

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Bojan Pavlović

**Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih
od monocita skraćanjem vremena diferencijacije**

doktorska disertacija

BEOGRAD, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Bojan Pavlović

**Maturation and function of the human Dendritic cells
obtained from monocytes, using short time differentiation
protocol**

doctoral dissertation

BELGRADE, 2018

MENTORI:

Dr sc. Zorica Stojić-Vukanić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Biol. Sergej Tomić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu
nuklearne energije, mentor

ČLAN KOMISIJE:

Dr sc. Nevena Arsenović Ranin, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

REZIME

Otkriće dendritskih ćelija (DC) predstavlja jedno od najznačajnijih dostignuća u imunologiji, s obzirom da su ove ćelije ključne za započinjanje i regulaciju imunskog odgovora protiv patogena i malignih ćelija, kao i protiv sopstvenih ćelija tokom autoimunskog odgovora. Ove ćelije predstavljaju heterogenu grupu čija je zajednička osobina sposobnost indukcije antigen-specifičnog adaptivnog imuniteta. Tokom recirkulacije između perifernih tkiva i limfnih organa, DC preuzimaju antigene iz mikrosredine i prezentuju ih naivnim T limfocitima. U uslovima homeostaze prezentacija antigena od strane nezrelih DC dovodi do uspostavljanja tolerancije na antigen, koja uključuje ispoljavanje koinhibitornih molekula (PD-L1, ILT3, ILT4, i dr.) na DC i indukciju regulatornih T ćelija (Treg). Sa druge strane, aktivacija DC, posredstvom receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca i proinflamacijskih citokina, dovodi do maturacije DC što se ogleda u ispoljavanju kostimulatornih molekula i prezentacije antigena u imunogenoj formi. Zrele DC aktiviraju i pomoćničke T (engl. T helper, Th) limfocite i citotoksične T limfocite i indukuju njihovu proliferaciju i diferencijaciju u efektorske i memorijske ćelije. Citokini koje proizvode DC imaju najznačajniju ulogu u regulaciji diferencijacije Th limfocita ka različitim subpopulacijama (Th1, Th17, Th2 ili Treg). Nastale efektorske T ćelije dalje regulišu ćelijski i humoralni imunski odgovor. Imajući u vidu sve navedeno, jasno je da bi imunogene DC, koje su sposobne da indukuju tumor-specifične Th1 ćelije i citotoksične CD8⁺ T limfocite, bile izuzetno atraktivne za primenu u imunoterapiji kancera. Predloženi su brojni protokoli za dobijanje imunogenih DC od monocita *in vitro*, uključujući i postupak ubrzane diferencijacije, koji je usled skraćivanja vremena diferencijacije znatno jeftiniji i fiziološki relevantniji u odnosu na konvencionalni postupak dobijanja DC. Međutim, za sada nema dovoljno podataka koji bi potvrdili prednost DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije (engl. fast DC, fDC) u odnosu na konvencionalne DC (engl. conventional, cDC), u pogledu njihove sposobnosti da indukuju efikasan anti-tumorski imunski odgovor. Takođe, nije poznato u kojoj meri razlike u fenotipu i funkciji monocita iz različitih donora utiču na njihov potencijal da se diferenciraju u DC. Pokazano je da je protokolom ubrzane diferencijacije u prisustvu proinflamacijskog koktela moguće dobiti imunogene DC, isto kao i konvencionalnim protokolom, u pogledu fenotipskog sazrevanja, produkcije IL-12 i indukcije Th1 ćelija, ali samo kod dela donora koji su označeni kao dobri responderi. Suprotno, fDC dobijene iz monocita loših respondera, stimulisanih na isti način, bile su fenotipski manje zrele (ispoljavale su niže nivoe CD1a, MHC II, CD83, CD86, CCR7),

produkovale su manje IL-12 i slabije su stimulisale proliferaciju aloreaktivnih T ćelija i usmeravale diferencijaciju ka Th1 ćelijama. Ovi rezultati su korelisali sa većom ekspresijom CD16 na površini monocita loših respondera, i većom produkcijom IL-6 i IL-1 β rano tokom kultivacije, u odnosu na monocite dobrih respondera. S obzirom da proinflamacijski koktel sadrži potencijalne inhibitore diferencijacije DC, dalje je ispitano da li primena Poly(I:C), za koji je pokazano da stimuliše nastanak DC koje usmeravaju diferencijaciju T limfocita ka Th1 ćelijama, dovodi do efikasnijeg dobijanja imunogenih DC u poredjenju sa proinflamacijskim koktelom. Pokazano je da Poly (I:C) u visokim dozama indukuje apoptozu i cDC i fDC. Proapoptotski efekat Poly (I:C) blokiran je prisustvom TNF- α tokom stimulacije sazrevanja monocita u DC, ali je prisustvo TNF- α inhibiralo sposobnost generisanih DC da usmere diferencijaciju T limfocita ka Th1 ćelijama, i potenciralo je njihov tolerogeni kapacitet. Sa druge strane, niske doze Poly (I:C) nisu indukovale apoptozu DC, a stimulisale su njihovo sazrevanje i produkciju IL-12. Međutim, u protokolu za ubrzanu diferencijaciju niske doze Poly (I:C) su potencirale dobijanje imunogenih DC samo kod 5 od 12 donora, dok je kod 7 donora uočen povećan tolerogeni potencijal dobijenih DC. Naime, fDC loših respondera su nakon stimulacije niskim dozama Poly (I:C) ispoljavale veći nivo CD14, manje nivoe CD1a, CD83, CCR7, CD86 i CD40, produkovale su manje IL-12 i IL-23, a više IL-10 i IL-1 β , što je u kokulturi sa aloreaktivnim T ćelijama dovelo do smanjene diferencijacije ka Th1 i Th17 ćelijama, a povećane ka Th2 ćelijama, u odnosu na cDC istih donora. Osim toga, fDC loših respondera su ispoljavale više ILT3 i IDO-1 molekula, i indukovale su nastanak više supresivnih TGF- β -produkujućih CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, u odnosu na cDC istih donora. S obzirom da monociti loših respondera produkuju veću količinu IL-6 u kulturi, ispitano je da li bi diferencijacija takvih ćelija u prisustvu antitela koje blokira receptor za IL-6 povećala efikasnost diferencijacije u imunogene fDC pomoću Poly (I:C). Na osnovu fenotipske i morfološke analize je pokazano da blokiranje receptora za IL-6 u postupku ubrzane diferencijacije monocita niskim dozama Poly (I:C) poboljšava efikasnost njihove diferencijacije i sazrevanja u fDC. Ovim protokol dobijene fDC su produkovale više IL-12, manje TGF- β , snažnije su indukovale proliferaciju aloreaktivnih T ćelija, i nisu indukovale nastanak CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, usled smanjene ekspresije ILT3 i PD-L1. Na osnovu dobijenih rezultata je zaključeno da protokol ubrzane diferencijacije omogućava dobijanje imunogenih DC pogodnih za primenu u imunoterapiji tumora, slično kao i konvencionalni protokol, ali samo kod jedne grupe donora. Međutim, činjenica da određen broj donora slabo odgovara na protokol ubrzane diferencijacije, bez obzira na primenjeni maturacioni stimulus, i da

ovakve DC poseduju izražene tolerogene osobine, čini da ovakva procedura predstavlja rizik za primenu u imunoterapiji tumora. Analizom markera monocita tokom rane kultivacije moguće je identifikovati monocite loših respondera, za koje je pokazano da je bolje primeniti konvencionalni protokol diferencijacije u DC, ili pak blokirati delovanje endogenog IL-6 tokom protokola ubrzane diferencijacije, čime je moguće dobiti imunogene DC pogodne za primenu u imunoterapiji tumora.

Ključne reči: dendritske ćelije, tumor, imunoterapija, T limfociti, citokini

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija-Imunofarmakologija

UDK broj: 615.37:[611.13:616.11(043.3)

SUMMARY

The discovery of dendritic cells (DC) is one of the most important findings in immunology, especially when the role of these cells in regulation of the immune response against pathogens, and cancer cells is considered. DC are heterogeneous cells, all of which are able to induce antigen-specific adaptive immunity. DC recirculate between peripheral and lymph organs during which they sample the microenvironment for antigens and present them to naïve T lymphocytes. Immature DC present antigen during homeostasis which leads to induction of antigen tolerance, and the response is triggered actively via expression of co-inhibitory molecules (PD-L1, ILT3, ILT4, etc.) and induction of regulatory T cells (Treg). In contrast, the activation of DC via pattern recognition receptors and proinflammatory cytokines induces up-regulation of co-stimulatory molecules and immunogenic antigen presentation. Thereby, DC activate the proliferation and differentiation of T lymphocytes towards effector and memory T helper (Th) cells and cytotoxic T cells. The cytokines produced by DC thereby, are critically involved in the regulation of T cell differentiation (Th polarization) and development of specific Th1, Th17, Th2 or Treg-mediated immune response. Subsequently, effector T cells regulate cellular and humoral immune response. These facts make DC extremely attractive for the application in immunotherapy, such as cancer immunotherapy which is focused on induction of immunogenic DC that are capable of inducing tumor-specific Th1 and cytotoxic CD8⁺ T cells. Various protocols for the induction of monocyte-derived DC *in vitro* have been proposed, including fast DC protocols which is claimed to be much cheaper and more relevant physiologically than the conventional protocol. However, a strong evidence which supports that fast DC (fDC) are better than conventional DC (cDC) in inducing an efficient anti-tumor response, is still missing. Moreover, it is still unknown how donor-related differences in the phenotypic and functional properties of precursor monocytes relate to the capacity of these cells to differentiate into DC. Here we showed that fast DC protocol which included proinflammatory cytokines cocktail is as good as the conventional DC protocol in inducing phenotypic maturation, IL-12 production and Th1 polarization by certain donors only (responders). fDC from non-responders expressed lower levels of CD1a, MHC class II, CD83, CD86, CCR7 and IL-12, displayed lower allostimulatory capacity and induction of Th1 cells. These properties correlated with a higher surface expression of CD16 by non-responder monocytes, and their higher capacity to produce IL-6 and IL-1 β early in culture, compared to responder monocytes. Since proinflammatory cocktail may exhibit inhibitory effect on DC differentiation,

we tested whether Poly (I:C), a strong Th1 polarizing agent, can improve the efficacy of obtaining immunogenic fDC. It was shown that high doses of Poly (I:C) induce apoptosis of cDC and fDC. TNF- α exhibited an inhibitory effect on Poly (I:C)-induced apoptosis, but it also inhibited Poly (I:C)-induced Th1 polarizing capacity of DC, and potentiated ILT3 expression, all of which can be considered as adverse effects in cancer immunotherapy. In contrast, low doses of Poly (I:C) showed stimulatory effects on DC maturation and IL-12 production, without inducing cytotoxicity. However, when used in fast DC protocol, low doses of Poly (I:C) improved fDC immunogenicity from 5 out of 12 donors, whereas from 7 donors it augmented the tolerogenic potential. Namely, compared to donor-matched cDC, non-responder fDC expressed higher levels of CD14, and lower levels of CD1a, CD83, CCR7, CD86 and CD40, produced lower amounts of IL-12 and IL-23, and higher amounts of IL-10 and IL-1 β , all of which related to their lower allostimulatory capacity in co-culture with T cells after the stimulation. In addition, non-responder fDC expressed more ILT3 and IDO-1, and induced a higher percentage of TGF- β -producing CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, compared to donor-matched cDC. The finding that non-responder monocytes produce higher levels of IL-6 early in culture, led to studying whether the differentiation of these cells can be improved in the presence of IL-6R blocking antibody (tocilizumab), thus leading to better differentiation and maturation of fDC upon treatment with low doses of Poly (I:C). Indeed, it was shown that tocilizumab increased significantly the maturation potential of non-responder fDC, their capacity to produce higher levels of IL-12 and lower levels of TGF- β , increased their capacity to induce proliferation of alloreactive T cells, and diminished their capacity to induce CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, since it also down-regulated ILT3 and PD-L1 expression. In conclusion, these results suggested that fast DC protocol enables the generation of immunogenic DC suitable for cancer immunotherapy as good as the conventional DC protocol, but only in certain donors. The fact that certain donors respond poorly to fast DC protocol, irrespective of the maturation stimuli applied, and that these cells display augmented tolerogenic properties, makes this protocol risky for cancer immunotherapy. The analysis of monocytes markers early in the culture, enables the identification of non-responder monocytes, in which cases it is better to apply the conventional DC protocol, or tocilizumab in fast DC protocol, to obtain the immunogenic fDC for cancer immunotherapy.

