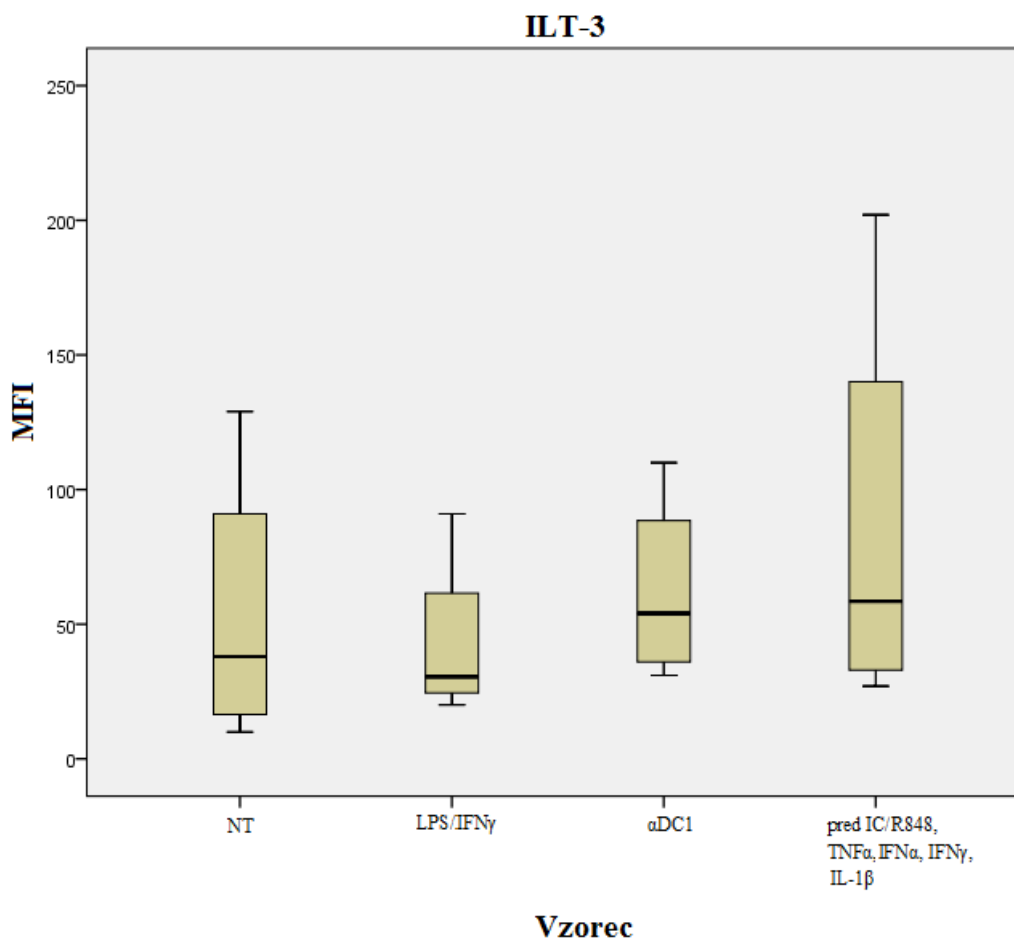
Slika 20: MFI za površinsko inhibitorno molekulo ILT-2 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 11) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule ILT-2. Graf (slika 20) prikazuje izražanje inhibitorne molekule ILT-2 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni significantnih statističnih razlik v izražanju površinske inhibitorne molekule ILT-2. ( $n$  (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).



Preglednica 12: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule ILT-3 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (ILT-3 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	53,75	53,30
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	43,00	32,40
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	62,25	35,26
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	86,50	80,01

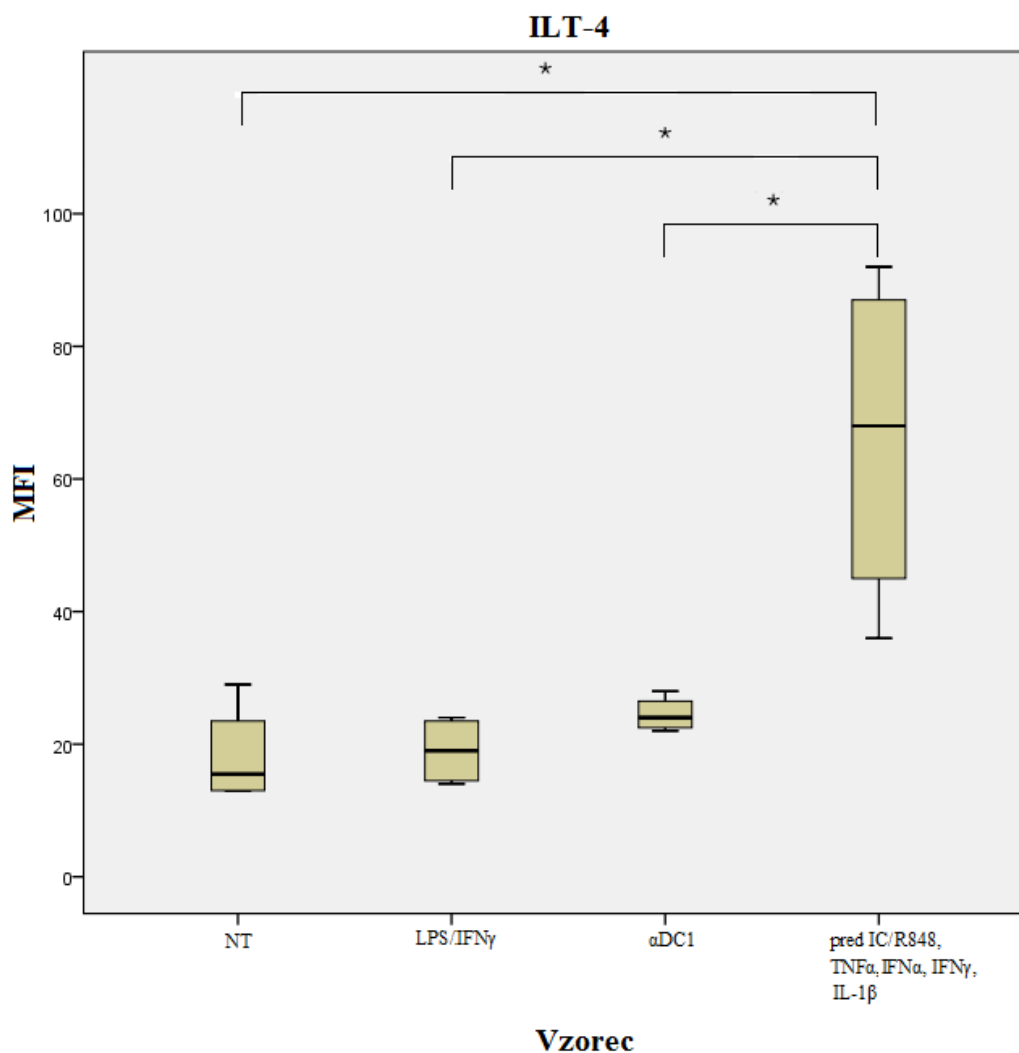


Slika 21: MFI za površinsko inhibitorno molekulo ILT-3 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 12) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule ILT-3. Graf (slika 21) prikazuje izražanje inhibitorne molekule ILT-3 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni significantnih statističnih razlik v izražanju površinske inhibitorne molekule ILT-3. ( $n$  (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 13: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule ILT-4 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (ILT-4 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	18,25	7,54
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	19,00	5,22
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	24,50	2,64
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	66,00	25,66



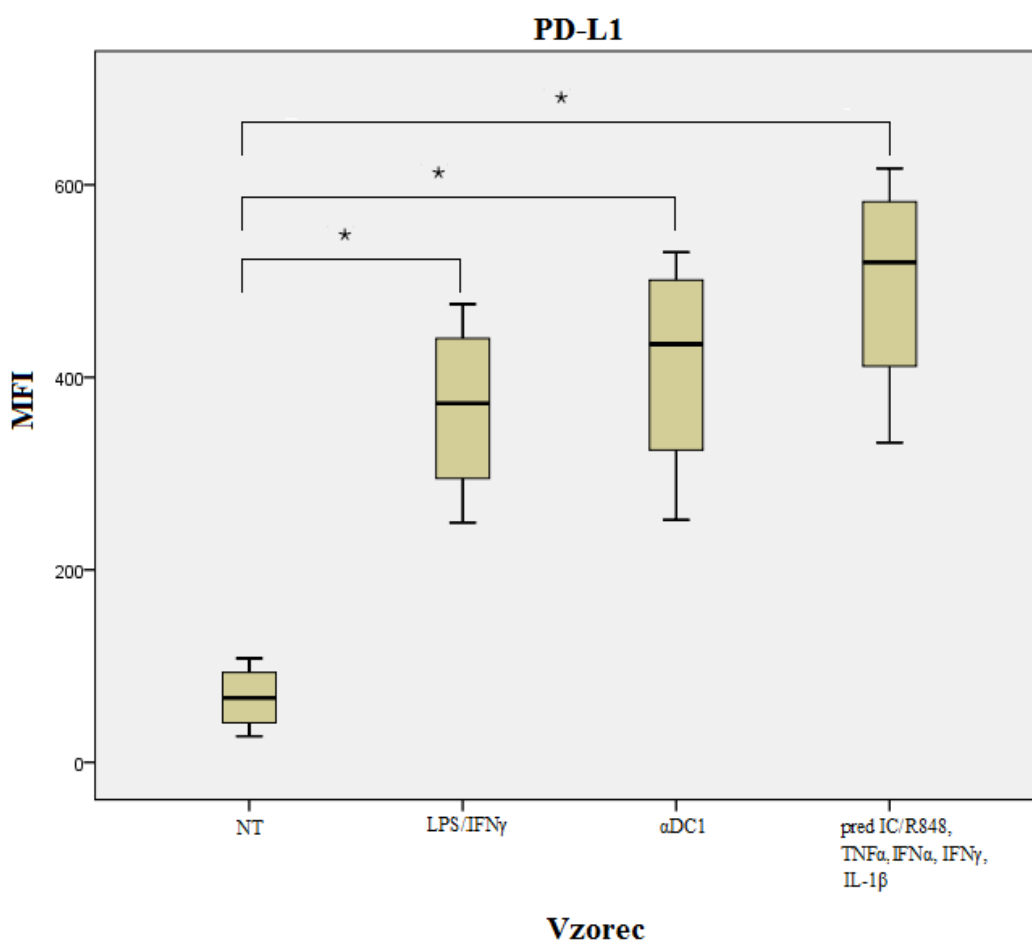
Slika 22: MFI za površinsko inhibitorno molekulo ILT-4 pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 13) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule ILT-4. Graf (slika 22) prikazuje izražanje inhibitorne molekule ILT-4 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno da skupina »pred IC/R848 + citokini« izraža statistično značilno več molekule ILT-4 kot skupina »NT«, »LPS/IFN $\gamma$ « in » $\alpha$ DC1« pri  $p < 0,05$ . Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni signifikantnih statističnih razlik v

izražanju površinske inhibitorne molekule ILT-4. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 14: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule PD-L1 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (PD-L1 MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	67,25	34,49
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	367,75	96,47
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	412,75	120,20
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	497,00	121,46