Key words: dendritic cells, tumor, immunotherapy, T lymphocyte, cytokines

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmacology-Immunopharmacology

UDC number: 615.37:[611.13:616.11(043.3)]

SADRŽAJ:

1	UVOD.....	1
1.1	Otkriće DC i njihovo poreklo	1
1.2	Prepoznavanje stranog materijala i aktivacija DC	4
1.3	Receptori koji prepoznaju opasne signale.....	5
1.4	Aktivacija antigen-specifičnog adaptivnog imunskog odgovora.....	9
1.5	Supresija imunskog odgovora u tumoru	17
1.6	Imunoterapija protiv tumora	21
1.7	Anti-tumorske vakcine bazirane na dendritskim ćelijama.....	23
2	HIPOTEZA.....	27
3	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	28
4	MATERIJAL I METODE	29
4.1	Medijumi i reagensi	29
4.1.1	Medijumi	29
4.1.2	Reagensi.....	29
4.2	Izolacija i kultivacija humanih ćelija	30
4.2.1	Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi	30
4.2.2	Izdvajanje ćelija korišćenjem magnetnog sortiranja	31
4.3	Brojanje ćelija	32
4.4	Diferencijacija DC iz monocita	32
4.4.1	Dobijanje DC konvencionalnim protokolom.....	32
4.4.2	Dobijanje DC protokolom ubrzane diferencijacije	33
4.4.3	Krioprezervacija u protokolima diferencijacije DC.....	33
4.5	Morfološka analiza DC	33
4.5.1	Priprema citospin preparata	33
4.5.2	May-Griinwald Giemsa bojenje preparata.....	34
4.5.3	Konfokalna mikroskopija.....	34
4.6	Procena funkcionalnih karakteristika MoDC.....	34
4.6.1	Alostimulatorna aktivnost	34
4.6.2	Sposobnost DC da indukuju diferencijaciju određenog Th odgovora	35
4.6.3	Test supresije	35

4.7	Protočna citometrija	36
4.7.1	Fenotipska analiza DC i T limfocita	36
4.8	Izolacija RNK iz ćelija i tkiva.....	37
4.9	Reverzna transkripcija	38
4.10	Kvantitativna PCR	39
4.11	ELISA	39
4.12	Statistička analiza podataka	40
5	Rezultati	41
5.1	Fenotipska svojstva DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije korišćenjem proinflamacijskog koktela	41
5.2	Povezanost ekspresije aktivacionih markera i produkcije proinflamacijskih citokina od strane monocita, sa potencijalom diferencijacije DC kod različitih donora	53
5.3	Funkcionalna svojstva DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije korišćenjem proinflamacijskog koktela	61
5.4	Vijabilnost i Th1 polarišuća svojstva DC dobijenih stimulacijom sa Poly (I:C) i TNF- α	65
5.5	Fenotipske i funkcionalne osobine DC dobijenih ubrzanim protokolom pomoću Poly (I:C)	73
5.6	Tolerogena svojstva DC loših respondera dobijenih ubrzanim protokolom pomoću Poly (I:C).....	82
5.7	Uloga IL-6 u diferencijaciji DC po ubrzanom protokolu	90
6	Diskusija.....	102
6.1	Fenotipska i funkcionalna svojstva DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije korišćenjem proinflamacijskog koktela	102
6.2	Vijabilnost i funkcionalne osobine DC nakon stimulacije sa Poly (I:C) i TNF- α	107
6.3	Fenotipske i funkcionalne osobine DC dobijenih ubrzanim protokolom pomoću Poly (I:C)	111
7	Zaključci	119
8	Literatura -	121
9	BIOGRAFIJA AUTORA	150

1 UVOD

Prva otkrića koja su vodila do definicije dendritskih ćelija kao posebnog tipa ćelija bila su uočavanje i opisivanje akcesornih adherentnih imunskih ćelija neophodnih za aktivaciju limfocita u *in vitro* “Mishell-Dutton-ovim kulturama” (Hartmann, 1970). Odmah zatim Cosenza i saradnici (Cosenza, Leserman, i Rowley, 1971) identifikovali su među splenocitima ćelije koje promoviraju razvoj adaptivnog imunskog odgovora *in vitro*. Gotovo u isto vreme je Ralph Steinman (R. M. Steinman i Cohn, 1973) opisao u slezini miša ćelije koje imaju karakterističnu stelatnu morfologiju sa izraženim produžecima zbog čega ih je nazvao dendritske ćelije (engl. Dendritic cells, DC) i najveći deo svoje karijere posvetio istraživanjima koja su doprinela da se DC ustanove kao poseban ćelijski tip i dovela do definisanja jedinstvene funkcije DC. Steinman je u svojim početnim istraživanjima pokazao da DC imaju sposobnost da preuzmu materijal, obrade ga i ispolje proteinske antigene u kompleksu sa molekulima MHC klase I i II na svojoj površini, i da na taj način pokreću antigen-specifični ćelijski imunski odgovor (R. Steinman, Kaplan, Witmer, i Cohn, 1979; R. M. Steinman i Nussenzweig, 1980; R. M. Steinman i Witmer, 1978). Za ova otkrića kao i ona koja su usledila, a koja su dovela do ideje o korišćenju DC za vakcinaciju, Ralph Steinman je 2011. godine dobio Nobelovu nagradu iz oblasti Fiziologije i Medicine.

1.1 Otkriće DC i njihovo poreklo

Iako su ove ćelije otkrivene kao zaseban tip ćelija sa jedinstvenom, veoma važnom ulogom još ranih 70-ih godina, njihova izrazito niska zastupljenost u perifernoj krvi i drugim tkivima usporila je opširnija istraživanja. To je podstaklo ispitivanja o prekursorima DC u organizmu i razvoj metoda za njihovu izolaciju i *in vivo* dobijanje DC. Iako se već znalo da DC vode poreklo iz kosne srži, u pionirskim istraživanjima Bowers i Berkowitz (Bowers i Berkowitz, 1986) nisu uspjeli da uoče ove ćelije u kulturi ćelija kosne srži pacova. Međutim, nakon frakcionisanja ćelija na gustinskom gradijentu, pokazali su da se ćelije nalik DC kao i akcesorna aktivnost razvijaju iz 5% ćelija kosne srži dobijenih kao frakcija niske gustine. Takođe, pokazano je da ove ćelije imaju sposobnost proliferacije i da ne ispoljavaju molekul Ia. Zračenjem ovih ćelija sprečava se proliferacija prekursora i inhibira njihova sposobnost diferencijacije u DC, a pomeranjem termina zračenja za po jedan dan pokazano je da je za potpunu diferencijaciju ovih ćelija u DC potrebno 5 dana. Takođe, u ovim eksperimentima je pokazano da se broj ćelija sa DC morfologijom i

akcesorna aktivnost ćelija ne povećava od 5. do 12. dana, kao i da, za razliku od prekursora, sve diferencirane ćelije ispoljavaju Ia molekul. Grupa istraživača okupljenih oko profesora Steinman je slične podatke dobila kultivacijom ćelija periferne krvi miša (Inaba i sar., 1992). U ovom radu oni su dokazali ulogu faktora stimulacije kolonija granulocita/makrofaga (engl. Granulocytes-Macrophages Colony Stimulating Factor, GM-CSF), ali ne i drugih CSF, u diferencijaciji DC iz prekursora krvi miša. Nakon nedelju dana kultivacije Ia⁻, neadherentne frakcije ćelija periferne krvi u prisustvu GM-CSF, počinju da se odlepljuju agregati ćelija koji u kulturi proliferišu i dobijaju nastavke nalik dendritima ali još uvek ne ispoljavaju antigene karakteristične za zrele DC. Nakon dve nedelje u medijum se otpuštaju ćelije koje gube sposobnost proliferacije, i počinju da ispoljavaju visok nivo MHC klase II i antigen u granulama citoplazme koji prepoznaje 2A1 antitelo. Ove ćelije imaju snažan potencijal za stimulaciju proliferacije limfocita u mešanoj leukocitnoj reakciji (MLR) i nakon injekcije u šapu imaju sposobnost migracije u T-ćelijske zone limfnih čvorova. U ovom periodu grupa naučnika predvođena profesorom Peters je dokazala da se ćelije sa fenotipom i funkcijom koja odgovara DC mogu dobiti iz populacije mononuklearnih ćelija periferne krvi (engl. Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) obogaćene monocitima (Kabel i sar., 1989; Najar, Bru-Capdeville, Gieseler, i Peters, 1990; J. Peters, Ruppert, Gieseler, Najar, i Xu, 1991; J. H. Peters, Ruhl, i Friedrichs, 1987; J. H. Peters i sar., 1993; Rossi, Heveker, Thiele, Gelderblom, i Steinbach, 1992) ili slabo adherentne frakcije PBMC i PBMC očišćene od limfocita (J. H. Peters, Gieseler, Thiele, i Steinbach, 1996; Romani i sar., 1994; Sallusto i Lanzavecchia, 1994). Pored uloge GM-CSF u diferencijaciji DC iz monocita, pokazano je da IL-4, ali ne i IL-1 i IL-6, povećavaju ekspresiju HLA-DR/DP i snažno utiču na redukciju CD14, markera monocita. Ovi rezultati ukazali su na to da bi upravo IL-4 mogao da bude glavni regulatorni faktor u diferencijaciji DC iz monocita tokom imunskog odgovora (Ruppert, Friedrichs, Xu, i Peters, 1991). Dalje su Sallusto i Lanzavecchia pokazali da dodatna stimulacija DC dobijenih iz monocita sa TNF- α dovodi do njihovog sazrevanja što se ogleda u snažnijoj sposobnosti ovih ćelija da aktiviraju antigen-specifične naivne T limfocite ali smanjenoj sposobnost za prezentaciju antigena (Sallusto i Lanzavecchia, 1994). Chapuis i sar. su 1997. objavili rezultate istraživanja koji su značajno doprineli razjašnjavanju procesa diferencijacije DC odnosno makrofaga iz monocita (Chapuis i sar., 1997). Kultivacija PBMC obogaćenih monocitima u prisustvu M-CSF ili GM-CSF dovodi do diferencijacije makrofaga sa različitom morfologijom i ekspresijom CD14/CD1a. Međutim ako se ove ćelije tretiraju sa GM-CSF i IL-4 one naglo deadheriraju i dobijaju

morfoloiju DC, počinju da ispoljavaju CD1a i većinu DC markera. Takođe, u ovim uslovima kultivacije ćelije gube CD14 i CD64 kao i kapacitet za fagocitozu i ispoljavaju niži nivo CD68 u poređenju sa makrofagima, ali još uvek zadržavaju aktivnost nespecifičnih esteraza. Ove DC se u prisustvu GM-CSF i IL-4 razvijaju direktno iz monocita bez proliferacije i već drugog dana, kada ukupan broj ćelija u kulturi opada, broj DC dostiže plato što je ukazalo na to da je do drugog dana većina DC već diferencirana. Ova usmerenost ka diferencijaciji monocita u DC u prisustvu GM-CSF i IL-4 je ireverzibilna do drugog dana i isprekidano dodavanje IL-4 u ovom periodu ne dovodi do konvertovanja ćelija u makrofage. Ako se kultivacija monocita započne samo u prisustvu GM-CSF a onda se nakon drugog dana započne sa tretmanom IL-4 ćelije se naglo konvertuju u DC. Ako se kultivacija započne u prisustvu M-CSF i nakon 2-5 dana tretman se promeni u GM-CSF/IL-4 oko polovine ćelija se još uvek konvertuje u DC. Ovo ukazuje na urođenu mogućnost monocita i čak makrofaga da se u periodu od dva do pet dana u zavisnosti od citokinskog miljea konvertuju u DC.

Randolph i kolege su dali značajan doprinos istraživanjima migratornih sposobnosti monocitnih prekursora DC. Ova grupa je 1998. objavila rezultate iz eksperimenata u kojima su kokultivisali mononuklearne ćelije krvi sa slojem humanih endotelnih ćelija gajenih na kolagenskom matriksu. Pokazali su da deo mononuklearnih ćelija koje imaju sposobnost migracije se diferencira u ćelije koje imaju fenotipske i funkcionalne osobine DC dok se oni monociti koji zaostaju u kolagenu diferenciraju u ćelije nalik makrofagima (Randolph, Beaulieu, Lebecque, Steinman, i Muller, 1998). Ova grupa je kasnije pokazala da nakon injekcije mikrosfera od lateksa konjugovanih sa FITC-om, većina ovih mikrosfera biva fagocitovana i najveća populacija FITC⁺ ćelija do 18h migrira u T ćelijske zone drenirajućih limfnih čvorova. Ove ćelije izgledaju kao DC i nema ih kod miševa deficijernih za monocite (op/op miševi) (Randolph, Inaba, Robbiani, Steinman, i Muller, 1999). Ovi rezultati ukazali su da DC koje vode poreklo od monocita imaju vodeću ulogu u prezentaciji partikularnih antigena. Geissmann i kolege su na osnovu nivoa ekspresije CX3CR1 kod miša i čoveka identifikovali dve grupe monocita (Geissmann, Jung, i Littman, 2003) - rezidentne monocite koji visoko ispoljavaju ovaj hemokinski receptor, nalaze se u perifernoj krvi i tkivima u stanju homeostaze i migriraju na CX3CR1 način. Nasuprot ovoj populaciji, monociti koji ispoljavaju nizak nivo ovog receptora žive kratko, brzo migriraju na mesto inflamacije i diferenciraju se u funkcionalne DC koje imaju sposobnost stimulacije naivnih T limfocita. Ovu populaciju nazvali su inflamacijski monociti, a u kasnijim radovima pokazano je da se većina ovih

monocita diferencira u CD11c⁺ DC koje su nazvane inflamacijske DC. U ovo vreme je pokazano da se CCR2⁺ monociti diferenciraju u inflamacijske DC koje produkuju TNF- α i NO (engl. TNF-iNOS producing, TIP-DC) u slučaju infekcije intracelularnim patogenom, *Listeria monocytogenes* (Serbina, Salazar-Mather, Biron, Kuziel, i Pamer, 2003). Dalje je pokazano da ove DC imaju važnu ulogu u odbrani od infekcije sa *Leishmania major* (De Trez i sar., 2009; Kurihara, Warr, Loy, i Bravo, 1997) i da je njihovo diferentovanje zavisno od prisustva CD4⁺ IFN- γ produkujućih T ćelija. Dalje je pokazano da je pri ovoj infekciji kod BALB/c miševa defektnih u IL-4/IL-13 produkciji povećan broj ovih ćelija što je bio dokaz da je diferentovanje ovih inflamacijskih DC negativno regulisano Th2 citokinima. U slučaju infekcije sa *Brucella melitensis* (Copin, De Baetselier, Carrier, Letesson, i Muraille, 2007), pokazana je značajna uloga TLR4 i TLR9 MyD88-zavisnih puteva za aktivaciju ovih inflamacijskih DC. Paralelno je pokazano da ovako nastale DC imaju najvažniju ulogu u indukciji Th1 odgovora *in vivo*.

1.2 Prepoznavanje stranog materijala i aktivacija DC

Danas se zna da DC predstavljaju heterogenu grupu ćelija koje su rasprostranjene u različitim tkivima organizma i poseduju određene tkivno-specifične osobine, ali su objedinjene zajedničkom funkcijom koja ih razlikuje od svih ostalih sličnih ćelija, a to je da imaju sposobnost da indukuju antigen-specifičan adaptivni imunski odgovor. Nakon što napusti kostnu srž, progenitor DC se diferencira u rezidentne DC i migratorne DC. Rezidentne DC su lokalizovane u limfoidnim tkivima gde preuzimaju antigene iz limfe i krvi i prezentuju ih lokalnim T limfocitima. Ne-limfoidne DC konstitutivno migriraju iz tkiva u limfne čvorove gde prezentuju T limfocitima antigene koje su preuzele u tkivu. U perifernoj krvi je identifikovano tri populacije DC koje se mogu identifikovati na osnovu površinskih markera i to su plazmocitoidne DC i dva tipa konvencionalnih DC, CD1c/BDCA-1c cDC i CD141/BDCA-3c cDC (Dzionek i sar., 2000; Ziegler-Heitbrock i sar., 2010). Ove ne-limfoidne DC u tkivima dolaze u direktan kontakt sa okolinom što im omogućava da uzorkuju delove najbližeg okruženja i na ovaj način omogućavaju dobijanje pravovremene informacije o prisustvu stranog, potencijalno opasnog signala u okolini. Razlikovanje stranih od domaćih molekula ključan je događaj u složenom procesu zaštite organizma pre svega od patogena ali i od umnožavanja izmenjenih ćelija domaćina i razvoja tumora. U ovom procesu učestvuju sve ćelije koje ispoljavaju receptore (engl. Pathogen Recognition Receptors, PRR) za molekulske obrasce karakteristične za različite grupe

mikroorganizama/patogena (engl. Microorganisms/Pathogen Associated Molecular Patterns, MAMP/PAMP) i molekulske obrasce karakteristične za oštećenja (engl. Damage Associated Molecular Patterns, DAMP). Ovi molekulske obrasci predstavljaju delove ili komplekse molekula koji su karakteristika različitih grupa mikroorganizama ili oštećenja ćelija domaćina i koji ne postoje kod normalnih/intaktnih ćelija domaćina, te omogućavaju detekciju opasnog signala. Nakon uzorkovanja opasnog signala iz okoline karakteristični MAMP-ovi aktiviraju DC preko određenih PRR i sadržaj koji je izazvao stimulaciju biva obrađen u endozomu. Peptidi poreklom iz ovog sadržaja se u DC obrađuju i delovi peptida (antigeni) grade kompleks sa molekulima MHC iz klase I i/ili II i zatim ga ove ćelije ispoljavaju na svojoj površini. Sposobnost prezentacije antigena pored DC imaju i druge ćelije, makrofage, granulociti, B limfociti, zbog čega se sve ove ćelije nazivaju antigen prezentujuće ćelije (engl. Antigen Presenting Cells, APC). Međutim, samo DC nakon stimulacije na periferiji migriraju do T ćelijske zone lokalnih limfnih čvorova gde imaju sposobnost da indukuju diferencijaciju antigen-specifičnih naivnih T limfocita u efektorske T limfocite, nosioce adaptivnog imunskog odgovora na opasni stimulus kojim su DC aktivirane na periferiji. Zbog ove jedinstvene funkcije DC se nazivaju profesionalne APC. Pored karakteristične morfologije, DC se u odnosu na ostale APC izdvajaju po svojim fenotipskim karakteristikama. Fenotipski DC se karakterišu snažnom ekspresijom molekula glavnog histo-kompatibilnog kompleksa (MHC molekuli I i II klase), kao i konstitutivnom ekspresijom kostimulatornih liganada B7 familije. Takođe, DC ispoljavaju široki opseg adhezivnih molekula (CD11a (LFA-1), CD11b, CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-3) CD58 (LFA-3)) koji su bitni u ostvarivanju intimnog kontakta sa T ćelijama. Pored toga, fenotipsku karakteristiku DC predstavlja i odsustvo linijski specifičnih markera karakterističnih za druge ćelijske tipove, poput: CD14, CD3, CD19, CD20, CD24, CD56 i CD66b molekula. Međutim, uprkos brojnim naporima u iznalaženju specifičnih markera DC, do danas je pronađeno svega nekoliko molekula koji su prevashodno ispoljeni na DC. Kod humanih DC ulogu njihovih markera imaju CD83 i CMRF44 molekuli, kao i antigeni BDCA serije (BDCA 2,3,4).

1.3 Receptori koji prepoznaju opasne signale

Postoji nekoliko grupa PRR, a najviše članova ima grupa receptora koja sadrži motive slične Toll proteinu (engl. Toll Like Receptors, TLR) i prepoznaju različite MAMP-ove koji dolaze u kontakt sa membranom na površini ćelije domaćina ili unutar endozoma (Mogensen, 2009). Način

životnog ciklusa patogena u telu domaćina u skladu je sa lokacijom na kojoj su ispoljeni PRR, te su tako receptori koji pre svega prepoznaju virusne MAMP-ove (dsRNA, ssRNA, CpG DNA) ispoljeni u endozomu (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), dok su TLR koji prepoznaju MAMP-ove karakteristične za bakterije, gljive i protozoe ispoljeni dominantno na površini ćelija (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 i TLR11) (**Tabela 1.2.1.1**).

Tabela 1.3.1. Receptori koji prepoznaju opasne signale (preuzeto iz Mogensen i sar. (29), prerađeno)

Receptor	Lokalizacija	MAMP	Poreklo MAMP		
TLR	TLR1/TLR2	Površina ćelije	Triacil lipopeptidi	bakterije	
	TLR2/TLR6	Površina ćelije	diacil lipopeptidi lipoteihoična kiselina	Mikoplazma Gram+ bakterije	
	TLR2	Površina ćelije	Lipoproteini Peptidoglikani Lipoarabinomanan Porini Envelop glikoproteini GPI-mucin Fosfolipomanan Zimozan B-glikan	Različiti patogeni Gram + i – bakterije Mikobakterija Neisseria Virusi (npr. malih boginja, HSV, CMV) Protozoa Candida Gljive	
	TLR3	Površina ćelije/endozom	Dvolančana RNA	Virusi	
	TLR4	Površina ćelije	LPS Envelop glikoproteini Glikoinozitolfosfolipidi Manan HSP70	Gram – bakterije Virusi (npr. RSV) Protozoa Candida Domaćin	
	TLR5	Površina ćelije	Flagelin	Flagelarne bakterije	
	TLR7/8	Endozom	Jednolančana RNK	RNK virusi	
	TLR9	Endozom	CpG DNK	Virusi, bakterije, protozoa	
	RLR	RIG-I	Citoplazma	Dvolančana (kratki segmenti), RNK, 5'-trifosfat RNK	Virusi (npr. virus influenza A, HCV, RSV)
		MDA5	Citoplazma	Dvolančana RNK (dugački segmenti)	Virusi (pikornavirusi i norovirusi)
NLR	NOD1	Citoplazma	Diaminopimeična kisleina	Gram - bakterije	
	NOD2	Citoplazma	MDP	Gram – i + bakterije	
	NALP1	Citoplazma	MDP	Gram – i + bakterije	
	NALP2	Citoplazma	ATP, kristali ureične kiseline, RNK, DNK, MDP	Virusi, bakterije i domaćin	
ostali	DAI	Citoplazma	DNK	DNK virusi, intracelularne bakterije	
	AIM2	Citoplazma	DNK	DNK virusi	
	PKR	Citoplazma	Dvolančana RNK, 5'-trifosfat RNK	Virusi	

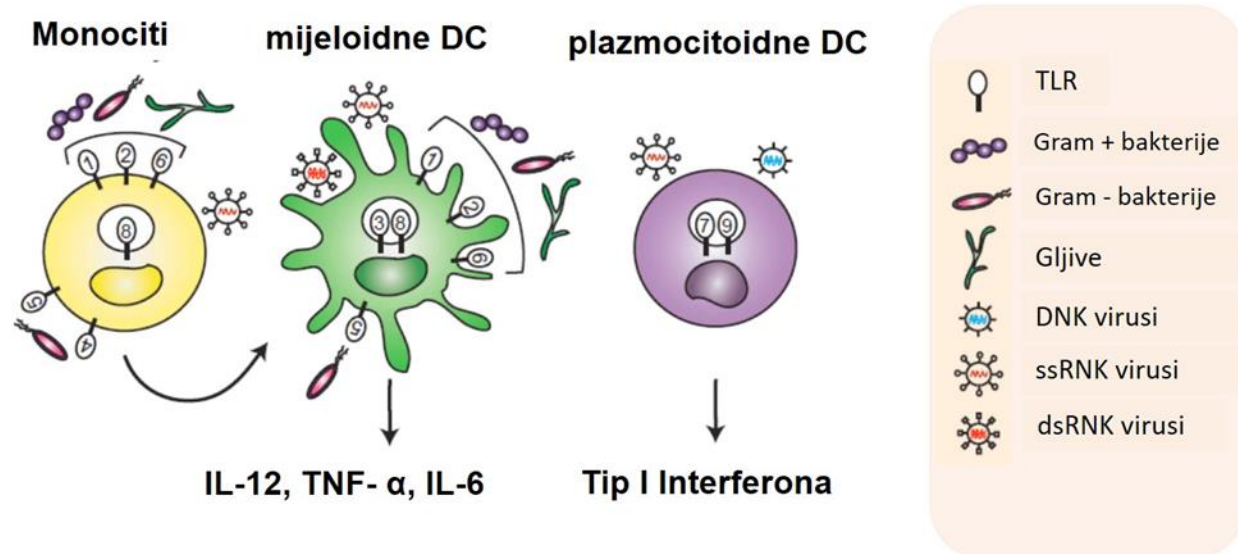
Način odgovora ćelija domaćina na različite MAMP-ove proširen je sposobnošću pojedinačnih TLR-ova da homodimerizuju i heterodimerizuju kao i da ligand prepoznaju direktno ili preko akcesornih proteina ili sa više domena, što za rezultat ima ili prepoznavanje sasvim novih MAMP-ova ili izmenjen signal sa aktiviranih receptora.