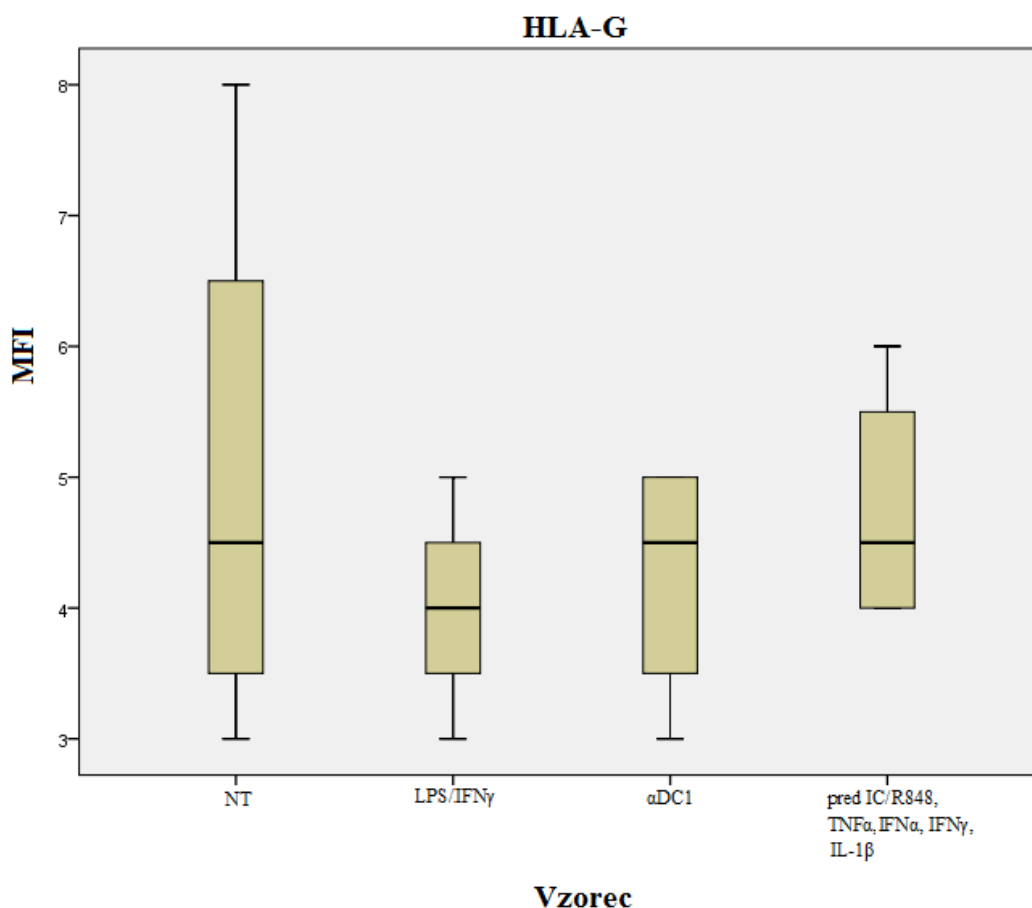
Slika 23: MFI za površinsko inhibitorno molekulo PD-L1 pri posamezni skupini zrelih DC in nezrele skupini »NT«

V tabeli (pregl. 14) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule PD-L1. Graf (slika 23) prikazuje izražanje inhibitorne molekule PD-L1 na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno da skupinae »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini« izražajo statistično značilno več molekule PD-L1 kot netretirana

skupina »NT« pri  $p < 0,05$ . Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni significantnih statističnih razlik v izražanju površinske inhibitorne molekule PD-L1. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 15: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule HLA-G pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (HLA-G MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	5,00	2,16
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	4,00	0,81
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	4,25	0,95
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	4,75	0,95



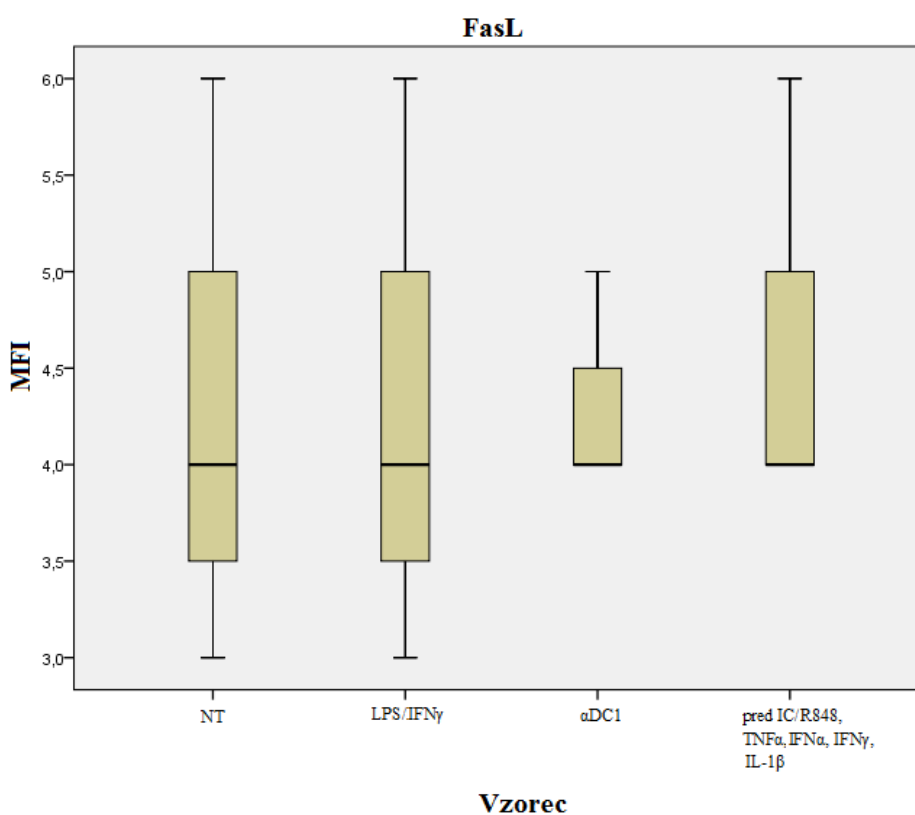
Slika 24: MFI za površinsko inhibitorno molekulo HLA-G pri posamezni skupini zrelih DC in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 15) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule HLA-G. Graf (slika 24) prikazuje izražanje inhibitorne molekule HLA-G na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter s testnimi skupinami in skupino »NT« ni significantnih statističnih razlik v izražanju

površinske inhibitorne molekule HLA-G. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 16: Povprečne vrednosti in standardne deviacije za MFI površinske inhibitorne molekule FasL pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (FasL MFI)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	4,25	1,25
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	4,25	1,25
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	4,25	0,50
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	4,50	1,00

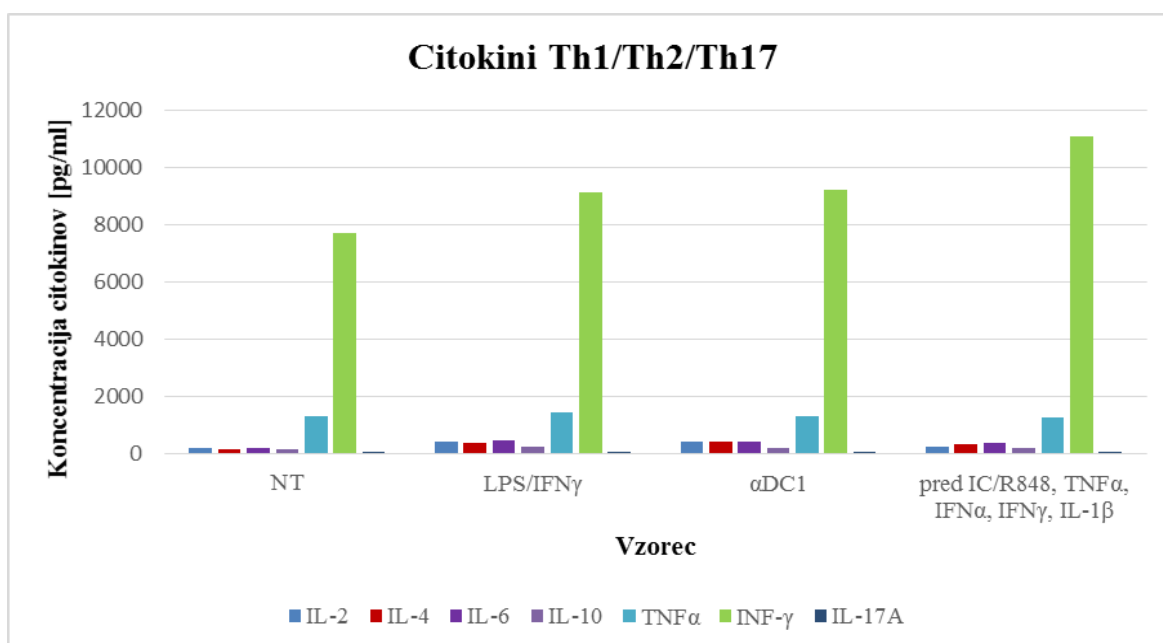


Slika 25: MFI za površinsko inhibitorno molekulo FasL pri posamezni skupini zrelih dendritičnih celic in nezreli skupini »NT«

V tabeli (pregl. 16) so podana povprečja in standardne deviacije za MFI molekule FasL. Graf (slika 25) prikazuje izražanje inhibitorne molekule FasL na površini zrelih DC in nezrele skupine »NT«. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni statističnih razlik v izražanju površinske inhibitorne molekule FasL. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

#### 4.5 KONCENTRACIJE CITOKINOV, SPROŠČENIH IZ AKTIVIRANIH LIMFOCITOV TH1/TH2/TH17

S pretočno citometrijo smo merili koncentracije sproščene citokinov iz aktivnih limfocitov Th1/Th2/Th17. Naivni CD4<sup>+</sup> limfociti T so bili sedem dni v kokulturi z zreli DC posameznih skupin in 48 ur tretirani z  $\alpha$ TCR makrokroglicami. Merjeni citokini so IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-17A.

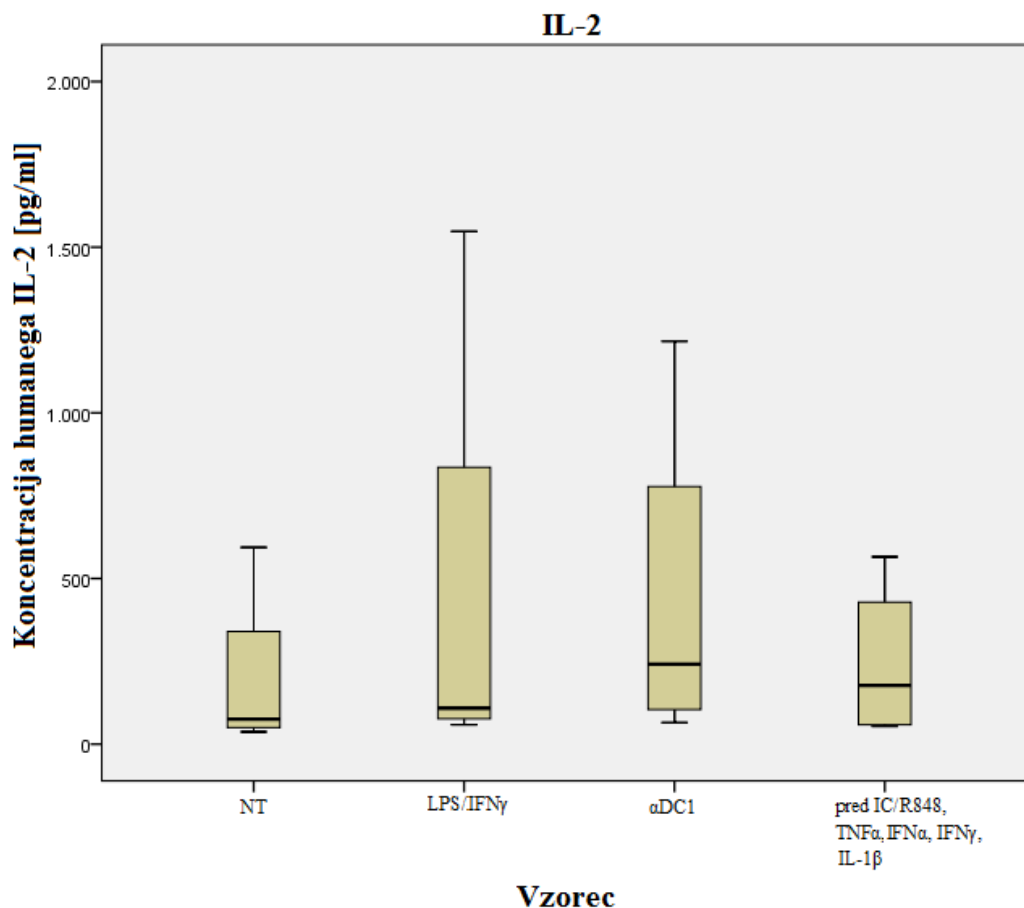


Slika 26: Povprečne vrednosti koncentracij posameznih citokinov, sproščene s strani aktiviranih CD4<sup>+</sup> limfocitov Th1/Th2/Th17, po kokulturi z zreli DC posameznih skupin in nezrele skupine »NT«

Graf (slika 26) prikazuje povprečja koncentracij citokinov za posamezne skupine limfocitov Th1/Th2/Th17, ki so bili kot naivni CD4<sup>+</sup> limfociti T v kokulturi z različnimi skupinami zrelih DC in nezrelo skupino »NT«. Iz grafa je razvidno, da je pri vseh skupinah prišlo do največjega izločanja citokina IFN $\gamma$  ter najmanjšega izločanja citokina IL-17A.