Tako se pokazalo da TLR1 i TLR6 često kao heterodimeri sa TLR2 direktno prepoznaju bakterijske triacilovane lipopeptide i deluju sinergistički, TLR10 inhibira efekat TLR2 kada kao heterodimeri direktno prepoznaju sintetski ligand Pam3Cys (Oosting i sar., 2014). Sa druge strane, TLR4 različitim domenima i u saradnji sa akcesornim proteino MD2 može da prepozna strukturno veoma različite molekule kao što su lipopolisaharid (LPS), MAMP karakterističan za gram-negativne bakterije, envelop protein respiratornog sincicijskog virusa (RSV) i HSP70. Pored ove velike grupe PRR, dobro je izučena i grupa intracelularnih receptora koju aktiviraju nukleinske kiseline mikroorganizama koji dospevaju u citoplazmu ćelija domaćina i posledica aktivacije je produkcija tip I interferona (IFN). Receptori povezani sa genom I indukovanim retinoičnom kiselinom (engl. Retinoid acid-Inducible Gene I (RIG-I)-Like Receptors, RLR) uključuju RIG-1 i gen 5 povezan sa diferencijacijom melanoma (engl. Melanoma Differentiation-Associated gene 5, MDA5) receptor koji prepoznaju virusnu dsRNA različite dužine i 5'-trifosfat RNK (Yoneyama i sar., 2004). Takođe, dsRNA kao i sintetski analog poliinozinska-policistidinska kiselina (engl. polyinosinic-polycytidylic acid, poly I:C) i 5'-trifosfat RNK takođe aktiviraju receptore sa protein kinaznom aktivnošću koji indukuju IFN (engl. IFN-inducible dsRNA-activated protein kinase, PKR) i pokazano je da signal sa ovih receptora dovodi do amplifikacije signala sa RLR (McAllister i Samuel, 2009; Spann, Tran, i Collins, 2005). Pored citoplazmatskih receptora za RNK opisana je i grupa citoplazmatskih senzora za virusnu i bakterijsku DNA među kojima su receptori koji takođe indukuje produkciju IFN (engl. DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors, DAI) (Charrel-Dennis i sar., 2008; Leber i sar., 2008; Nociari, Ocheretina, Schoggins, i Falck-Pedersen, 2007; Rasmussen i sar., 2007; Stetson i Medzhitov, 2006) ali i receptori koji dovode do sazrevanja pro-IL-1 β i inflamacije (engl. Absent In Melanoma 2, AIM2) (Hornung i sar., 2009). Druga grupa citoplazmatskih receptora povezanih sa oligomerizovanim domenom koji se vezuje za nukleotid (engl. Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors, NLR) aktivira se bakterijskim produktima peptidoglikana (Kanneganti i sar., 2006) i to produkt gram-negativnih

bakterija diaminopimeička kiselina aktivira NOD1 (Chamaillard i sar., 2003; Girardin i sar., 2003), a NOD-2 aktivira se muramil-dipeptidom (MDP) koji produkuju i gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Girardin i sar., 2003). Posledica aktivacije NOD1 i NOD2 je indukcija ekspresije pro-inflamacijskih gena među kojima i pre interleukin (IL)-1 β , neaktivne forme jednog od najvažnijih proinflamacijskih citokina. Sa druge strane, drugi članovi NLR, NALP3 i NALP1 nakon aktivacije sa MDP grade kompleks, nazvan inflamazom, sa adaptorskim proteinom (engl. Apoptosis-associated Speck-like protein containing a N-terminal caspase recruitment domain (CARD), ASC) i pro-kaspazama čija kaspazna aktivnost dovodi do post-transkripcione obrade pre IL-1 β i sekrecije biološki aktivnog IL-1 β (Kanneganti, Lamkanfi, i Núñez, 2007; Mariathasan i sar., 2006; Martinon, Burns, i Tschopp, 2002). Pored NALP3 i NALP1, pokazano je da AIM2 aktiviran sa citoplazmatskom DNK može da izgradi inflamazom (Hornung i sar., 2009).

1.4 Aktivacija antigen-specifičnog adaptivnog imunskog odgovora

Migracija DC do lokalnih limfnih čvorova inicirana je stimulacijom sa TLR pri čemu dolazi do snižavanja ekspresije receptora za inflamacijske hemokine i do povećanja receptora za hemokine limfoidnog tkiva. Tako stimulacija nezrelih DC TLR ligandima dovodi do snižavanja ekspresije CCR6 i povećanja ekspresije CCR7 (Dieu i sar., 1998; Sallusto i sar., 1998) što omogućava da aktivirane DC migriraju iz perifernog tkiva do drenirajućih limfnih čvorova (Förster i sar., 1999; Gunn i sar., 1999). Dakle, samo DC koje su na periferiji prepoznale opasan stimulus započinju proces maturacije koji pored smene u ekspresiji hemokinskih receptora uključuje i ispoljavanje molekula koji će naivnim antigen-specifičnim limfocitima pružiti signale potrebne za njihovu diferencijaciju u efektorske T limfocite.



Slika 1.4.1. *Različite populacije DC ispoljavaju različite setove TLR kod ljudi.* Humane mijeloidne DC iz periferne krvi i monociti ispoljavaju različit set TLR na svojoj površini i u endozomu. Mijeloidne DC ispoljavaju različite TLR i mogu da prepoznaju bakterije, gljive i virusne patogene i na njih najčešće odgovaraju produkcijom IL-12, TNF- α i IL-6. Sa druge strane, monociti ne ispoljavaju TLR3 ali tokom diferencijacije u DC počinju da ispoljavaju ovaj receptor. Plazmocitoidne DC ispoljavaju TLR7 i TLR9, i u odgovoru na virusne patogene produkuju tip I interferona. Slika je preuzeta iz Iwasaki i saradnici, (Iwasaki i Medzhitov, 2004) i prerađena.

Antigen u kompleksu sa MHC I/II molekula prepoznaju antigen-specifični naivni T limfociti preko svog receptora (engl. T Cell Receptor, TCR) što predstavlja prvi signal koji omogućava aktivaciju isključivo onih naivnih T limfocita koji prepoznaju ispoljeni antigen, dok drugi signal pružaju kostimulatorni molekuli, B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) koji se vezuju za molekul CD28 ispoljen na T limfocitima. Pošto T limfociti mogu da prime signal sa koreceptora samo ukoliko su dobili prvi signal to omogućava prevođenje informacije o sredini dobijene preko TLR do antigen-specifične aktivacije imunskog odgovora. Antigen koji se na DC ispolji u kompleksu sa MHC I vezaće se za receptor na antigen specifičnim T limfocitima (engl. T cell receptor, TCR) koji ispoljavaju CD8 ko-receptor (CD8 limfociti) dok će se kompleks MHC II/antigen vezati za TCR na T limfocitima koji ispoljavaju CD4 ko-receptor (CD4 limfociti). Nakon aktivacije TCR, T limfociti ispoljavaju CD40L (CD154) koji se vezuje za CD40 da DC što pruža dodatan signal za aktivaciju DC (Iwasaki i Medzhitov, 2004). Pored ovih molekula koji se kao posledica aktivacije ispoljavaju na površini svih populacija DC, u zavisnosti od vrste stimulusa kom su izložene i u zavisnosti od populacije

DC one proizvode različite topljive molekule među kojima su najvažniji citokini. Pored postojanja velikog broja različitih PRR, različite populacije DC ispoljavaju različite setove ovih receptora (**Tabela 1.3.1**) pa u zavisnosti od toga koji je receptor stimulisan na DC one će ispoljiti određeni odgovor. Takođe i stimulacija istog receptora na različitim populacijama DC može dovesti do različitog odgovora (**Slika 1.3.1**). Tako stimulacija sa sintetskim TLR7 agonistima indukuje produkciju IFN- α kod pDC dok ovako stimulisane mDC proizvode IL-12 (Ito i sar., 2002). Citokini iz mikrosredine pružaju treći signal za aktivaciju antigen specifičnih CD8⁺ i CD4⁺ T limfocita. Ovi molekuli predstavljaju ključni signal koji preko aktivacije određenih transkripcionih faktora u naivnim antigen specifičnim T limfocitima dovodi do usmeravanja njihove diferencijacije u CTL odnosno različite tipove Th ćelija (Zhou, Chong, i Littman, 2009). Danas je opisano više različitih tipova Th ćelija čiji su produkti usmereni na borbu protiv različitih grupa patogena (Slika 1.3.2.). IL-12p70 proizveden od strane DC i makrofaga (Hsieh i sar., 1993) i IFN- γ proizveden od strane regrutovanih NK (Martín-Fontecha i sar., 2004) i već diferenciranih Th1 ćelija (Lighvani i sar., 2001) u limfnim čvorovima indukuju diferencijaciju Th1 ćelija čiji je glavni produkt IFN- γ . Takođe, skoro jedino ove ćelije proizvode limfotoksin, dobri su proizvođači IL-2 i većina proizvode i TNF- α (Zhu, Yamane, i Paul, 2009). Th1 odgovor usmeren je na borbu protiv intracelularnih patogena. Transkripcioni faktor T-bet (engl. T Box Expressed in T cells) je glavni transkripcioni faktor diferencijacije Th1 ćelija (Szabo i sar., 2000; Szabo i sar., 2002). Ovaj faktor dovodi do remodeliranja hromatina oko IFN- γ alela i do ekspresije receptora za IL-12 β 2 što dovodi do produkcije IFN- γ i ekspanzije tek diferenciranih Th1 ćelija u odgovoru na IL-12 koga proizvode stimulisane DC (Y. Yang, Ochando, Bromberg, i Ding, 2007; Zhu i sar., 2012). Kasnije, kada se već razvije Th1 odgovor, promene indukovane na početku oko gena koji kodira produkciju IFN- γ su stabilne i više ne zavise od T-bet faktora. IFN- γ takođe indukuje ekspresiju T-bet, što objašnjava pozitivnu povratnu spregu uočenu tokom diferencijacije Th1 odgovora (Afkarian i sar., 2002; Lighvani i sar., 2001).

Tabela 1.4.1. Ekspresija TLR na monocitima i različitim tipovima DC kod ljudi (preuzeta iz Iwasaki et al, (Iwasaki i Medzhitov, 2004), prerađena)

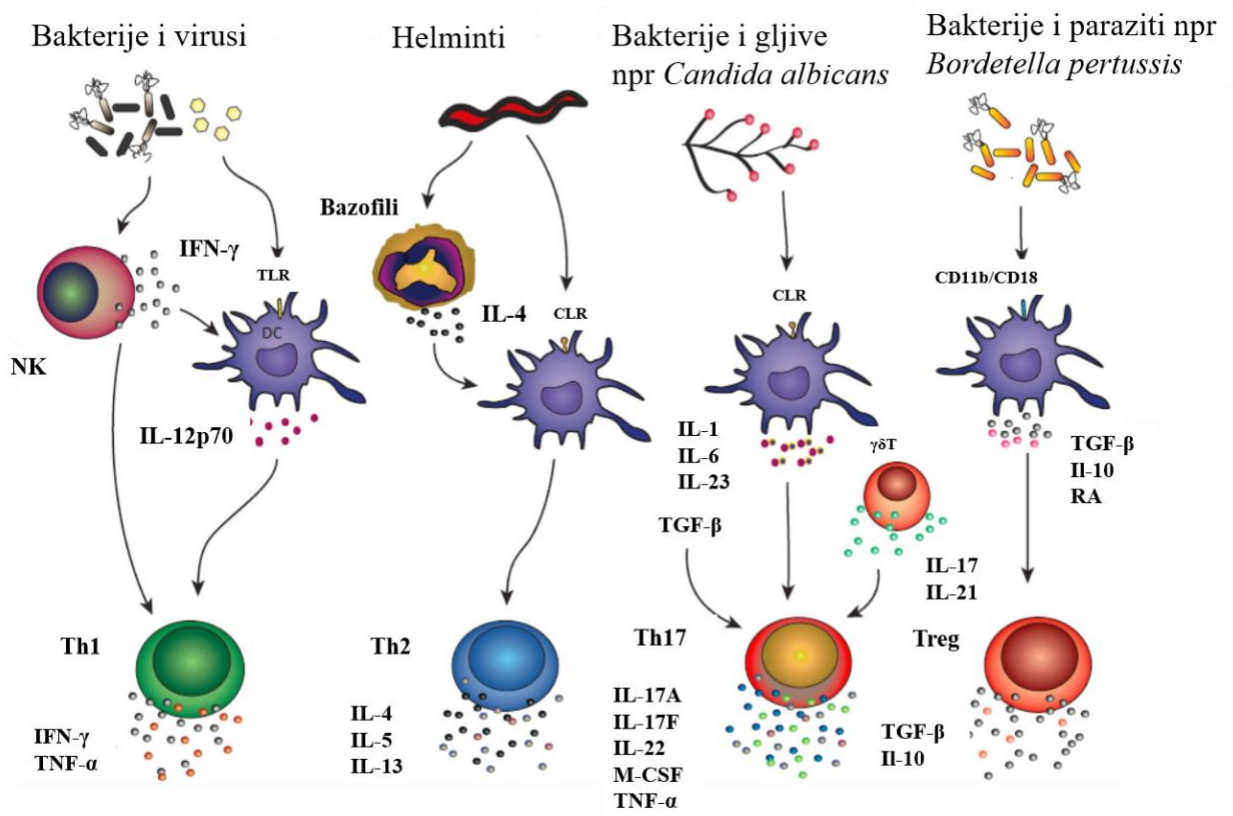
	Sveže izolovane ćelije			In vitro DC
	Monociti	mDC	pDC	GM-CSF + IL-4
TLR1	++	++	+	++
TLR2	++	++	-	++
TLR3	-	++	-	++
TLR4	++	-	-	++
TLR5	++	+	-	+/-
TLR6	++	++	++	++
TLR7	+/-	+/-	++	-
TLR8	++	++	-	++
TLR9	-	-	++	-
TLR10	-	+	+	

+, ++ i – predstavljaju relativan nivo mRNA ispoljen za svaki TLR u konkretnom tipu ćelija

Transduktor signala i aktivator transkripcije (STAT) 4 i STAT1 su takođe ključni transkripcioni faktori uključeni u diferencijaciju Th1 ćelija. IL-12 aktivira STAT4 (Hsieh i sar., 1993; Kaplan, Sun, Hoey, i Grusby, 1996; Thierfelder i sar., 1996) koji u saradnji sa T-bet indukuje optimalnu produkciju IFN- γ . STAT1 se aktivira autokrinno sa IFN- γ (Afkarian i sar., 2002; Lighvani i sar., 2001; Martín-Fontecha i sar., 2004) i reguliše dalju aktivaciju T-bet i ekspresiju receptora za IL-12, a takođe stimuliše nuklearni faktor (NF) κ B. Osim IL-12 i IFN- γ i drugi citokini poput IL-27 i interferona tipa I su takođe sposobni da indukuju ekspresiju T-bet (Zhu i sar., 2012). Pokazano je da IL-27, nezavisno od IFN- γ , može direktno da indukuje ekspresiju T-bet i njegove nizvodne mete IL-12R β 2 (Lucas, Ghilardi, Li, i de Sauvage, 2003). Osim toga ovaj citokin indukuje fosforilaciju STAT4, STAT1, STAT3 i STAT5. Aktivacija STAT1 je neophodna da bi došlo do supresije GATA3, ključnog transkripcionog faktora za diferencijaciju Th2 ćelija. Uprkos ovim funkcijama, IL-27 ne može samostalno da indukuje diferencijaciju Th1 ćelija, ali ovakvim uticajem na naivne T ćelije u ranoj fazi diferencijacije može snažno da stimuliše Th1 odgovor.

Dok je već dugo sasvim jasno koji su neophodni uslovi za in vitro diferencijaciju Th1 ćelija iz naivnih CD4⁺ T limfocita, tek je u skorije vreme pokazano da je za diferencijaciju u Th2 ćelije in vitro potrebno da naivni CD4⁺ T limfociti budu najpre poliklonski stimulisani (anti-CD3/anti-

CD28 stimulacija), zatim da budu stimulisani specifičnim antigenom i da budu pod uticajem IL-2 i IL-4 (Hsieh, Heimberger, Gold, O'Garra, i Murphy, 1992; Le Gros, Ben-Sasson, Seder, Finkelman, i Paul, 1990; Seder, Paul, Davis, i de St Groth, 1992; Swain, Weinberg, English, i Huston, 1990). Tako su Cook i kolege pokazali da alternativno aktivirane DC koje proizvode IL-4 imaju sposobnost indukcije diferencijacije Th2 (Cook i sar., 2012). Th2 odgovor aktivira se u slučajevima infekcije helmintima i drugim ekstracelularnim patogenima. Glavni citokini Th2 ćelija su IL-4, IL-5 i IL-13. Ove ćelije takođe proizvode TNF- α , neke od njih proizvode IL-9 i proizvode skromne količine IL-2. GATA3 je transkripcioni faktor koji ima ključnu ulogu u regulaciji Th2 odgovora i bez ovog transkripcionog faktora diferencijacija Th2 ćelija nije moguća niti *in vivo* ni *in vitro* (Pai, Truitt, i Ho, 2004; D.-H. Zhang i sar., 1999; Zhu i sar., 2004). Transkripcioni faktor GATA3 usmerava Th2 diferencijaciju, stimuliše proliferaciju Th2 ćelija i produkciju Th2 citokina, vezujući se za promotore gena za IL-5 (Siegel, Zhang, Ray, i Ray, 1995), IL-13 (Kishikawa, Sun, Choi, Miaw, i Ho, 2001; Yamashita i sar., 2002) i pojačivače gena za IL-4 (Agarwal, Avni, i Rao, 2000), i istovremeno inhibira diferencijaciju u Th1 smeru i tako osigurava Th2 diferencijaciju (D.-H. Zhang, Cohn, Ray, Bottomly, i Ray, 1997). Takođe, STAT6 (Kaplan, Schindler, Smiley, i Grusby, 1996; Shimoda i sar., 1996; Takeda i sar., 1996) i STAT5 (Cote-Sierra i sar., 2004; Kagami i sar., 2001; Zhu, Cote-Sierra, Guo, i Paul, 2003) su veoma važni Th2 transkripcioni faktori. Veliki broj gena koje reguliše GATA3 su geni koji su takođe pod regulacijom STAT6 još jednog važnog transkripcionog faktora za Th2 odgovor (Kurata, Lee, O'Garra, i Arai, 1999; Zhu, Guo, Watson, Hu-Li, i Paul, 2001). Pokazano je *in vitro* i *in vivo* da je aktivacija STAT6 neophodan i dovoljan događaj za diferencijaciju Th2 ćelija kada je ekspanzija pokrenuta sa IL-4 (Else, Finkelman, Maliszewski, i Grencis, 1994; D. U. Lee i Rao, 2004; Voehringer, Shinkai, i Locksley, 2004). STAT3 u kooperaciji sa STAT6 podstiče Th2 diferencijaciju. Zanimljivu ulogu u regulaciji diferencijacije Th ćelija ima STAT5, pri čemu jaka ekspresija ovog transkripcionog faktora dovodi do ekspresije CD25 i do promocije Th2 i iTreg ćelija (Burchill, Yang, Vogtenhuber, Blazar, i Farrar, 2007), dok slaba STAT5 ekspresija dovodi do proliferacije i preživljavanja Th1 i Th17 (Amadi-Obi i sar., 2007; Shi, Lin, Appell, i Berg, 2008). IL-22 i imaju ulogu u borbi protiv ekstracelularnih bakterija i gljiva, ali i u patogenezi autoimunskih bolesti (Aggarwal, Ghilardi, Xie, de Sauvage, i Gurney, 2003; Cua i sar., 2003; Harrington i sar., 2005; Park i sar., 2005).



Slika 1.4.2. Potogeni usmeravaju indukciju određenog Th tipa ćelija preko različitih efekata na ćelijama urođene imunosti. (A) TLR prepoznaju PAMP-ove bakterija i virusa i pokreću produkciju IL-12p70 od strane DC. IFN- γ koji proizvode ćelije urođene imunosti kao što su NK ćelije podstiču dalju produkciju IL-12p70. (B) CLR kao što je manozni receptor prepoznaju PAMP-ove helminta kao što je SEA Omega-1 glikoprotein koji aktivira DC da pokrenu Th2 odgovor. U nekim sistemima indukcija Th2 odgovora je nezavisna od IL-4, dok su u drugim sistemima TSLP-zavisni bazofili neophodni za indukciju ovog odgovora. (C) CLR Dektin-1 prepoznaje β -glukane poreklom od nekoliko vrsta gljiva i inicira produkciju citokina od strane DC koji pokreću diferencijaciju Th17 ćelija. Ključni faktori za diferencijaciju Th17 su IL-6, TGF- β i IL-21, dok su IL-1 i IL-23 važni za aktivaciju i ekspanziju Th17 ćelija. (D) PAMP-ovi poreklom od bakterija kao što je *Bordetella pertussis* se vezuju za CD11b/CD18 na DC i stimulišu produkciju IL-10 što indukuje diferencijaciju Treg koje proizvode IL-10. Slika je preuzeta iz Walsh i sar. (Walsh i Mills, 2013) i obrađena.

Ove ćelije takođe produkuju IL-21 ali njega produkuju u nekim količinama i drugi Th tipovi. DC koje dominantno produkuju IL-23 indukuju diferencijaciju Th17 ćelija. Glavni regulator Th17 odgovora je receptor- γ t povezan sa retinoičnom kiselinom (engl. retinoic acid receptor related orphan receptor- γ t, ROR- γ t) (Ivanov i sar., 2006).

Već je dugo postojala paradigma o dihotomiji diferencijacije naivnih CD4⁺ T limfocita u Th1/Th2 efektorske ćelije kada je 2003. pokazano postojanje Th17 ćelija koje produkuju IL-17A, IL-17F i nakon 8h TCR stimulacije naivnih T limfocita u prisustvu TGF- β i IL-6 u ovim ćelijama se ispoljava ROR- γ t. Na važnost ovog transkripcionog faktora ukazala je deficiencija u ROR- γ t koja dovodi do značajnog smanjenja produkcije IL-17, pri čemu je pokazano da je preostala produkcija IL-17 posledica aktivnosti ROR- α . Odsustvo oba transkripciona faktora u ćelijama dovodi do potpune redukcije u produkciji IL-17 (X. O. Yang, Pappu, i sar., 2008). Pored ovog transkripcionog faktora, STAT3 je uključen u diferencijaciju, ekspanziju i održavanje Th17 ćelija (Bettelli i sar., 2006; Korn i sar., 2007; Mangan i sar., 2006; Nurieva i sar., 2007; Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, i Stockinger, 2006; Zhou i sar., 2007). STAT3 se vezuje za *Il17* (Zhi Chen i sar., 2006) i *Il21* (Wei, Laurence, Elias, i O'Shea, 2007) i odgovoran je za indukciju GATA3 i ekspresiju IL-23R (Nurieva i sar., 2007; X. O. Yang i sar., 2007; Zhou i sar., 2007). Ako se ćelije koje imaju potencijal za diferencijaciju u Treg i Th17 stimulišu sa IL-6 to dovodi do aktivacije STAT3 što indukuje produkciju IL-21 od strane ovih ćelija. IL-21 dovodi do supresije ekspresije Foxp3 (transkripcionog faktora Treg) i do održavanja aktivacije STAT3 i diferencijacije ovih ćelija u Th17 smeru (Korn i sar., 2007; Xu, Kitani, Fuss, i Strober, 2007; X. O. Yang, Nurieva, i sar., 2008; X. O. Yang i sar., 2007). Zanimljivo je da IL-10 i IL-27, koji negativno regulišu Th17 diferencijaciju, takođe indukuju ekspresiju STAT3. IL-6, IL-21 i IL-23 aktivacijom STAT3, zajedno sa IL-1 koji aktivira NF- κ B, indukuju TCR-nezavisnu, ciklosporin A-nezavisnu IL-17A produkciju (Guo i sar., 2009).