Preglednica 17: Povprečja in standardne deviacije koncentracij citokina IL-2 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-2 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	195,31	266,38
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	456,19	728,35
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	440,96	529,47
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	243,50	241,19

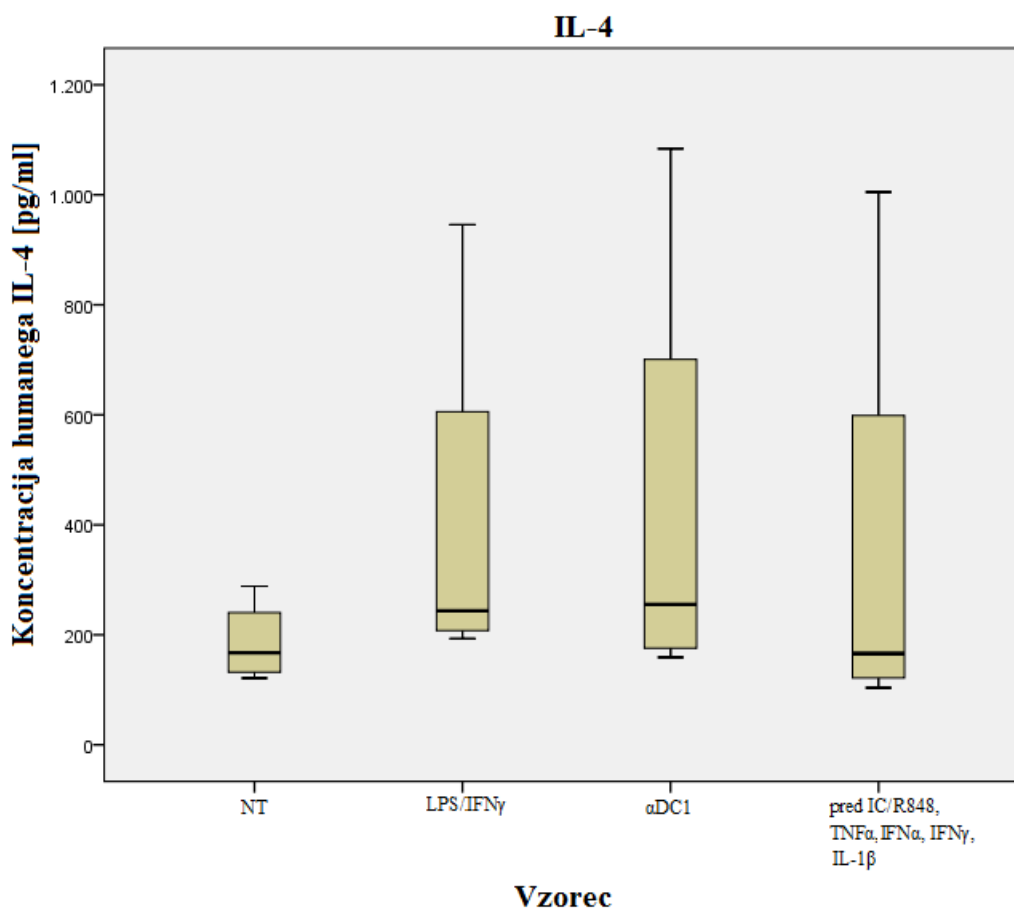


Slika 27: Koncentracije citokina IL-2 pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 17) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina IL-2 pri posameznih skupinah. Graf (slika 27) prikazuje koncentracije IL-2 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni statističnih razlik v izločanju citokina IL-2. ( $n$  (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 18: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-4 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-4 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	186,22	74,43
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	406,55	360,68
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	438,37	435,70
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	360,17	431,47



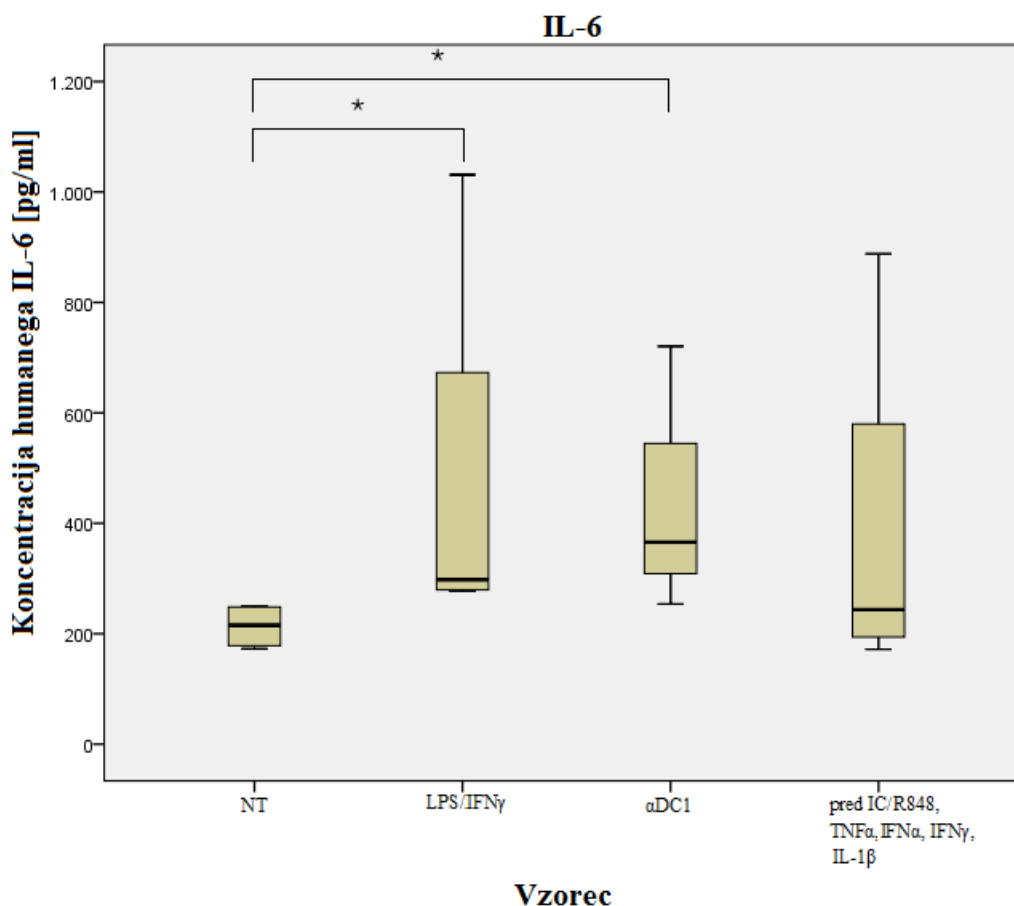
Slika 28: Koncentracije citokina IL-4 pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 18) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina IL-4 pri posameznih skupinah. Graf (slika 28) prikazuje koncentracijo IL-4 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni signifikantnih statističnih razlik v izločanju citokina IL-4. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).



Preglednica 19: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-6 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-6 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	213,42	40,66
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	476,01	370,38
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	426,62	202,99
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	386,94	336,61

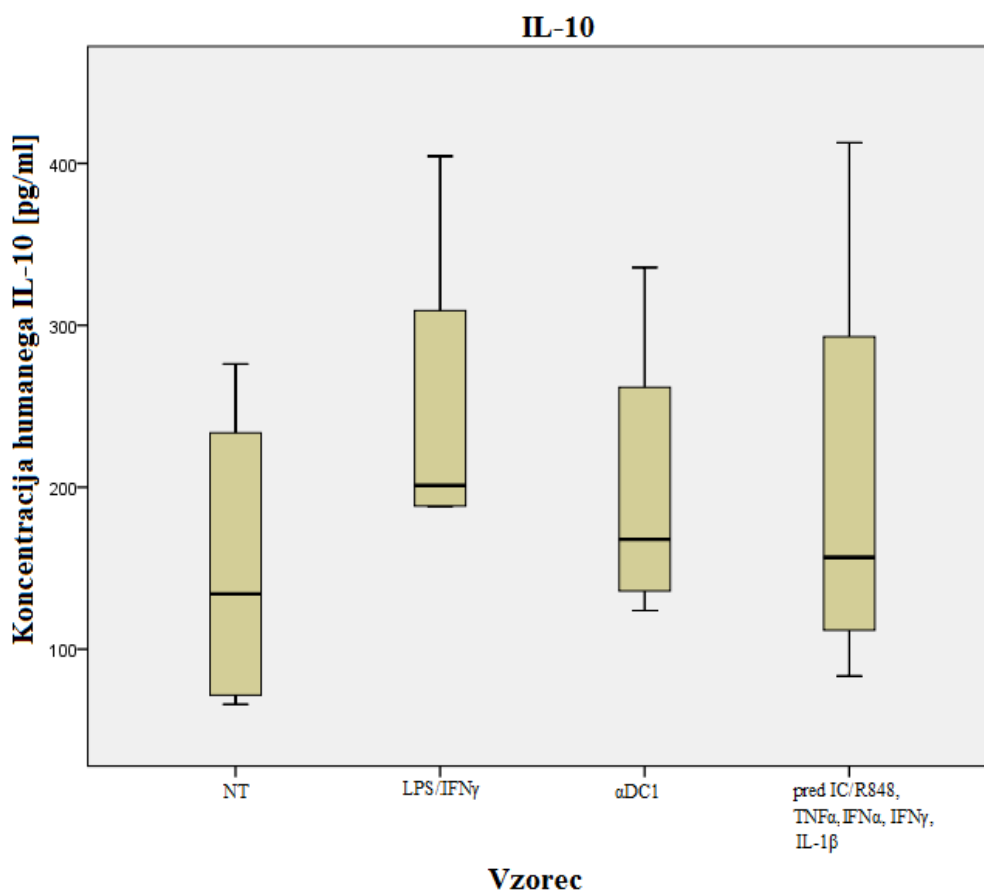


Slika 29: Koncentracije citokina IL-6 pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 19) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina IL-6 pri posameznih skupinah. Graf (slika 29) prikazuje koncentracijo IL-6 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da skupini »LPS/IFN $\gamma$ « in » $\alpha$ DC1« vodita v izločanje statistično značilno več citokina IL-6 kot netretirana skupina »NT« pri  $p < 0,05$ . Med ostalimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« pa ni signifikantnih statističnih razlik v izločanju citokina IL-6. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 20: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-10 pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-10 pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	152,60	99,85
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	248,73	104,43
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	198,80	94,97
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	202,34	145,10

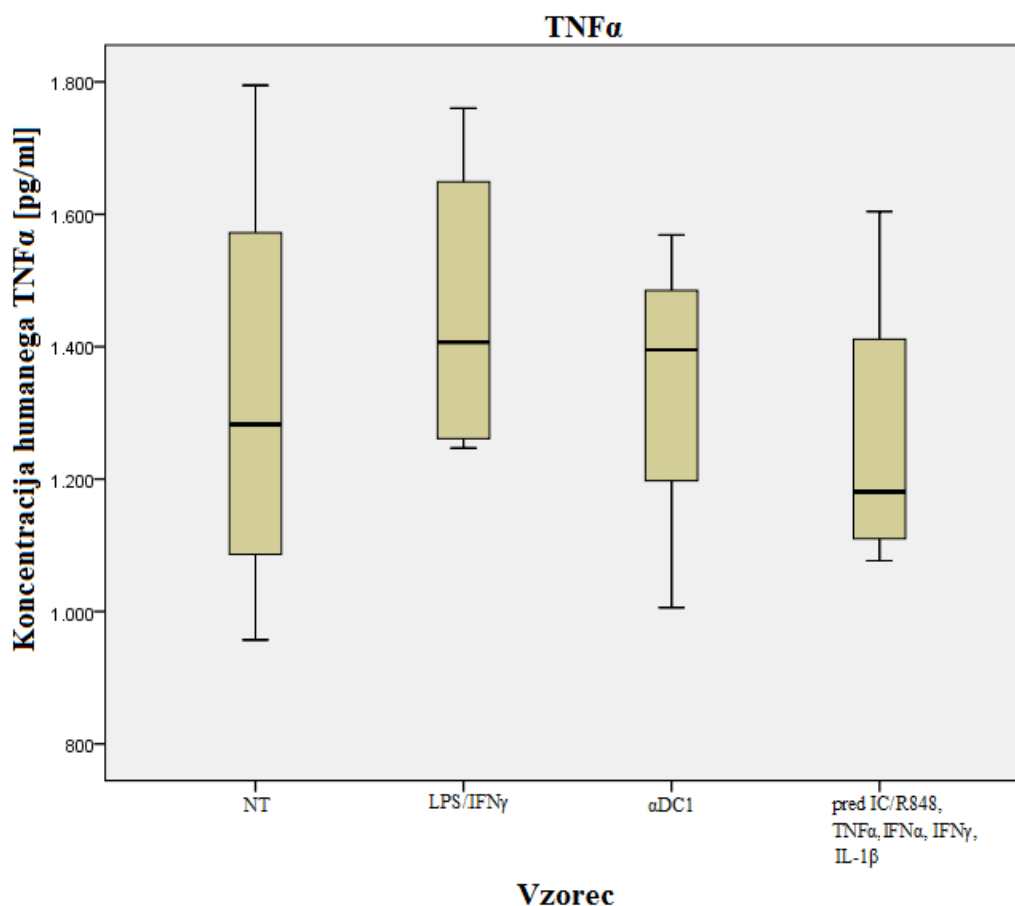


Slika 30: Koncentracije citokina IL-10 pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 20) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina IL-10 pri posameznih skupinah. Graf (slika 30) prikazuje koncentracijo IL-10 za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni signifikantnih statističnih razlik v izločanju citokina IL-10. ( $n$  (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 21: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina TNF $\alpha$  pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (TNF<math>\alpha</math> pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	1329,29	350,48
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	1455,08	241,95
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	1341,31	238,25
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	1260,62	236,29

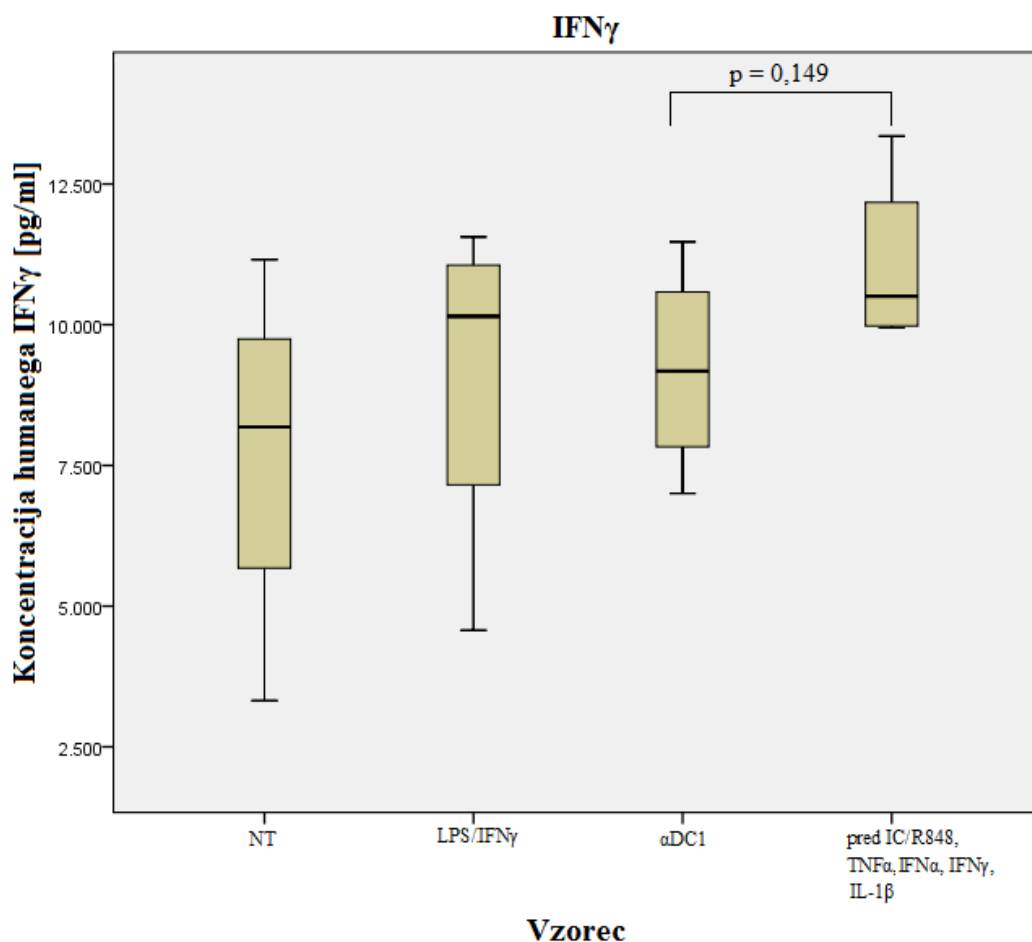


Slika 31: Koncentracije citokina TNF $\alpha$  pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 21) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina TNF $\alpha$  pri posameznih skupinah. Graf (slika 31) prikazuje koncentracijo TNF $\alpha$  za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni significantnih statističnih razlik v izločanju citokina TNF $\alpha$ . (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 22: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IFN $\gamma$  pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IFN<math>\gamma</math> pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	7712,17	3247,28
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	9107,57	3113,16
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	9207,19	1873,09
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	11076,18	1589,97

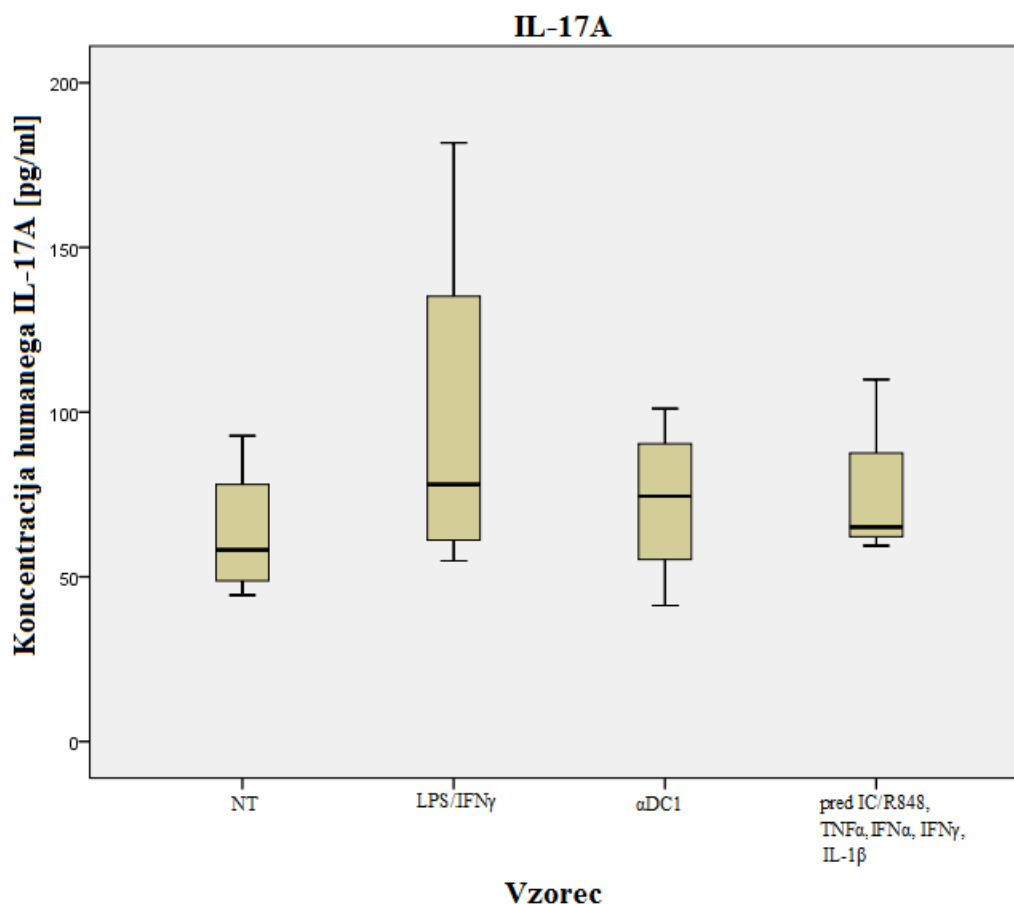


Slika 32: Koncentracije citokina IFN $\gamma$  pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 22) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina IFN $\gamma$  pri posameznih skupinah. Graf (slika 32) prikazuje koncentracijo IFN $\gamma$  za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni statističnih razlik v izločanju citokina IFN $\gamma$ . Med skupino » $\alpha$ DC1« in skupino »pred IC/R848 + citokini« je označena p-vrednost. (n (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

Preglednica 23: Povprečja in standardne deviacije za koncentracijo citokina IL-17A pri posameznih skupinah

<b>vzorec</b>	<b>povprečje (IL-17A pg/ml)</b>	<b>SD (+/-)</b>
<b>NT</b>	63,41	21,07
<b>LPS/IFN<math>\gamma</math></b>	98,17	57,43
<b><math>\alpha</math>DC1</b>	72,83	24,84
<b>pred IC/R848 + citokini</b>	74,88	23,48



Slika 33: Koncentracije citokina IL-17A pri posameznih skupinah

V tabeli (pregl. 23) so podana povprečja in standardne deviacije koncentracij izločenega citokina IL-17A pri posameznih skupinah. Graf (slika 33) prikazuje koncentracijo IL-17A za posamezne skupine. Iz grafa je razvidno da med testnimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ter testnimi skupinami in skupino »NT« ni statističnih razlik v izločanju citokina IL-17A. ( $n$  (NT; LPS/IFN $\gamma$ ;  $\alpha$ DC1; pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) = 4).

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 KONCENTRACIJA IL-12p70 IN IL-10

Eksperiment je bil narejen na devetih neodvisnih vzorcih. Ti vzorci so »NT«, » $\alpha$ DC1«, »IC/R848«, »IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «, »pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «, »pred IC/R848«, »LPS/IFN $\gamma$ «, »IC« in »R848«. Med skupinami zrelih DC smo primerjali izločanje citokina IL-12p70 in IL-10, po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40 ligandom. Vse vzorce smo primerjali s skupino » $\alpha$ DC1«, ki predstavlja svetovni patent za pridobivanje DC za uporabo kot protitumorska cepiva (Kalinski, 2011).

#### 5.1.1 Koncentracija citokina IL-12p70, merjena neposredno po 48 urnem zorenju dendritičnih celic

Napolitani in sodelavci (2005) navajajo, da je med površinskimi TLR (TLR3 in TLR4), ki so v citoplazemskem delu povezani s TRIF proteinom in endosomalnimi TLR (TLR8 in TLR9), sinergistična povezava, ki vodi v povečano produkcijo in izločanje IL-12p70. Za uspešen rezultat pa je potrebna predhodna triurna inkubacija s TLR3 oz. TLR4 agonisti, ki ji sledi še inkubacija z agonisti TLR8 oz. TLR9.

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da sta koncentraciji citokina IL-12p70 pri skupini »IC/R848 + citokini« in predinkubirani skupini »pred IC/R848 + citokini«, merjeno neposredno po 48 urnem zorenju DC z agonisti TLR in citokini v gojišču CellGro<sup>®</sup>, statistično značilno višji kot pri skupini » $\alpha$ DC1« pri  $p = 0,039$  in  $p = 0,023$ . Koncentracija citokina IL-12p70 pri skupini » $\alpha$ DC1« je statistično značilno višja kot pri netretirani kontrolni skupini »NT« pri  $p = 0,001$ . Koncentracije citokina IL-12p70 pri ostalih skupinah niso signifikantno statistično različne od skupine » $\alpha$ DC1« pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija citokina IL-12p70, merjena neposredno po 48 urah v gojišču, se nahaja med  $133,94 \pm 48,12$  pg/ml za netretirano skupino »NT« in  $4974,89 \pm 1652,67$  pg/ml za skupino

»pred IC/R848 + citokini«. Tako je koncentracija citokina IL-12p70, pri skupini »pred IC/R848 + citokini« najvišja. Takšen rezultat je tudi pričakovan, saj smo predhodno inkubirali DC dve uri s pI:C, ki predstavlja agonista za TLR3 ter nato tretirali te celice še z R848, ki predstavlja agonista za TLR8. Ob dodatku R848 smo dodali še vnetne citokine (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-1 $\beta$ ). S tem smo potrdili, da DC, ki so tretirane z dvema različnima agonistoma TLR ob dodatku vnetnih citokinov vodijo v večje izločanje citokina IL-12p70 kot skupina » $\alpha$ DC1«, neposredno po aktivaciji DC.