U isto vreme sa otkrićem Th17 po prvi put je indukovana diferencijacija regulatornih T limfocita (Treg) *in vitro* (WanJun Chen i sar., 2003; Fantini i sar., 2004; Fu i sar., 2004; S. G. Zheng, Wang, Gray, Soucier, i Horwitz, 2004) što je ukazalo na to da ova populacija može biti i indukovana (iTreg) na periferiji, nasuprot prirodnim regulatornim T limfocitima (engl. natural, nTreg) koji postoje u stanju homeostaze i učestvuju u negativnoj selekciji naivnih T limfocita na sopstvene antigene u timusu. Ubrzo je pokazano da naivni CD4⁺ T limfociti u prisustvu faktora rasta i

transformacije (engl. Transforming Growth Factor, TGF- β) *in vitro* mogu biti diferencijirani ili u Th17 u prisustvu pro-inflamacijskih citokina, IL-6, IL-21 ili IL-23, odnosno u iTreg u prisustvu IL-2 ili retinoične kiseline. U odsustvu proinflamacijskih citokina visoka koncentracija TGF- β dovoljna je za indukciju diferencijaciju iTreg (Zhou i sar., 2008). Najvažniji transkripcijski faktor za razviće Treg je Foxp3 (engl. forkhead box P3) i on je neophodan za indukciju, diferencijaciju, ekspanziju i funkciju ovih imunosupresivnih ćelija (Fontenot, Gavin, i Rudensky, 2003; Fontenot i sar., 2005; Hori, Nomura, i Sakaguchi, 2003; Khattri, Cox, Yasayko, i Ramsdell, 2003). Nefunkcionalnost ovog faktora dovodi do razvoja autoimunskih bolesti inkompatibilnih sa životom i stabilna ekspresija ovog faktora kod zrelih Treg neophodna je za održavanje homeostaze (Kim i Leonard, 2007). Citokini kao što su IL-2 i TGF- β indukuju Foxp3 i aktiviraju STAT5 a zatim STAT5 dalje promoviše ekspresiju Foxp3 i diferencijaciju i sazrevanje Treg (Davidson, DiPaolo, Andersson, i Shevach, 2007). STAT5 je može se reći esencijalan za diferencijaciju Treg jer u njegovom odsustvu nema diferencijacije ovih ćelija (Burchill i sar., 2007), osim kod timocita gde je ekspresija Foxp3 nezavisna od ovog faktora. Treg ćelije inhibiraju transkripciju IFN- γ i indukciju Th1, ali ne remete ekspresiju T-bet (Sojka i Fowell, 2011).

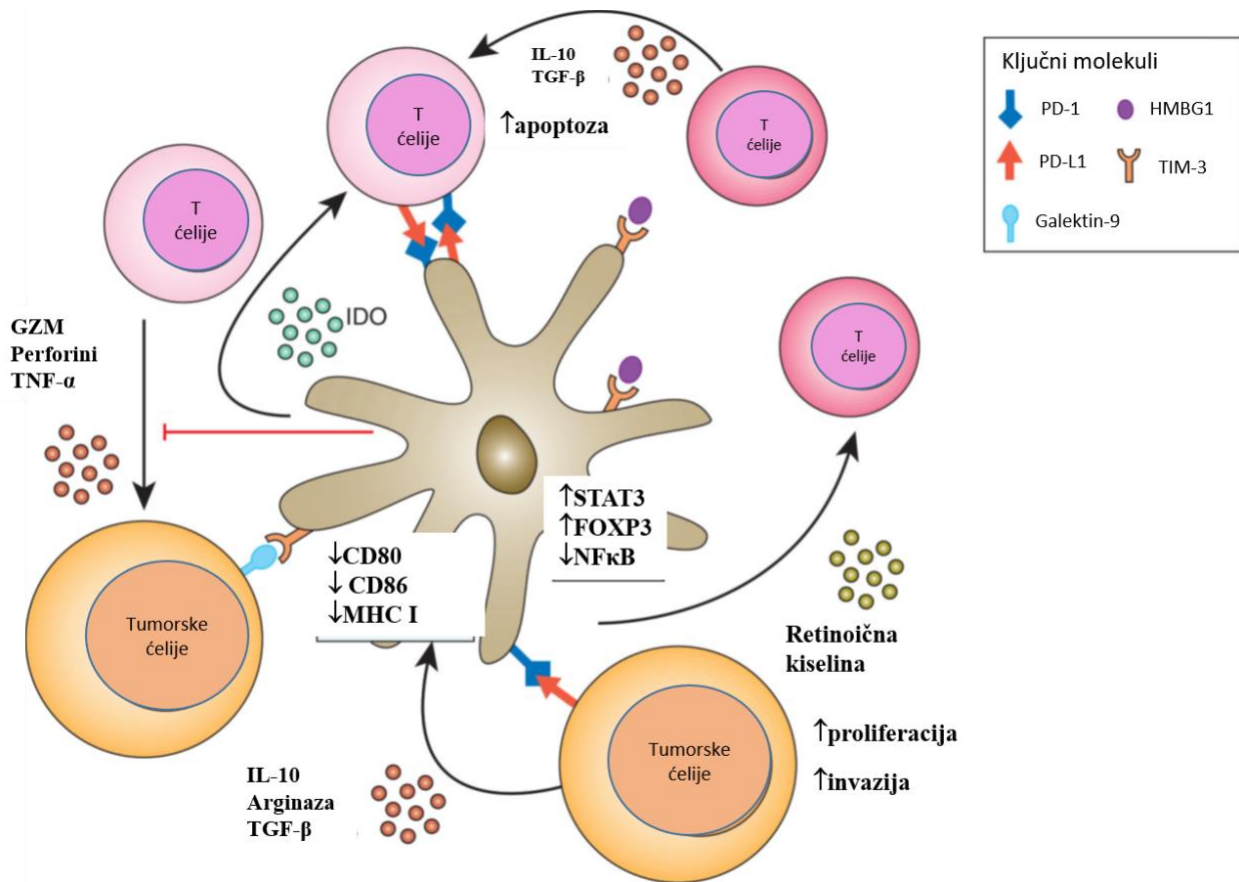
Pored CD4⁺ T limfocita jednako važnu ulogu u ćelijskom adaptivnom odgovoru imaju CD8⁺ T limfociti koji se nakon aktivacije sa specifičnim antigenom diferenciraju ili u kratko-živeće citotoksične T ćelije (engl. Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) ili u dugo-živeće memorijske T ćelije (Tscharke, Croft, Doherty, i La Gruta, 2015; N. Zhang i Bevan, 2011). Do danas su najbolje opisana dva tipa memorijskih CD8⁺ ćelija, centralne i efektorske, koja imaju bitno različite funkcije. Centralne memorijske CD8⁺ ćelije ispoljavaju visok nivo CCR7 i CD62L i nemaju direktnu efektorsku funkciju već stimulišu DC u sekundarnim limfnim organima čime podstiču odgovor kada dođe do sekundarne stimulacije istim antigenom. Sa druge strane, efektorske memorijske CD8⁺ ćelije ispoljavaju nizak nivo CCR7 i CD62L, migriraju do mesta infekcije i proizvode pro-inflamacijske citokine i molekule sa citolitičkim efektom po čemu liče na CTL ali one ostaju u cirkulaciji i nakon odstranjivanja stimulusa. Kada se naivna CD8⁺ ćelija aktivira preko TCR i kostimulatornih molekula ona se diferencira u ranu efektorsku ćeliju koja ispoljava transkripcijski faktor T-bet i citokine kao što su IFN- γ i TNF- α i ima nizak nivo citotoksične sposobnosti. Da li će se ova ćelija dalje razviti u kasnu efektorsku ćeliju ili u memorijsku ćeliju zavisi od kombinacije različitih faktora kao što su nivo ekspresije receptora za IL-2 i nivo IL-12 u mikrosredini koja je okružuje, dalje od nivoa ekspresije T-bet, CD8, CD69, CD43, CD25, CD44,

IFN- γ , Granzima B, receptora za IL-7. T-bet je glavni transkripcioni faktor ovih ćelija i uključen je u produkciju IFN- γ , Granzima B i Perforina u CD8⁺ T ćelijama. Dok je T-bet dominantan faktor u diferencijaciji i funkciji kratko-živećih efektorskih CD8⁺ T ćelija, transkripcioni faktor eomezodermin je važan za diferencijaciju memorijskih ćelija. Osim ovih stimulatora diferencijacije, dva transkripciona represora, Bcl-6 i Blimp-1, imaju takođe važnu ulogu u usmeravanju razvića CD8⁺ T limfocita. I tako dok je visoka ekspresija Bcl-6 u ćelijama povezana sa njihovom snažnom proliferacijom i nižom sekretornom sposobnošću što su osobine memorijskih ćelija, dok je visoka ekspresija Blimp-1 vezana za slabu proliferaciju ćelija koje produkuju visoke koncentracije efektorskih molekula nalik i razvijaju se u CTL. STAT5 takođe ima važnu ulogu u funkciji CD8⁺ T limfocita i indukuje produkciju IL-7 i IL-15 što je važan anti-apoptotski signal za CTL i za memorijske CD8⁺ T limfocite.

1.5 Supresija imunskog odgovora u tumoru

Indukcija i održavanje tumor-specifičnih T ćelija je regulisano mehanizmima koji mogu samostalno ili u kombinaciji da spreče uspešan imunski odgovor protiv tumora. Važnu ulogu u ovim mehanizmima imaju Treg, mieloidne supresivne ćelije i tolerogene DC koje mogu biti indukovane u samom tumoru kao posledica produkcije imunosupresivnih molekula u tumorskom tkivu. Tako su Michielson i saradnici pokazali da je medijum kondicioniran tumorskim tkivom bogat sa VEGF i hemokinima CCL2, CXCL1 i CXCL5 i da u *in vitro* uslovima sprečava maturaciju DC (Michielsen i sar., 2011). Ovakva tumorska mikrosredina odlikuje se različitim mehanizmima koji uključuju imunoregulatorne solubilne molekule i molekule ispoljene na površini tumorskih i različitih imunskih ćelija koje infiltriraju tumor (**Slika 1.4.1**). Janco i saradnici su pokazali da je indukcija ekspresije površinskog molekula protein programirane ćelijske smrti (engl. programmed death 1, PD)-1 i liganada PD-L1 i PD-L2 za ovaj molekul na tumorskim ćelijama, infiltriranim DC (TIDC), T i B limfocitima i mijeloidnim ćelijama jedan od najvažnijih signalnih puteva koji dovodi do supresije imunskog odgovora usmerenog protiv tumora (Krempski i sar., 2011). Indukcija ovog signalnog puta ima karakterističnu dinamiku pri čemu je nivo ekspresije PD-1 na TIDC veoma nizak u početnim, ranim fazama rasta tumora, ali kako tumor napreduje, raste i ekspresija ovog molekula tako da u kasnim fazama tumora skoro sve TIDC ispoljavaju ovaj imunosupresivni molekul što omogućava da imunski sistem ostane utišan u tumorskom tkivu. Blokada ovog molekula na TIDC u *in vitro* uslovima omogućava povećanje

imunostimulatornih citokina, aktivaciju NF κ B, i povećanje ekspresije kostimulatornih molekula u ovim ćelijama, i stimuliše njihovu sposobnost da aktiviraju antigen specifične T limfocite (Karyampudi i sar., 2014; Krempsi i sar., 2011). Pored ovog mehanizma koji je u najnovije vreme iskorišćen za imunoterapiju melanoma, ekspresija na DC drugih molekula kao što je TIM-3 (engl. T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) koji je poznat kao marker supresije Th1 ćelija takođe je uključen u napredak tumora a blokada ovog molekula u patogenezu autoimunskih bolesti (Anderson, 2012). Takođe je pokazana uloga nekoliko različitih poznatih imunosupresivnih molekula iz tumorskog tkiva koji doprinose ekspresiji TIM-3 na T1DC a među njima su VEGF-A, IL-10, TGF- β , indolamin-2,3-dioksigenaze (IDO) i arginaza (Chiba i sar., 2012). Dalje Liu i saradnici su pokazali da tumorsko tkivo proizvodi velike količine PGE2 i TGF- β što dovodi do konverzije imunopotentnih DCu u imunosupresivne DC. Ove DC ispoljavaju viši nivo arginase I koja dovodi do degradacije arginina, amino kiseline koju T limfociti ne mogu da proizvode već je koriste iz okolne sredine.



Slika 1.5.1. TIDC predstavljaju centralne ćelije u interakciji tumora i imunskog sistema u tumorskoj mikrosredini. DC se pokreću u tumorsku mikrosredinu gde ih faktori iz sredine indukuju da povećaju ekspresiju supresivnih molekula PD-1 i TIM-3. Interakcija PD-1 i PD-L1 u tumorskoj mikrosredini blokira odgovor DC na opasne signale zbog čega nema indukcije prezentacije antigena i ekspresije kostimulatora i na ovaj način sprečene je aktivacija T limfocita. Ekspresija opasnih signala takođe je sprečena zbog TIM-3 ekspresije koji se vezuje HMBG1. Pored odsustva odgovarajućeg signala za aktivaciju, odgovor T limfocita je blokiran aktivacijom PD-1 preko PD-L1 ispoljenog na DC. TIDC takođe doprinose tolerogenoj sredini tako što indukuju Treg. Slika je preuzeta iz Janco i sar., (Janco, Lamichhane, Karyampudi, i Knutson, 2015) i obrađena.