### **5.1.2 Koncentracija citokina IL-12p70, merjena po 24 urnem zorenju dendritičnih celic in 48 urnem tretiranju z mCD40L**

Zobywalski in sodelavci (2005) ter Lichtenegger in sodelavci (2012) objavljajo, da so zrele DC gojili v kokulturi z mišjimi fibroblasti (L-celice), ki na svoji površini izražajo CD40 ligand, da so simulirali aktivacijo DC ob stiku z naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T. Celice so v kokulturi gojili 24 ur ter nato izmerili koncentracijo IL-12p70. Napolitani in sodelavci (2005) objavljajo, da so v določenem delu eksperimenta zorili DC ob dodatku agonistov TLR, citokinov in hkratnem dodatku topnega CD40 liganda. Vsi so preverjali koncentracijo proteina z metodo ELISA.

V našem primeru smo zrele DC po 24 urnem zorenju sprali ter še 48 ur gojili ob dodatku mCD40 liganda. Koncentracijo proteina smo preverili z metodo ELISA.

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da je koncentracija citokina IL-12p70 pri predinkubirani skupini »pred IC/R848 + citokini«, merjeno po 24 urnem zorenju DC z agonisti TLR in citokini ter 48 urnem tretiranju z mCD40L v gojišču CellGro<sup>®</sup>, statistično značilno višja kot pri skupini » $\alpha$ DC1« pri  $p = 0,003$ . Koncentracije citokina IL-12p70 pri ostalih skupinah pa niso signifikantno statistično različne od skupine » $\alpha$ DC1« pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija citokina IL-12p70, merjena po 24 urnem zorenju DC in 48 urnem tretiranju z mCD40L, se nahaja med  $246,76 \pm 156,08$  pg/ml za skupino »R848« in  $1982,99 \pm 904,76$

pg/ml za skupino »pred IC/R848 + citokini«. Tako je koncentracija citokina IL-12p70, pri skupini »pred IC/R848 + citokini« najvišja. Takšen rezultat je tudi pričakovan, saj smo v času zorenja DC to skupino predhodno inkubirali dve uri s pI:C, ki je agonist za TLR3 ter nato po dveh urah tretirali te celice še z R848, ki je agonist za TLR8. Ob dodatku R848 smo dodali še vnetne citokine (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-1 $\beta$ ). S tem smo potrdili, da DC, ki so tretirane z dvema različnima agonistoma TLR ob dodatku vnetnih citokinov vodijo v večje izločanje citokina IL-12p70 kot skupina » $\alpha$ DC1«, po ligaciji DC s CD40L.

### **5.1.3 Koncentracija citokina IL-10, merjena neposredno po 48 urnem zorenju dendritičnih celic**

Hensen in sodelavci (2012) navajajo, da dodani IFN $\gamma$  v gojišče ob zorenju DC zavira hkratno izločanje IL-12p70 in IL-10.

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da so koncentracije citokina IL-10, pri skupinah »IC/R848«, »IC/R848 + citokini«, »pred IC/R848 + citokini« in »pred IC/R848«, merjeno neposredno po 48 urnem zorenju DC z agonisti TLR in citokini v gojišču CellGro<sup>®</sup>, statistično značilno višje kot pri skupini » $\alpha$ DC1« pri  $p = 0,004$ ;  $p = 0,002$ ;  $p = 0,002$  in  $p = 0,001$ . Koncentracija citokina IL-10 pri skupini » $\alpha$ DC1« je statistično značilno višja kot pri netretirani kontrolni skupini pri  $p = 0,019$ . Koncentracije citokina IL-10 pri ostalih skupinah pa niso signifikantno statistično različne od skupine » $\alpha$ DC1« pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija citokina IL-12p70, merjena neposredno po 48 urah v gojišču, se nahaja med  $128,60 \pm 116,01$  pg/ml za skupino »NT« in  $1668,42 \pm 1004,08$  pg/ml za skupino »pred IC/R848 + citokini«. Takšni rezultati nakazujejo na povišano koncentracijo izločenega IL-10 ob hkratnem dodatku pI:C in R848, saj so koncentracije IL-10 statistično značilno višje pri omenjenih skupinah, kot pri skupini » $\alpha$ DC1«, ki ne vsebuje R848. Koncentracija IL-12p70 je pri neposrednem merjenju v gojišču za skupino »pred IC/R848 + citokini« za približno 3 krat višja kot IL-10, medtem, ko je koncentracija IL-12p70 pri skupini » $\alpha$ DC1« za približno 6 krat višja kot IL-10. S tem ne potrjujemo predpostavke, da zrele DC,



tretirane z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, sproščajo manj IL-10 kot skupina » $\alpha$ DC1«, po aktivaciji DC.

#### **5.1.4 Koncentracija citokina IL-10, merjena po 24 urnem zorenju dendritičnih celic in 48 urnem tretiranju z mCD40L**

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da je koncentracija citokina IL-10 pri skupini »IC/R848«, merjeno po 24 urnem zorenju DC z agonisti TLR in citokini ter 48 urnem tretiranju z mCD40L v gojišču CellGro<sup>®</sup>, statistično značilno višja kot pri skupini » $\alpha$ DC1« pri  $p = 0,026$ . Koncentracija citokina IL-10 pri skupinah »IC/R848 + citokini«, »pred IC/R848 + citokini« in »pred IC/R848« je statistično značilno višja kot pri skupini » $\alpha$ DC1« pri  $p = 0,001$ ;  $p = 0,001$  in  $p = 0,002$ . Koncentracije citokina IL-10 pri ostalih skupinah pa niso signifikantno statistično različne od skupine » $\alpha$ DC1« pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

Po ligaciji z mCD40L je prav tako najvišja koncentracija IL-10 pri skupinah, ki so bile zorjene ob hkratnem dodatku pI:C in R848. Izkaže pa se, da je koncentracija IL-12p70, merjena po ligaciji z mCD40L za skupino »pred IC/R848 + citokini« za približno 3 krat višja kot IL-10, medtem, ko je koncentracija IL-12p70 pri skupini » $\alpha$ DC1« za približno 2,5 krat višja kot IL-10. Pri obeh skupinah je razmerje med IL-12p70 in IL-10 podobno oziroma pri skupini » $\alpha$ DC1« je celo nižje. S tem ne potrjujemo predpostavke, da zrele DC, tretirane z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini ter po ligaciji s CD40L, sproščajo manj IL-10 kot skupina » $\alpha$ DC1«.

#### **5.2 TEST MIGRACIJE DENDRITIČNIH CELIC**

Eksperiment je bil narejen na štirih neodvisnih vzorcih. Ti vzorci so »NT«, »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «. Med skupinami zrelih DC smo primerjali odzivnost na kemokin CCL21, ki se kaže v kemotaktični migraciji DC. Vse vzorce smo primerjali s skupino » $\alpha$ DC1« in »NT«.

Za doseganje protitumorskih odzivov imunskega sistema s strani zrelih DC je v brezserumskih kulturah potrebno pridobiti tri ključne lastnosti DC. Ob popolnem zrelem stanju in izločanju citokina IL-12p70, je ključnega pomena tudi migracija, ki jo aktivira odzivanje na kemokin CCL21 (Mailliard in sod., 2004). Ten Brinke in sodelavci (2007) objavljajo, da DC, zorjene po zlatem standardu (PGE<sub>2</sub>-prostaglandin E<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), kažejo popolno migracijsko sposobnost v laboratorijskih pogojih. Skupina » $\alpha$ DC1« je v njihovem primeru migrirala 40% glede na zlati standard. Enake rezultate v povezavi z migracijo DC zlatega standarda navajajo tudi Hansen in sodelavci (2012). Objavljajo, da vse skupine, ki niso zorjene po metodi zlatega standarda, izkazujejo manjšo odzivnost na kemokin CCL21. Receptor za kemokin CCL21 je CCR7, katerega izražanje omogočajo vnetni citokini. Zmanjšano odzivnost na kemokin CCL21 pri DC, ki niso zorjene po zlatem standardu, pripisujejo izločanju kemokina CCL19. Kemokin CCL19 izločajo zrele DC in ima avtokrino signaliziranje preko receptorja CCR7, ki privede do znižanja izražanja tega s procesom endocitoze. Po določenem časovnem obdobju pa pride do ponovnega izražanja receptorja CCR7 na račun razpada kemokina CCL19. Ponovno izražanje receptorja so opazili tudi po menjavi gojišča, torej ob odstranitvi kemokina CCL19.

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da je število zrelih DC skupin »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini«, ki so migrirale skozi »transwell« mikrotitrsko ploščo, statistično značilno večje kot netretirana skupina »NT« pri  $p = 0,003$ ,  $p = 0,009$  in  $p = 0,003$ . Število zrelih DC pri ostalih skupinah pa niso signifikantno statistično različne od » $\alpha$ DC1« pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

V našem primeru so vse tretirane skupine različne od zlatega standarda. Celice so bile preštete s pretočnim citometrom tako, da je citometer preštel število celic, ki so detektor prešle v času 60 sekund. Tako smo pridobili relativne podatke o migraciji celic posameznih skupin. Pretočni citometer je preštel glede na začetno število DC (~ 100 000), ki so bile v poskusu, približno 50 krat manj celic. Tako je dejansko število celic, ki so migrirale skozi pore »transwell« mikrotitrsko plošče, približno 50 krat večje. Glede na objave je tudi pričakovano, da med posameznimi skupinami in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantnih statističnih razlik v migraciji, razen med netretirano skupino in skupinami zrelih DC.

Dokazali smo, da so vse zrele DC sposobne dobre migracije, pri čemer se najboljša migracija kaže pri skupini »pred IC/R848 + citokini«. S tem pa ne potrjujemo predpostavke, da zrele DC, tretirane z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, izkazujejo boljšo migratorno odzivnost na kemokin CCL21 kot skupina » $\alpha$ DC1«. Kljub statistično nesignifikantni razliki v migracijski sposobnosti med » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini« pa izkazuje skupina »pred IC/R848 + citokini« za približno 65% višjo srednjo vrednost v migraciji kot skupina » $\alpha$ DC1«.

### 5.3 ANALIZA POVRŠINSKIH OZNAČEVALCEV ZORENJA (KOSTIMULATORNIH MOLEKUL IN KEMOKINSKEGA RECEPTORJA CCR7)

Eksperiment je bil narejen na petih neodvisnih vzorcih. Ti vzorci so »NT«, » $\alpha$ DC1«, »IC/R848«, »IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ « in »pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «. Med skupinami zrelih DC smo preverjali izražanje površinskih označevalcev zorenja. Vse skupine smo primerjali s skupino » $\alpha$ DC1«. Primerjali smo izražanje površinskih molekul CD80, CD83, CD86, HLA-DR in CCR7.

Mailliard in sodelavci (2004) v svoji raziskavi opisujejo, da IFN $\gamma$  in pI:C sinergistično vodita razvoj popolno zrelih DC v brez serumskih gojiščih. pI:C in IFN $\alpha$  pa skupaj vodita v izražanje značilnih površinskih označevalcev zorenja zrelih DC, medtem, ko ob odsotnosti IFN $\alpha$  pride do znižanja izražanja le-teh, ne pa tudi receptorja CCR7. Objavljajo, da skupina » $\alpha$ DC1« v brezserumskih pogojih izkazujejo popoln zrelostni fenotip kot celice zlatega standarda. Oboje izražajo visoko stopnjo površinskih molekul CD83, CD86 in CCR7. Hansen s sodelavci (2012) objavlja, da celice zlatega standarda izražajo bolj površinske molekule CD83, HLA-DR in CCR7, medtem, ko skupina » $\alpha$ DC1« izraža bolj CD80 in CD40. Zobywalski in sodelavci (2007) objavljajo, da v njihovi raziskavi vse skupine zrelih DC izražajo površinske molekule CD80, CD83, CD86 in CCR7. Od tega izstopata po izražanju molekuli CD80 in CD86. Enako navajajo tudi Ten Brinke in sodelavci (2007) s svojim poskusom, pri čemer so ravno tako vse skupine zrelih DC izražale CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CCR7 in CD40. V njihovem primeru kontrolna

skupina nezrelih DC ni izražala površinske molekule CD83. V tem poskusu med skupinami tudi ni bilo signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinskih molekul med posameznimi skupinami. Lichtenegger in sodelavci (2012) pa s svojimi raziskavami ugotavljajo, da zrele DC, ki izražajo površinsko molekulo CD80, molekula CD86 pa je inaktivirana, ne dosežejo polarizacije naivnih limfocitov CD4<sup>+</sup> v limfocite Th1, ki posledično ne izločajo citokina IFN $\gamma$ . Raziskave so pokazale tudi, da molekula CD86, skupaj s citokinom IL-12p70 vpliva na polarizacijo in aktivacijo limfocitov Th1 ob hkratni inaktivaciji molekule CD80.