Nizak nivo ove aminokiseline dovodi do supresije proliferacije antigen-specifičnih aktiviranih T limfocita i do sprečavanja razvoja anti-tumorskog adaptivnog imunskog odgovora (Q. Liu i sar., 2009). Pored ovoga, visok nivo arginase I može da dovede do produkcije visokog nivoa reaktivnih

vrsta kiseonika što blokira odgovor antigen-specifičnih CD8 limfocita (Kusmartsev, Nefedova, Yoder, i Gabrilovich, 2004).

Visok nivo TGF- β u tumoru indukuje još jedan važan imunosupresivni mehanizam koji se zasniva na ekspresijiIDO molekula na TIDC. Ovakve IDO⁺DC supresuju odgovor CD8 T limfocita na antigen ispoljen na ovim TIDC kao ni antigene ispoljene na pridošlim ne-supresivnim DC (Wei Chen, Liang, Peterson, Munn, i Blazar, 2008). IDO enzim degraduje triptofan što onemogućava proliferaciju limfocita u okolini. Osim ovog mehanizma, produkt triptofana u kinureninskom putu, kinurenin ostvaruje direktan imunosupresivni efekat aktivacijom aril hidrokarbonskog receptora (AhR) na T limfocitima što dovodi do diferencijacije ovih ćelija u Treg. Takođe, aktivacija kinureninom AhR na DC indukuje produkciju TGF- β i istovremeno inhibira produkciju IL-6 što dovodi do pomeranja ravnoteže u diferencijaciji naivnih T limfocita od Th17 ka Treg ćelijama (Kushwah i Hu, 2011).

Za maligne ćelije takođe može biti karakteristična visoka ekspresija tolerogenog molekula humanog leukocitnog antigena G (HLA-G) (Ma, Shurin, Gutkin, i Shurin, 2012), koji je normalno ispoljen na citotrofoblastu gde igra ključnu ulogu u održavanju tolerance između tkiva mame i bebe (Mouillot i sar., 2007; Wilczynski, 2006). HLA-G iz tumorske sredine može indukovati razvoj tolerogenih DC preko aktivacije ko-inhibitornog receptora ILT-4 (engl. Immunoglobulin-like transcript 4) (Ristich, Liang, Zhang, Wu, i Horuzsko, 2005). DC ispoljavaju veći broj inhibitornih receptora koji se karakterišu prisustvom citoplazmatskih inhibitornih tirozinskih motiva (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIM). Nakon aktivacije receptora, dolazi do fosforilizacije ITIM koji onda dalje aktiviraju fosfataze koje u signalnom putu aktiviraju molekule koji dovode do snižavanja procesa aktivacije ćelija. Pored ILT-4, još jedan inhibitorni receptor ILT-3 doveden je u vezu sa indukcijom tolerogenih DC. Povećanje ekspresije ovih molekula na DC vezano je sa smanjenjem ekspresije ko-stimulatornih molekula i sledstveno indukcijom Treg (Chang i sar., 2002).

Takođe važnu direktnu ulogu u supresiji imunskog odgovora imaju citokini koje proizvode tumorsko tkivo kao što su TGF- β , IL-10 i IL-2 za koje je pokazano da stimulišu DC da indukuju Treg *in vitro* (Ramos, Moraes, Zelante, i Barbuti, 2013). Takođe, ovi citokini mogu da deluju zajedno sa površinskim molekulima kao što su inducibilni kostimulatorni ligand T ćelija (engl.

inducible T-cell costimulator-ligand, ICOS-L), PD-L1, CD80 i CD86 u indukciji Treg (Wei Chen i sar., 2008; Conrad i sar., 2012; Fukaya i sar., 2010; L. Wang i sar., 2008; Y. Zheng i sar., 2004).

1.6 Imunoterapija protiv tumora

Anti-tumorski imunski odgovor posredovan je direktnom aktivnošću T limfocita i NK ćelija i antitelima na tumorske antigene. Na osnovu saznanja o mehanizmima i molekulima uključenim u anti-tumorski imunski odgovor i mehanizmima koji su uključeni u supresiju ovog odgovora stalno se radi na unapređivanju i pronalaženju novih anti-tumorskih terapija (Zanetti, 2015).

Jedan od prvih tipova imunske terapije protiv tumora uključivao je primenu antitela specifičnih na tumorske antigene. Međutim ovakva terapija je efikasna samo kada su imunogeni antigeni specifični za tumor ispoljeni na površini ćelija. Ove terapije su se razvijale u smeru razvoja antitela koja imaju vešestruke funkcije važne za borbu protiv tumora i u smeru razvoja antitela specifičnih za više antigena. Međutim, proizvodnja ovakvih antitela je veoma skupa, a terapija se pokazala delimično efikasnom i to samo ako se primenjuje više doza ovih antitela (Baeuerle i Reinhardt, 2009; Jachimowicz, Borchmann, i Rothe, 2014; Pillay, Gan, i Scott, 2011; Waldmann, 2003).

Kao posledica najnovijih otkrića o imunosupresivnim molekulima uključenim u progresiju tumora razvijene su terapije koje su svrstane u grupu inhibitora kontrolnih tačaka imunskog odgovora (engl. immune checkpoint inhibitors). Među ovim terapijama najveći potencijal imaju one usmerene na inhibiciju dva molekula, antigena citotoksičnih T limfocita-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte antigen, CTLA-4) i PD-1.

Ćelijska terapija protiv tumora se zasniva na aktivaciji CD8 T limfocita. Glavni razlog je što tumorsko tkivo kao i ćelije normalnog tkiva ne ispoljavaju MHC klase II (Koretz, Moldenhauer, Majdic, i Möller, 1989; Marincola, Jaffee, Hicklin, i Ferrone, 1999), a ako ispoljavaju ovaj molekul obično ispoljavaju i visok nivo invarijantnog lanca što sprečava prezentaciju endogenih molekula tumorskih ćelija (Möller i sar., 1989). U eksperimentalnim životinjama je pokazano da su tumor-specifične CD8 T ćelije visoko protektivne (Offringa, van der Burg, Ossendorp, Toes, i Melief, 2000). Ove ćelije su detektovane i kod pacijenata sa hematološkim malignitetima i kod onih sa solidnim tumorima, ali ovi tumori obično ispoljavaju visok nivo PD-1 zbog čega je supresovana citotoksična funkcija tumor-specifična CD8 T ćelija (Ahmadzadeh i sar., 2009; Brossart i sar., 1998; Filaci i sar., 2006; Molldrem i sar., 2000). Međutim, do sada razvijene terapijske vakcine

dizajnirane da aktiviraju ove ćelije većinom su se pokazale kao slabo uspešne (Klebanoff, Acquavella, Yu, i Restifo, 2011; Rosenberg, Yang, i Restifo, 2004; Rosenberg i sar., 1998).

Prve studije sa životinjama kojima je indukovano tumor i kojima su ili transplantirane tumor-reaktivne CD4 T ćelije, ili su im specifično odstranjene ove ćelije, pokazale su važnost ovih ćelija za imunski odgovor protiv tumora koji ne ispoljavaju MHC klase II (Fujiwara, Fukuzawa, Yoshioka, Nakajima, i Hamaoka, 1984; Greenberg, Cheever, i Fefer, 1981; Hock, Dorsch, Diamantstein, i Blankenstein, 1991; Hung i sar., 1998; Lauritzsen, Weiss, Dembic, i Bogen, 1994; Mumberg i sar., 1999; Tempero i sar., 1998). Ovi eksperimenti su pokazali da primena ovih ćelija izaziva reakciju nalik odloženoj reakciji hipersenzitivnosti i dovodi do privlačenja inflamacijskih ćelija (makrofaga, granulocita, eozinofila i NK ćelija) u okolinu tumora (Greenberg, 1991; Hung i sar., 1998). Na početku se mislilo da je ovaj efekat posledica isključivo IFN- γ produkovanog od strane primenjenih CD4 T limfocita koji, u sinergiji sa TNF- α , dovodi do citotoksičnosti tumorskih ćelija, dok istovremeno indukuje produkciju reaktivnih vrsta kiseonika i NO, inhibira angiogenezu i stimuliše citotoksičnu aktivnost makrofaga (Corthay i sar., 2005; Coughlin i sar., 1998; Dighe, Richards, Old, i Schreiber, 1994; Fransen, Van der Heyden, Ruyschaert, i Fiers, 1986; Haabeth i sar., 2011; Mumberg i sar., 1999; Qin i Blankenstein, 2000; Williamson, Carswell, Rubin, Prendergast, i Old, 1983). Kasnije je pokazano da su pozitivni efekti na supresiju tumora nakon primene tumor-specifičnih CD4 T limfocita koji proizvode IFN- γ (okarakterisane kao Th1 ćelije) posledica i efekta produkovanog IFN- γ , ali i citotoksičnog efekta samih ovih Th1-nalik ćelija koje *in vivo* stižu citotoksičnu aktivnost (Quezada i sar., 2010; Xie i sar., 2010). Ova terapija dovodi do povećane ekspresije MHC klase II na tumorskim ćelijama što omogućava ubijanje ovih ćelija nezavisno od B ćelija, NK ćelija ili T ćelija domaćina, odnosno ovakav citotoksičan efekat posledica je primenjenih CD4 T limfocita. Najnoviji rezultati pokazali su da smanjenjem ekspresije transkripcionog faktora ThPOK konvencionalne Th1 CD4 T ćelije mogu biti konvertovane u citolitičke CD4 T ćelije (Mucida i sar., 2013). Ove ćelije su detektovane kod pacijenata u cirkulaciji i tumorskom tkivu (Ayyoub, Pignon, Classe, Odunsi, i Valmori, 2013; Campi i sar., 2003; Galon i sar., 2006; Kudela i sar., 2011; Munir i sar., 2012; Ohue i sar., 2012; Tsuji i sar., 2011; Yoshida i sar., 2006; Zeng i sar., 2000; Zeng, Wang, Robbins, Rosenberg, i Wang, 2001). Kao i za direktan citolitički odgovor ovih ćelija u slučaju patogena, perforini i granzimi su odgovorni i za direktan citolitički anti-tumorski efekat CD4 T limfocita (Barnaba i

sar., 1994; Hombach, Köhler, Rappl, i Abken, 2006; Manici i sar., 1999; Moreno i sar., 1991; Nisini i sar., 1997; Soghoian i sar., 2012; Thomas i Hersey, 1998).

1.7 Anti-tumorske vakcine bazirane na dendritskim ćelijama

Istraživanja koja su usmerena na dobijanje DC za imunoterapiju tumora, usmerena su na razvijanje različitih protokola koji će omogućiti dobijanje DC sposobnih da indukuju tumor-specifične Th1 ćelije i citotoksične CD8⁺ T limfocite. Ovakve ćelije treba da budu dobri produceri IL-12 a da pri tome ne povećavaju značajno produkciju supresivnih citokina (IL-10, TGF-β) ili tolerogenih (IDO-1, arginaza, PD-1, ILT-4, ILT-3) molekula. IL-12 je ključni citokin koji stimuliše diferencijaciju pomoćničkih T limfocita u pravcu Th1, što je od posebnog značaja za antitumorsku i antivirusnu imunost. U poslednje vreme, za uspešan antitumorski odgovor sve više se ističe značaj i IL-17, koga produkuju Th17 ćelije. Međutim, opisani su i antitumorski efekti ovog citokina (Kryczek i sar., 2009).

U skladu sa pokazanom važnom ulogom imunopotentnih DC u inicijaciji adaptivnog imunskog odgovora usmerenog na tumorsko tkivo, ali i ulogom tolerogenih DC u supresiji anti-tumorskog odgovora, ove ćelije se intenzivno istražuju kao potencijalni cilj anti-tumorske imunoterapije (A. D. Garg i sar., 2017).