V našem eksperimentu pri testnih skupinah ni prihajalo do signifikantnih statističnih razlik pri izražanju označevalcev zorenja, v primerjavi s skupino » $\alpha$ DC1« pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ). Podatki prikazujejo vrednosti srednjih fluorescenčnih intenzitet ali MFI.

Eksperiment je pokazal, da je pri vseh skupinah, vključno s skupino »NT«, prišlo do največjega izražanja površinske molekule CD86. Tako so vrednosti MFI za molekulo CD86 med  $304,71 \pm 26,56$  za skupino »NT« in  $951,99 \pm 151,74$  za skupino »pred IC/R848 + citokini«. Glede na objave raznih avtorjev je rezultat tudi pričakovan in zaželjen saj molekula CD86 in citokin IL-12p70 sinergistično vodita polarizacijo in aktivacijo Th1 limfocitov. Najnižjo intenziteto izražanja ima receptor CCR7. Vrednosti MFI za receptor CCR7 so med  $5,29 \pm 0,43$  za skupino »NT« in  $13,61 \pm 6,51$  za skupino »IC/R848«. Presenetljivo pri tem poskusu je dejstvo, da se izražanje značilnih označevalcev zorenja, ki so značilni za zrele DC, pojavlja tudi pri nezrelih DC kontrolne skupine »NT«. Da ni prihajalo do statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami zrelih DC in skupino » $\alpha$ DC1«, je glede na poročanje raznih avtorjev tudi pričakovano. Da pa ne prihaja do signifikantnih statističnih razlik med kontrolno skupino »NT« in » $\alpha$ DC1«, pripisujemo tudi premajhnemu vzorcu ponovitev testiranja na površinske označevalce zorenja. Gre zgolj za dve ponovitvi poskusa, tako, da v prihodnje priporočamo večje število ponovitev za boljšo statistično analizo in posledično boljši rezultat. Največ kostimulatorne molekule CD86 je izražala skupina »pred IC/R848 + citokini«, kar je tudi zaželjeno in uporabno. Ker pa med predinkubirano skupino in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantne statistične razlike v izražanju,

ne potrjujemo predpostavke, da zrele DC, tretirane z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, izražajo več površinskih kostimulatornih molekul kot skupina » $\alpha$ DC1«.

#### 5.4 ANALIZA POVRŠINSKIH INHIBITORNIH MOLEKUL

Eksperiment je bil narejen na štirih neodvisnih vzorcih. Ti vzorci so »NT«, »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «. Med skupinami zrelih DC smo primerjali izražanje površinskih inhibitornih molekul. Vse skupine smo primerjali s skupino » $\alpha$ DC1« in »NT«. Primerjali smo izražanje površinskih inhibitornih molekul ILT-2, ILT-3, ILT-4, PD-L1, HLA-DR in FasL.

Vasaturo in sodelavci (2013) opisujejo, da je pomembna inhibitorna molekula, ki se nahaja na površini zrelih DC in pa v večini primerov tudi na površini tumorskih celic, PD-L1. PD-L1 ne interagira samo z receptorjem PD-1, ki se nahaja na limfocitih T temveč tudi s CD80 molekulo, ki je prav tako izražena na površini limfocitov T ter tako inhibira delovanje limfocitov T in s tem posledično zniža produkcijo citokinov z njihove strani. PD-L1 na površini tumorskih celic pa je s svojimi lastnostmi tako povezana z agresivnostjo tumorja, slabo prognozo za pacienta in tako povečanim tveganjem za smrtnost. Tako je molekula PD-L1, ki se nahaja tako na normalnih celicah kot tudi na tumorskih celicah, znotraj tumorskega mikrookolja, zanimiva tarča za podporno imunoterapijo. Izkazalo se je, da PD-L1 molekula na zrelih DC, ki so med zorenjem tretirane s TLR3 agonisti, torej pI:C, vodi do slabše odzivnosti limfocitov T in se s tem kaže kot negativni regulator za ekspanzijo CD8<sup>+</sup> limfocitov T. Za inhibitorne molekule ILT je znano, da lahko neposredno zatrejo aktivacijo limfocitov T. Pri mnogih rakih je dokazano, da ILT-3, podobno kot PD-L1, omogoča metastaziranje zaradi inhibicije limfocitov T. ILT-4 inhibitorne molekule, ki so izražene na površini DC, zavirajo učinkovitost citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocitov. Pri pacientih z malignim melanomom, kolorektalnim rakom in rakom pankreasa, sta ILT-3 in ILT-4 udeležena v metastaziranju zaradi izogibanja imunskemu sistemu in tako onemogočata uspešne rezultate imunoterapije. Hansen in sodelavci (2012) opisujejo, da je pri vseh DC, ki niso bile zorjene po zlatem standardu, prišlo do višje stopnje izražanja površinske inhibitorne molekule PD-L1, kot pri celicah zlatega standarda.

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da je prišlo do statistično značilnega višjega izražanja inhibitorne molekule ILT-4 pri predinkubirani skupini »pred IC/R848 + citokini« v primerjavi s skupinami »NT«, »LPS/IFN $\gamma$ « in » $\alpha$ DC1« pri  $p = 0,020$ ,  $p = 0,021$  in  $p = 0,021$ . Skupine »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini« izražajo statistično značilno več inhibitorne molekule PD-L1 kot netretirana skupina »NT«, pri  $p = 0,021$ ,  $p = 0,021$  in  $p = 0,021$ . Pri ostalih inhibitornih molekulah pa med skupinami, primerjanimi s skupino » $\alpha$ DC1« in »NT«, ni prišlo do signifikantnih statističnih razlik pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ). Podatki prikazujejo vrednosti srednjih fluorescenčnih intenzitet ali MFI.

Eksperiment je pokazal, da je največje izražanje med skupinami, vključno s skupino »NT«, imela površinska inhibitorna molekula PD-L1. Vrednosti MFI za molekulo PD-L1 so med  $67,25 \pm 34,49$  za skupino »NT« in  $497,00 \pm 121,46$  za skupino »pred IC/R848 + citokini«. Rezultat je glede na poročanje člankov pričakovan. Najnižje izražanje je imela površinska inhibitorna molekula FasL. Vrednosti MFI za molekulo FasL so med  $4,25 \pm 1,25$  za skupino »NT« in  $4,50 \pm 1,00$  za skupino »pred IC/R848 + citokini«. Tako kot pri označevalcih zorenja, je tudi pri inhibitornih molekulah nepričakovano izražanje le-teh na površini nezrelih DC kontrolne skupine »NT«. Da ne prihaja do signifikantnih statističnih razlik v večini primerov med netretirano skupino »NT« in » $\alpha$ DC1« (izjema je molekula PD-L1), pripisujemo tudi premajhnemu vzorcu ponovitev testiranja na površinske inhibitorne molekule. Gre zgolj za štiri ponovitve poskusa, tako, da v prihodnje priporočamo večje število ponovitev za boljšo statistično analizo in posledično boljši rezultat. Predpostavka, da zrele DC, tretirane z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, izražajo več površinskih inhibitornih molekul kot skupina » $\alpha$ DC1«, velja samo v primeru molekule ILT-4 medtem ko za ostale inhibitorne molekule predpostavke ne moremo potrditi.

## 5.5 ANALIZA CITOKINOV, SPROŠČENIH IZ AKTIVIRANIH LIMFOCITOV TH1/TH2/TH17

Eksperiment je bil narejen na štirih neodvisnih vzorcih. Ti vzorci so »NT«, »LPS/IFN $\gamma$ «, » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ «. Posamezne skupine zrelih DC smo testirali na sposobnost polarizacije naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v zrele Th1 celice. V supernatantih smo preverili prisotnost različnih citokinov, ki jih sproščajo Th1, Th2 in Th17 podskupine CD4<sup>+</sup> limfocitov T. Preverjeni citokini so bili IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-17A. Vse skupine smo primerjali s skupino » $\alpha$ DC1« in »NT«.

Thaiss in sodelavci (2013) objavljajo, da je aktivacija CD4<sup>+</sup> Th1 limfocitov ključna za regulacijo signaliziranja med DC in CD8<sup>+</sup> citotoksičnimi limfociti T (CTL). Aktivacija Th1 celic s strani DC predstavlja vmesno nadzorno fazo, da se CTL ne bi aktivirali in odzivali na lastne antigene. Aktivirane CD4<sup>+</sup> celice nato omogočajo nadaljno aktivacijo DC, da lahko v procesu »cross-priming« predstavljajo celicam CTL antigene na molekulah MHC I. Za takšno aktivacijo DC je ključna vezava CD40L, ki je na površini aktiviranih CD4<sup>+</sup> limfocitov in CD40, ki je na površini aktiviranih DC. V naslednji fazi pride do sinteze in izločanja citokina IL-12p70, ki vpliva tudi na polarizacijo CTL. Vezava CD4<sup>+</sup> celic in DC pa omogoči tudi izražanje kostimulatornih molekul na površini DC, ki so pomembne za aktivacijo CTL. Lichenegger in sodelavci (2012) objavljajo, da so pri kokultivaciji zrelih DC in naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T za ugotavljanje polarizacije v Th1, Th2 in Th17, ugotovili, da pri zrelih DC, ki so bile ob zorenju tretirane z agonisti TLR3, limfociti izločali visoke koncentracije IFN $\gamma$ , kar nakazuje na polarizacijo v Th1. Rezultati so bili pričakovani, saj je sproščeni IL-12p70 ključen za polarizacijo CD4<sup>+</sup> v Th1 celice. Ugotovili so, da vse DC, ki so zorjene z dodatkom agonistov TLR in izločajo IL-12p70, vodijo v polarizacijo Th1 celic. Hansen s sodelavci (2012) objavlja, da so DC skupine » $\alpha$ DC1« vodile v polarizacijo Th1 bolj učinkovito kot celice zlatega standarda. Pred tem so tudi Ten Brinke in sodelavci (2007) objavili, da celice zlatega standarda vodijo polarizacijo pretežno v Th2, kar je nakazovalo povečano izločanje IL-4, ki je značilen za te celice. Ostale celice, ki so bile zorjene različno od zlatega standarda pa so vodile polarizacijo v Th1, kar je nakazovalo večje izločanje IFN $\gamma$ . Mailliard in sodelavci (2004) pa objavljajo da

so DC, zorjene samo ob dodatku pI:C, brez IFN $\gamma$ , kljub nizkemu izločanju IL-12p70, vodile v polarizacijo Th1.

Statistična analiza našega eksperimenta je pokazala, da so naivni CD4<sup>+</sup> limfociti, ki so bili v kokulturi z DC skupine »LPS/IFN $\gamma$ « in » $\alpha$ DC1«, po polarizaciji izločali statistično značilno več citokina IL-6 kot netretirana skupina »NT« pri  $p = 0,021$  in  $p = 0,021$ . Pri ostalih skupinah, ki smo jih primerjali s skupino » $\alpha$ DC1« in skupino »NT« pa ni prišlo do signifikantnih statističnih razlik pri izločanju posameznih citokinov pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

Eksperiment je pokazal, da je med vsemi skupinami prišlo do največjega izločanja citokina IFN $\gamma$ . Koncentracija citokina IFN $\gamma$  se nahaja med  $7712,17 \pm 3247,28$  pg/ml za netretirano skupino »NT« in  $11076,18 \pm 1589,97$  pg/ml za skupino »pred IC/R848 + citokini«. To nakazuje na polarizacijo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1, kar je tudi zaželjeno. Najnižje je bilo izločanje citokina IL-17A. Koncentracija citokina IL-17A se nahaja med  $63,41 \pm 21,07$  pg/ml za netretirano skupino »NT« in  $98,17 \pm 57,43$  pg/ml za skupino »LPS/IFN $\gamma$ «. Takšen rezultat je pričakovan glede na visoko koncentracijo izločanega IL-12p70 in izražanju kostimulatornih površinskih molekul na zrelih DC, predvsem CD86. Kar ni v pričakovanju je to, da so v polarizacijo Th1 vodile tudi nezrele DC skupine »NT«. To pripisujemo relativno visoki stopnji izražanja kostimulatornih molekul na površini le-teh. Zanimivo je tudi to, da med raznimi skupinami ni prišlo, v primerjavi s skupino » $\alpha$ DC1«, do signifikantnih statističnih razlik v izločanju IFN $\gamma$ . Ta rezultat pripisujemo izražanju inhibitornih molekul na površini posameznih skupin zrelih DC, vključno z nezrelo skupino »NT«, med katerimi pri večini tudi ni prihajalo do signifikantnih statističnih razlik v izražanju. Predlagamo pa tudi, da se eksperiment ponovi v večjem številu, v tem primeru je šlo za štiri ponovitve. V najboljše izločanje citokina IFN $\gamma$  s strani Th1 je vodila skupina zrelih DC skupine »pred IC/R848 + citokini«, kar je tudi zaželjeno in uporabno. Ker pa med predinkubirano skupino in skupino » $\alpha$ DC1« ni signifikantne statistične razlike v izločanju IFN $\gamma$ , ne potrjujemo predpostavke, da zrele DC, tretirane z dvema različnima agonistoma TLR in vnetnimi citokini, izkazujejo boljšo sposobnost polarizacije naivnih CD4<sup>+</sup> v Th1 kot skupina » $\alpha$ DC1«. Kljub statistično nesignifikantni razliki v koncentraciji



IFN $\gamma$  med » $\alpha$ DC1« in »pred IC/R848 + citokini« pa izkazuje skupina »pred IC/R848 + citokini« za približno 20% višjo srednjo vrednost izločanja IFN $\gamma$  kot skupina » $\alpha$ DC1«.

## 6 SKLEPI

Pri analizah koncentracij citokina IL-12p70, merjenega po aktivaciji DC, smo ugotovili, da predhodna inkubacija nezrelih DC s TLR3 agonisti (v našem primeru pI:C) in poznejša s TLR8 agonisti (v našem primeru R848) ter vnetnimi citokini (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-1 $\beta$ ) vodi do največjega izločanje le-tega. Pri analizah koncentracij citokina IL-12p70, merjenega po ligaciji zrelih DC s CD40L je prav tako najvišja koncentracija pri skupini celic, ki so bile v času zorenja predhodno inkubirane z agonistom TLR3 ter kasneje še s TLR8 agonistom in vnetnimi citokini.

Pri analizah koncentracij IL-10, merjenega po aktivaciji DC, smo ugotovili, da vse skupine zrelih DC, ki so bile tretirane tako s TLR3 agonistom kot tudi TLR8 agonistom (v našem primeru s pI:C in R848), izločajo največ le-tega. Izkazalo se je, da je koncentracija IL-12p70 pri najboljši predinkubirani skupini približno trikrat višja od koncentracije IL-10 medtem ko je pri skupini » $\alpha$ DC1« koncentracija IL-12p70 približno šestkrat večja od koncentracije IL-10. Pri analizah koncentracij IL-10, merjenega po ligaciji zrelih DC s CD40L, se kaže podobno kot pri IL-10, merjenem po aktivaciji DC. Vse zrele DC, ki so bile v času zorenja inkubirane z agonistom TLR3 in TLR8, izločajo večje količine IL-10 kot skupina » $\alpha$ DC1«. Vendar je v tem primeru koncentracija IL-12p70 pri predinkubirani skupini, ki je izločala največ IL-10, približno trikrat večja in prav tako je približno trikrat večja koncentracija IL-12p70 od koncentracije IL-10, pri skupini » $\alpha$ DC1«.

Pri testu migracije zrelih DC se je izkazalo, da ni significantnih statističnih razlik v migraciji pri različno zorjenih DC v primerjavi s kontrolno skupino » $\alpha$ DC1«. Statistično značilna razlika se je pokazala samo med nezrelo skupino »NT« in vsemi skupinami zrelih DC. To nakazuje na enako migratorno uspešnost posameznih skupin zrelih DC, ki so zorjene po metodah, ki se razlikujejo od metode zlatega standarda. Izkazuje pa skupina »pred IC/R848 + citokini« za približno 65% višjo srednjo vrednost v migraciji kot skupina » $\alpha$ DC1«.

Analiza površinskih označevalcev zorenja je pokazala, da se pri vseh skupinah zrelih DC, vključno z netretirano kontrolno skupino »NT«, najintenzivneje izraža površinska kostimulatorna molekula CD86. To je tudi zaželeno saj molekula CD86 in IL-12p70, sinergistično vodita polarizacijo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip. Glede na to, da se izražajo kostimulatorne molekule tudi na netretirani skupini »NT« in ne prihaja do signifikantnih statističnih razlik v izražanju kostimulatornih molekul in receptorja CCR7 med netretirano skupino »NT« in skupino »αDC1«, predlagamo večje število ponovitev poskusa.

Analiza površinskih inhibitornih molekul je pokazala, da se je pri vseh skupinah zrelih DC, vključno z netretirano kontrolno skupino »NT«, najintenzivneje izraža površinska inhibitorna molekula PD-L1. Podobno kot pri kostimulatornih molekulah, je prišlo tudi v tem primeru do izražanja inhibitornih molekul na površini nezrelih DC. Ker ni prišlo do signifikantnih statističnih razlik med izražanjem površinskih inhibitornih molekul med skupino »NT« in skupino »αDC1« (izjema je molekula PD-L1), predlagamo večje število ponovitev poskusa.

Test sposobnosti zrelih DC polarizacije naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip je pokazal, da je v gojišču najvišja koncentracija citokina IFN $\gamma$ , kar nakazuje na polarizacijo v smeri Th1. S tem je test tudi pokazal učinkovito sinergijo izločenega citokina IL-12p70 in površinske kostimulatorne molekule CD86 s strani zrelih DC, da izzovejo polarizacijo v smer Th1. Ker pa ni prišlo do signifikantnih razlik med vzorci v koncentraciji izločenih citokinov, z izjemo IL-6 med »NT« in »LPS/IFN $\gamma$ « ter »NT« in »αDC1«, in je polarizacijo izzvala tudi nezrela skupina DC »NT«, pripisujemo to dejstvo relativno visoki stopnji izražanja površinske inhibitorne molekule PD-L1, ki so hkrati tudi zavirale aktivacijo Th1. Predlagamo tudi več ponovitev poskusa. Izkazuje pa skupina »pred IC/R848 + citokini« za približno 20% višjo srednjo vrednost izločanja IFN $\gamma$  kot skupina »αDC1«. Tako se je predinkubirana skupina »pred IC/R848 + citokini« z izločanjem IL-12p70 (po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L), migratorni sposobnosti, izražanjem površinske kostimulatorne molekule CD86 in sposobnosti polarizacije CD4<sup>+</sup> naivnih limfocitov T v Th1 podtip, izkazala za najprimernejšo.

## 7 POVZETEK

Pri zdravljenju rakavih obolenj se poslužujemo standardnih terapij kot so kirurgija, kemoterapija in radioterapija. Gre za učinkovite metode za zmanjšanje večjih tumorskih mas vendar s temi metodami ne dosežemo odstranitve vseh tumorskih celic in posledično ozdravitve bolezni. Z namenom raziskav novih metod za odstranjevanje tumorskih celic so se v raziskovalnih in kliničnih preizkušnjah s svojimi lastnostmi izkazale DC kot uporabno biotehnološko orodje za protitumorska cepiva. Lastnosti DC, ki so ene od specializiranih APC, so privzem okoljskih antigenov, zorenje, migracija v sekundarne limfatične organe ter aktivacija naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T. Te ključne lastnosti so se izkazale kot bistvene za nadaljnjo aktivacijo specifičnih protitumorskih CD8<sup>+</sup> limfocitov T, ki sodelujejo pri apoptozi tumorskih celic. Tako so lastnosti DC, ki so pomembne za razvoj protitumorskih cepiv, popolni zrelostni status, migratorna sposobnost in visoke koncentracije sinteze ter sproščanja citokina IL-12p70, ki vodi diferenciacijo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip. Th1 celice pa so bistvenega pomena za aktivacijo interakcije DC s citotoksičnimi CD8<sup>+</sup> limfociti T. Vse te lastnosti pa lahko pridobimo v laboratorijskih pogojih. Bilo je narejeno mnogo laboratorijskih protokolov za pridobitev DC kot protitumorskih cepiv, ki temeljijo na uporabi ligandov »toll« podobnih receptorjev in vnetnih citokinov, kot so IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  in drugi.

Glavni namen našega eksperimentalnega dela je bil določiti primerno kombinacijo agonistov »toll« podobnih receptorjev in vnetnih citokinov, ki bodo vodile v čim večje izločanje citokina IL-12p70, neposredno po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L, ki simulira vezavo DC z naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T. Poleg citokina IL-12p70 smo preverjali še izločanje citokina IL-10, po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L, test migracije DC, izražanje površinskih kostimulatornih (CD80, CD83, CD86, HLA-DR in receptor CCR7) in inhibitornih (ILT-2, ILT-3, ILT-4, PD-L1, HLA-G in FasL) molekul ter sposobnost polarizacije naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip s kokulturo DC ter naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T. Ključna gojišča za gojenje DC za klinično uporabo so brezserumska gojišča. V našem primeru smo uporabljali brezserumsko gojišče CellGro<sup>®</sup> z dodanim 1% AB-človeškim serumom. Za pridobitev DC smo predhodno iz periferne krvi naključnih zdravih

krvodajalcev izolirali mononuklearne celice, iz katerih smo nadaljnje z imunomagnetno metodo izolirali monocite. Monocite smo nato pet dni inkubirali v gojišču CellGro<sup>®</sup> ob dodatku GM-CSF in IL-4 pri 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Po petih dneh smo pridobili iz monocitov diferencirane nezrele DC. Nezrele DC smo tretirali z različnimi kombinacijami agonistov TLR (LPS, pI:C, R848) in vnetnih citokinov (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ). Izločanje citokina IL-12p70 in IL-10, po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L, smo merili z imunoadsorpcijskim testom ELISA; test migracije smo preverjali s »transwell« mikrotitrsko ploščo in sicer odzivnost DC na kemokin CCL21; površinske kostimulatorne in inhibitorne molekule smo preverjali s pretočnim citometrom; izločene citokine v gojišču s strani polariziranih limfocitov T pa smo prav tako preverjali s pretočnim citometrom.

Rezultati raziskav so pokazali, da skupine zrelih DC, ki so predhodno med zorenjem bile tretirane z agonistom TLR3 (pI:C) in kasneje po dveh urah še z agonistom TLR8 (R848) in vnetnimi citokini (TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  in IL-1 $\beta$ ), izločale največ citokina IL-12p70 tako po aktivaciji kot tudi po ligaciji s CD40L. Ugotovili smo, da vse skupine DC, ki so bile tretirane tako s TLR3 agonistom (pI:C) kot tudi agonistom TLR8 (R848), izločajo večjo količino citokina IL-10, kot skupine, ki so bile tretirane samo z enim od agonistov TLR. Enake ugotovitve veljajo tudi za izločanje IL-10 po ligaciji s CD40L. Pri tem pa je pomembno, da predinkubirana skupina in kontrolna skupina » $\alpha$ DC1« po ligaciji s CD40L obe izločata približno trikrat več citokina IL-12p70 kot IL-10. Pri testu migracije DC v odzivnosti na kemokin CCL21 ni prišlo do signifikantnih statističnih razlik med skupinami zrelih DC in kontrolno skupino » $\alpha$ DC1«. To nakazuje na enako uspešno odzivnost na kemokin CCL21 z migratornim odzivom. Izkazuje pa skupina »pred IC/R848 + citokini« za približno 65% višjo srednjo vrednost v migraciji kot skupina » $\alpha$ DC1«. Pri izražanju označevalcev zorenja oziroma kostimulatornih molekul in receptorja CCR7 smo ugotovili, da pri vseh skupinah, vključno z nezrelo skupino »NT«, prihaja do največjega izražanja molekule CD86. Ta molekula hkrati z IL-12p70 sinergistično vodi polarizacijo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1 podtip. Med skupinami zrelih DC in skupino » $\alpha$ DC1« ter »NT« ni prihajalo do signifikantnih statističnih razlik, kar pripisujemo tudi premalemu številu ponovitev poskusa. Pri izražanju površinskih inhibitornih molekul pri posameznih skupinah, je prihajalo do največjega izražanja molekule PD-L1, ki je pomembna tudi na

površini številnih tumorskih celic. To se je kazalo tudi pri nezreli skupini »NT«. V večini primerov ni prišlo do signifikantnih statističnih razlik v izražanju površinskih inhibitornih molekul pri skupinah zrelih DC v primerjavi s skupino » $\alpha$ DC1« in »NT«. Pri tem poskusu posledično priporočamo večje število poskusov. Rezultati testa sposobnosti polarizacije naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v Th1, Th2 in Th17 podskupine s strani DC je pokazal, da je prišlo do najvišjega izločanja citokina IFN $\gamma$ , kar nakazuje na polarizacijo v Th1 podtip. V večini primerov, z izjemo IL-6, ni prišlo do signifikantnih statističnih razlik v izločanju posameznih citokinov s strani polariziranih CD4<sup>+</sup> limfocitov T ob skupinah zrelih DC, v primerjavi s skupino » $\alpha$ DC1« in »NT«. Izkazuje pa skupina »pred IC/R848 + citokini« za približno 20% višjo srednjo vrednost izločanja IFN $\gamma$  kot skupina » $\alpha$ DC1«. Tudi v tem primeru predlagamo večje število ponovitev poskusa. Predinkubirana skupina »pred IC/R848 + citokini« se je z izločanjem IL-12p70 (po aktivaciji DC in po ligaciji s CD40L), migratorni sposobnosti, izražanjem površinske kostimulatorne molekule CD86 in sposobnosti polarizacije CD4<sup>+</sup> naivnih limfocitov T v Th1 podtip, izkazala za najprimernejšo.

## 8 VIRI

- Aerts-Toegaert C., Heirman C., Tuyaerts S., Corthals J., Aerts J. L., Bonehill A., Thielemans K., Breckpot K. 2007. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *European Journal of Immunology*, 37, 3: 686-695
- Alvarez D., Vollmann E. H., Andrian U. H. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell. *Migration Immunity*, 29, 3: 325-342
- Amiot L., Vu N., Samson M. 2015. Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases. *Journal of Hepatology*, 62, 6: 1430-1437
- Berk E., Muthuswamy R., Kalinski P. 2012. Lymphocyte-polarized dendritic cells are highly effective in inducing tumor-specific CTLs. *Vaccine*, 30, 43: 6216-6224
- Calmon-Hamaty F., Audo R., Combe B., Morel J., Hahne M. 2015. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? *Cytokine*, 75, 2: 228-233
- Capobianchi M. R., Uleri E., Caglioti C., Dolei A. 2015. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26, 2: 103-111
- Caraglia M., Marra M., Pelaia G., Maselli R., Caputi M., Marsico S. A., Abbruzzese A. 2005. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 202, 2: 323-335
- Chen L., Flies D. B. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13, 4: 227-242
- Chen W., Xu H., Wang X., Gu J., Xiong H., Shi Y. 2015. The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. *International Immunopharmacology*, 28 1: 146-153
- Conzelmann M., Wagner A. H., Hildebrandt A., Rodionova E., Hess M., Zota A., Giese T., Falk C. S., Ho A. D., Dreger P., Hecker M., Luft T. 2010. IFN- $\gamma$  activated JAK1 shifts CD40-induced cytokine profiles in human antigen-presenting cells toward high IL-12p70 and low IL-10 production. *Biochemical Pharmacology*, 80, 12: 2074-2086
- Cullen S. P., Brunet M., Martin S. J. 2010. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death & Differentiation*, 17: 616-623
- Dardick C., Ronald P. 2006. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLOS Pathogens*, 2, 1: 1-15

- Dauer M., Obermaier B., Herten J., Haerle C., Pohl K., Rothenfusser S., Schnurr M., Endres S., Eigler A. 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *The Journal of Immunology*, 170, 8: 4069-4076
- De Kleer I., Willems F., Lambrecht B., Goriely S. 2014. Ontogeny of Myeloid Cells. *Front Immunol*, 5: 1-11  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4153297/> (15. september 2015)
- De Palma M., Hanahan D. 2012. The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Molecular Oncology*, 6, 2: 111-127
- Divanovic S., Trompette A., Atabani S. F., Madan R., Golenbock D. T., Visintin A., Finberg R. W., Tarakhovskiy A., Vogel S. N., Belkaid Y., Kurt-Jones E. A., Karp C.L. 2005. Inhibition of TLR-4/MD-2 signaling by RP105/MD-1. *Journal of Endotoxin Research*, 11, 6: 363-368
- Dustin M. L. 2002. Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *The Journal of Clinical Investigation*, 109, 2: 155-160
- ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets - Human IL-10. 2015. BioLegend.  
[http://www.biolegend.com/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/431704.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/431704.pdf) (13. maj 2015)
- ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets - Human IL-12 (p70). 2015. BioLegend.  
[http://www.biolegend.com/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/430604.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/430604.pdf) (13. maj 2015)
- Geijtenbeek T. B., Gringhuis S. I. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9, 7: 465-479
- Girard T., Gaucher D., El-Far M., Breton G., Sékaly R. P. 2014. CD80 and CD86 IgC domains are important for quaternary structure, receptor binding and co-signaling function. *Immunology Letters*, 161, 1: 65-75
- GMP Serum-free Dendritic Cell Medium (DC). 2012 Data Sheet: CellGro<sup>®</sup>/CellGenix<sup>TM</sup>  
[http://www.cellgenix.com/fileadmin/published\\_content/3\\_downloads/5.3\\_DS\\_Medium\\_GMP/Data\\_Sheet\\_GMP\\_DC\\_ME-DS-2001a.pdf](http://www.cellgenix.com/fileadmin/published_content/3_downloads/5.3_DS_Medium_GMP/Data_Sheet_GMP_DC_ME-DS-2001a.pdf) (12. december 2015)
- Hansen M., Hjortø G. M., Donia M., Met Ö., Larsen N. B., Andersen M. H., Straten P., Svane I. M. 2013. Comparison of clinical grade type 1 polarized and standard matured dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vaccine*, 31, 4: 639-646
- Hart D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90, 9: 3245-3287



- Hennies C. M., Lehn M. A., Janssen E. M. 2015. Quantitating MHC class II trafficking in primary dendritic cells using imaging flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 423: 18-28
- Heystek H. C., Drijver B., Kapsenberg M. L., Lier R. A., Jong E. C. 2003. Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN-gamma-mediated signaling. *Clinical Immunology*, 107, 3: 170-177
- Interleukin Receptors. 2015. BioLegend.  
[http://www.biolegend.com/interleukin\\_receptors](http://www.biolegend.com/interleukin_receptors) (13. maj 2015)
- Ishibashi M., Miyana Y., Matsuoka S., Kozuka J., Togashi Y., Kinashi T., Ueda M. 2015. Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464, 2: 459-466
- Israely T., Melamed S., Achdout H., Erez N., Politi B., Waner T., Lustig S., Paran N. 2014. TLR3 and TLR9 agonists improve postexposure vaccination efficacy of live smallpox vaccines. *PLoS One*, 9, 10: 1-17  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211728/> (9. april 2015)
- Jahromi M. A. M., Hosseini S. Y., Bozorgmehr M., Baesi K., Azadmanesh K., Hassan Z. M., Moazzeni S. M. 2014. Adenovirus-mediated overexpression of gamma interferon in murine bone marrow-derived dendritic cells affects their viability and activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1, 4: 353-359
- Jaillon S., Peri G., Delneste Y., Frémaux I., Doni A., Moalli F., Garlanda C., Romani L., Gascan H., Bellocchio S., Bozza S., Cassatella M. A., Jeannin P., Mantovani A. 2007. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, 16, 204: 793–804
- Kalinski P. 2011. Mature type-1 polarized dendritic cells with enhanced IL-12 production and methods of serum-free production and use. United states patent. US 7,972,847 b2, 23 str.
- Kalinski P., Okada H. 2010. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Seminars in Immunology*, 22, 3: 173-182
- Kim J., Yoon Y., Jeoung D., Kim Y. M., Choe J. 2015. Interferon- $\gamma$  stimulates human follicular dendritic cell-like cells to produce prostaglandins via the JAK-STAT pathway. *Molecular Immunology*, 66, 2: 189-196
- Kitagawa M., Shiozaki A., Ichikawa D., Nakashima S., Kosuga T., Konishi H., Komatsu S., Fujiwara H., Okamoto K., Otsuji E. 2015. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of gastric cancer MKN28 cells: accelerated degradation of the inhibitor of apoptosis family members. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 15, 566: 43-48

- Kotnik V., Čurin Šerbec V., Hartman Pretnar K., Ihna A., Jeras M., Kopitar A.N., Malovrh T., Simčič S., Stopinšek S., Skvarč M., Vidan Jeras B., Wraber B. 2010. Imunološki priročnik. Ljubljana, Itagraf grafično podjetje d.o.o.: 78 str.
- Kuehn C., Vermette P., Fülöp T. 2014. Cross talk between the extracellular matrix and the immune system in the context of endocrine pancreatic islet transplantation. A review article. *Pathologie biologique*, 62, 2: 67-78
- Lichtenegger F.S., Mueller K., Otte B., Beck B., Hiddemann W., Schendel D. J., Subklewe M. 2012. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells. *PLoS One*, 7, 9: 1-9  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433478/> (22. junij 2015)
- Lim W. S., Ying Gan M. S., Ling Ong M. H., Chew C. H. 2015. Lauric acid abolishes interferon-gamma (IFN-g)-induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human macrophages. *Asian Pacific Journal of Reproduction Volume*, 4, 3: 217-221
- Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A. H., Jonuleit H. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*, 80, 5: 477-483
- Mailliard R. B., Wankowicz-Kalinska A., Cai Q., Wesa A., Hilkens C. M., Kapsenberg M. L., Kirkwood J. M., Storkus W. J., Kalinski P. 2004. Alpha-type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool With Optimized CTL-inducing. *Cancer Research*, 64, 17: 5934-5937
- McInnes I. B. 2012. Cytokines. V: *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Gary S. Firestein G. S., Budd R. C., Gabriel S. E., Iain B. McInnes I. B., O'Dell J. R. 9th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 369-382
- Merad M., Manz M. G. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 13,15: 3418-3427.
- Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*, 6, 8: 769-776
- Pico de Coaña Y., Choudhury A., Kiessling R. 2015. Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system. *Trends in Molecular Medicine*, 21, 8: 482-491
- Portou M. J., Baker D., Abraham D., Tsui J. 2015. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. *Vascular Pharmacology*, 71: 31-36
- Reinherz E. L., Wang J. H. 2015. Codification of bidentate pMHC interaction with TCR and its co-receptor. *Trends Immunol*, 36: 300-306

- Roitt I., Jonathan Brostoff J., Male D., 1998. Immunology. 5th ed. London, Mosby Publishing: 423 str.
- Sellge G., Kufer T. A. 2015. PRR-signaling pathways: Learning from microbial tactics. *Seminars in Immunology* 27, 2: 75-84
- Shi Y., Liu C. H., Roberts A. I., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan Z. R., Tan H. S., Das G., Devadas S. 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, 16, 2: 126-133
- Si Y. Q., Bian X. K., Lu N., Jia Y. F., Hou Z. H., Zhang Y. 2012. Cyclosporine induces up-regulation of immunoglobulin-like transcripts 3 and 4 expression on and activity of NKL cells. *Transplantation Proceedings*, 44, 5: 1407-1411
- Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S. 2009. T cell activation. *Annual Review of Immunology*, 27: 591-619
- Swaika A., Hammond W. A., Joseph R. W. 2015. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Molecular Immunology*, 67, 2: 4-17
- Takeda K., Akira S. 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16, 1: 3-9
- Ten Brinke A., Karsten M. L., Dieker M. C., Zwaginga J. J., Van Ham S. M. 2007. The Clinical Grade Maturation Cocktail Monophosphoryl Lipid A plus IFN-gamma Generates Monocyte-Derived Dendritic Cells With The Capacity To Migrate And Induce Th1 Polarization. *Vaccine*, 25: 7145-7152
- Thaiss C. A., Semmling V., Franken L., Wagner H., Kurts C. 2011. Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in Immunology*, 1, 2: 1-9
- Vasaturo A., Di Blasio S., Peeters D. G., de Koning C. C., de Vries J. M., Figdor C. G., Hato S. V. 2013. Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Frontiers in Immunology*, 4: 1-14
- Vicente-Manzanares M., Sánchez-Madrid F. 2004. The lymphocyte cytoskeleton during T-cell-APC interactions and the formation of the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 4, 110-122
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1 izd. Ljubljana, DZS: 552 str.
- Zobywalski A., Javorovic M., Frankenberger B., Pohla H., Kremmer E., Bigalke I., Schendel J. D. 2007. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *Journal of Translational Medicine*, 5: 1-18

## ZAHVALA

Zahvaljujem se Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, da mi je omogočil pogoje za raziskovalno delo na področju izbrane tematike.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju za mentorstvo, pomoč, nasvete in predano znanje. Prof. dr. Roku Kostanjšku se zahvaljujem za hiter in natančen pregled naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Jasni Štrus za vedno zanimiva predavanja in slikovit uvod v čudoviti svet celične biologije.

Zahvaljujem se družini za vso pomoč in podporo. Posebna zahvala gre Kristini Rečnik, Leonidi Rečnik in Lauri Goršič. Hvala vam za razumevanje in spodbudo v trenutkih, ko ni bilo lahko.