Istovremeno se razvija nekoliko različitih smerova ovakve terapije. Jedan pristup zasniva se na *in vivo* modulaciji DC već prisutnih u tumoru ili organizmu i to (1) ciljanim dostavljanjem tumorskih antigena (engl. Tumor associated antigens, TAA) do DC, (Adotevi i sar., 2007; Berraondo, Nouzé, Préville, Ladant, i Leclerc, 2007; L. Bonifaz i sar., 2002; L. C. Bonifaz i sar., 2004; Cruz i sar., 2012; Hawiger i sar., 2001; Klechevsky i sar., 2010; Schreiber i sar., 2012; Tacken i sar., 2005; Tacken, Ginter, i sar., 2011; Tacken, ter Huurne, Torensma, i Figdor, 2012; Tacken, Zeelenberg, i sar., 2011; Van der Jeught, Van Lint, Thielemans, i Breckpot, 2015) i (2) *in situ* anti-tumorskom vakcinacijom koja podrazumeva administraciju imunomodulatornih molekula za aktivaciju DC u tumoru (Hammerich, Bhardwaj, Kohrt, i Brody, 2016). Drugi pristup je izolacija DC iz organizma i njihovo *ex vivo* izlaganje lizatu tumorskih ćelija i imunostimulatorima i nakon toga administracija ovih ćelija sa poboljšanim osobinama ili administracija vezikula koje su ove ćelije produkovale *ex vivo* (Besse i sar., 2016; Y. Liu, Gu, i Cao; Théry i sar., 1999; Van Deun i sar., 2017; Viaud i sar., 2010; Zitvogel i sar., 1998). Treći pristup je izolacija prekursora DC iz krvi pacijenata ili kostne

srži i indukcija imunopotentnih DC sposobnih da, kada se primene kao vakcine, izazovu snažan anti-tumorski odgovor CD4⁺ i CD8⁺ limfocita specifičnih za tumorske antigene. DC se uspešno mogu diferencirati *in vitro* iz CD34⁺ prekursora (dobijenih iz kosne srži ili krvi pupčanika) ili monocita periferne krvi pacijenata. Indukcijom diferencijacije dobijaju se nezrele DC. Sazrevanje ovih ćelija indukuje se različitim pro-inflamacijskim citokinima i/ili različitim TLR agonistima i/ili ostalim solubilnim molekulima koji su potrebni za stimulaciju DC (npr. CD40), pri čemu se mogu dobiti ćelije koje variraju po svom fenotipu i funkciji. DC, *ex vivo* stimulisane ili dobijene *in vitro*, moraju na svojoj površini da ispoljavaju TAA da bi stimulisale diferencijaciju i aktivaciju tumor-specifičnih T limfocita. Postoji više pristupa za postizanje ekspresije TAA na DC: (1) koltivacijom nezrelih DC sa lizatom autologih ili alogernih tumorskih ćelija (Albert, Pearce, i sar., 1998; Albert, Sauter, i Bhardwaj, 1998; Bercovici i sar., 2008; Zhuang Chen i sar., 2001; De Matos, Abdel - Wahab, Vervaert, Hester, i Seigler, 1998; DeMatos, Abdel-Wahab, Vervaert, i Seigler, 1998; Fields, Shimizu, i Mule, 1998; Fucikova i sar., 2011; Fučíková i sar., 2011; Kokhaei i sar., 2004; Kokhaei i sar., 2003; Nair, Snyder, Rouse, i Gilboa, 1997; Paczesny, Beranger, Salzmann, Klatzmann, i Colombo, 2001) ili rekombinantnim TAA (Fernandez i sar., 1999; Mackey i sar., 1998; J. Mayordomo i sar., 1995; J. I. Mayordomo i sar., 1997; Ossevoort, Feltkamp, Melief, i Kast, 1995; Paglia, Chiodoni, Rodolfo, i Colombo, 1996; Pol i sar., 2015; Zitvogel i sar., 1996), (2) transfekcijom DC sa vektorom za RNA koja kodira za TAA ili mešavinom RNA izolovanih iz tumorskih ćelija (Boczkowski, Nair, Nam, Lyerly, i Gilboa, 2000; Bol i sar., 2015; N. K. Garg, Dwivedi, Prabha, i Tyagi, 2013; Insug, Ku, Ertl, i Blaszczyk-Thurin, 2002; Irvine i sar., 2000; Ishida i sar., 1999; Jung i sar., 2004; Klein, Bueler, i Mulligan, 2000; Koido i sar., 2000; Kongsted i sar., 2017; Kyte i sar., 2016; J. Lee, Boczkowski, i Nair, 2013; Li i sar., 2003; B.-Y. Liu i sar., 2004; Manickan, Kanangat, Rouse, Yu, i Rouse, 1997; McArthur i Mulligan, 1998; Minami, Nakanishi, Izumi, Harada, i Hara, 2003; Nair i sar., 2000; Okada i sar., 2001; Ribas i sar., 2000; Schmidt i sar., 2003; Song i sar., 1997; Tüting, Deleo, Lotze, i Storkus, 1997; Tüting i sar., 1999; Van Meirvenne i sar., 2002; Wan, Bramson, Carter, Graham, i Gauldie, 1997; Wan i sar., 1999; Yamanaka, Zullo, Tanaka, Blaese, i Xanthopoulos, 2001; Zeis i sar., 2003) i fuzijom DC i “onesposobljenih” tumorskih ćelija (dendritomi) (Cathelin i sar., 2011; Celluzzi i Falò, 1998; Errington i sar., 2006; Kjaergaard, Shimizu, i Shu, 2003; Orentas, Schauer, Bin, i Johnson, 2001; Sukhorukov i sar., 2006; Tanaka, Shimizu, Hayashi, i Shu, 2002; J. Wang, Saffold, Cao, Krauss, i Chen, 1998).

Metoda dobijanja DC *in vitro* koja se najčešće koristi (konvencionalna) podrazumeva indukciju diferencijacije DC iz monocita periferne krvi dodavanjem GM-CSF i IL-4 u kulturu u toku 5 do 7 dana. Nakon toga, u cilju indukcije maturacije, ćelije se gaje u toku 1 do 3 dana u prisustvu stimulusa. U zavisnosti od stimulusa koji je korišćen ili načina na koji su TAA ponuđene DC, u različitim istraživanjima dobijene su DC sa različitim osobinama. Ovaj konvencionalni protokol stvaranja nezrelih i zrelih konvencionalnih DC (cDC) od monocita je modifikovan u brojnim laboratorijama širom sveta, sa ciljem da se dobiju funkcionalno najpotentnije DC koje bi se koristile u imunoterapiji. Vreme potrebno za dobijanje bilo koje terapije može ključno da utiče na njen uspeh. Sa jedne strane tumori se vrlo često odlikuju invazivnošću i tada je brza reakcija u smislu što brže primene terapije presudna za dobrobit pacijenta. Pored toga, kultivacija ćelija u *in vitro* uslovima je proces koji zahteva velika materijalna ulaganja zbog čega je neophodno razvijanje što kraćih protokola za dobijanje imunopotentnih DC. Snižavanje cene proizvodnje ovakve terapije omogućilo bi njenu primenu kod najšire populacije pacijenata. Protokoli za ubrzano dobijanje DC vakcina nalaze uporište u rezultatima ranih studija koje su se bavile dobijanjem DC *in vitro*. Tako su Chapuis i saradnici još 1997. godine (Chapuis i sar., 1997) u eksperimentima u kojima su ispitivali faktore koji dovode do opredeljivanja monocita za diferencijaciju ka makrofagima ili DC, pokazali da se DC u prisustvu GM-CSF i IL-4 razvijaju direktno iz monocita bez proliferacije i već drugog dana, kada ukupan broj ćelija u kulturi opada, broj DC dostiže plato. Ovo istraživanje je po prvi put pokazalo da se u odgovarajućim *in vitro* uslovima većina DC već diferencira u toku dva dana. Ova usmerenost ka diferencijaciji monocita u DC u prisustvu GM-CSF i IL-4 je ireverzibilna do drugog dana. Dalje, Randolph i sar. (Randolph i sar., 1998) su u istraživanjima migratornih sposobnosti monocitnih prekursora DC pokazali da se u toku dva dana od trenutka postavke eksperimenta deo mononuklearnih ćelija koje imaju sposobnost migracije kroz sloj endotela u potpunosti diferencira u ćelije koje imaju fenotipske i funkcionalne osobine DC dok se oni monociti koji zaostaju u kolagenu diferenciraju u ćelije nalik makrofagama. Nakon toga je više puta pokazano da vreme potrebno za diferencijaciju DC u *in vitro* uslovima može biti kraće (Dauer i sar., 2003; Obermaier i sar., 2003), pri čemu se najčešće koriste isti ili slični kultivacioni uslovi kao kod konvencionalnog protokola. Međutim, za sada nema dovoljno komparativnih studija koje bi pokazale prednost protokola ubrzane diferencijacije u odnosu na konvencionalni i dale odgovor na pitanja da li DC dobijene u kratkotrajnim kulturama (engl. fast DC, fDC) poseduju neophodne fenotipske i funkcijske karakteristike koje bi omogućile

njihovo uspješno korišćenje u imunoterapiji tumora. U do sada objavljenim studijama pokazan je efekat fDC na produkciju IFN- γ od strane T limfocita, ali nema podataka o tome kakav je uticaj DC dobijenih po ubrzanom protokolu na indukciju Th17 imunskog odgovora i regulatornih T ćelija.

2 HIPOTEZA

Na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih istraživanja smo postavili sledeće hipoteze:

1. Za većinu donora, protokol ubrzane diferencijacije DC je podjednako uspešan za dobijanje DC *in vitro* kao i konvencionalni protokol, u pogledu fenotipskih i funkcionalnih svojstava, pogotovo njihovog kapaciteta da stimulišu odgovor T limfocita u pravcu Th1 ćelija.
2. Fenotipska i funkcionalna svojstva monocita određuju njihov naknadni potencijal za diferencijaciju po ubrzanom protokolu,
3. Produkti koje monociti sekretuju rano tokom diferencijacije i vrsta primenjenog maturacionog stimulusa, utiču na potencijal monocita da se po ubrzanom protokolu diferenciraju u imunogene DC

3 CILJ ISTRAŽIVANJA

Za proveru ovih pretpostavki postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Uporediti fenotipska svojstva DC dobijenih konvencionalnim protokolom i protokolom ubrzane diferencijacije od istih donora u prisustvu a) koktela proinflammatoryh medijatora (IL-6, IL-1 β , PG-E2, TNF- α) i b) agonista TLR3 receptora (poly I:C), samog ili u kombinaciji sa TNF- α , na osnovu
 - a. Morfoloških svojstava
 - b. Markera diferencijacije (CD14, CD1a, CD209, CD33)
 - c. Markera sazrevanja (CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40, CCR7, CCR6, CD54)
 - d. Markera tolerogenih ćelija (ILT-3, PD-L1, IDO-1)

2. Uporediti funkcionalna svojstva DC dobijenih po konvencionalnom i protokolu ubrzane diferencijacije od istih donora u pogledu
 - a. Produkcije citokina (IL-12, IL-23, IL-10, TNF- α , IL-6)
 - b. Kapaciteta za indukciju proliferacije alogernih T limfocita
 - c. Kapaciteta za polarizaciju imunskog odgovora u pravcu Th1, Th17 i Th2
 - d. Kapaciteta za indukciju supresivnih Treg ćelija

3. Ispitati koje osobine monocita koreliraju sa njihovim potencijalom za diferencijaciju po ubrzanom protokolu, na osnovu analize
 - a. Fenotipa (CD14, CD16, CD36 i CD69)
 - b. Produkcije citokina (IL-1 β , TNF- α i IL-6)
 - c. Ispitati uticaj ključnih citokina na potencijal diferencijacije primenom blokirajućih antitela

Krajnji cilj je ispitati da li priprema protokola za ubrzanu diferencijaciju DC omogućava dobijanje imunogenih DC kao i konvencionalni protokol, u pogledu potencijalne primene u imunoterapiji tumora, i koji su ključni faktori koji utiču na imunogene osobine dobijenih DC.

4 MATERIJAL I METODE

4.1 Medijumi i reagensi

4.1.1 Medijumi

Kao osnovni medijum za izolaciju i kultivisanje ćelija korišćen je RPMI 1640 medijum (PAA Laboratories GmbH, Austria) kome je dodato 1% gentamicina (Galenika, Beograd) i 7.5% NaHCO_3 (Apoteka VMA, Beograd) kao pufer.

Za kultivaciju ćelija korišćen je kompletni medijum sačinjen od osnovnog u koji je dodato 10% fetalnog telećeg seruma (engl. fetal calf serum, FCS; PAA Laboratories, Austria), $50\mu\text{M}$ 2-merkaptoetanol (2-ME), 50 i.j/ml penicilina i 50mg/ml streptomocina (Galenika, Beograd).

4.1.2 Reagensi

PBS (engl. Phosphate Buffered Saline)

- 14ml 0.2M KH_2PO_4 (Serva, Nemačka)
- 36ml 0.2M Na_2HPO_4 (Serva, Nemačka)
- 50ml 16% NaCl (Zorka, Šabac)
- 900ml destilovane vode

PBS1

- 0,01 % NaN_3 (Sigma Aldrich, SAD)
- PBS

PBS2

- 0,01% NaN_3
- 2% FCS
- PBS1

K-PBS (pH 7.2- 7.4)

- 137 mM NaCl (Zorka, Šabac)

- 2.7 mM KCl (Serva, Nemačka)
- 8.1 mM Na₂HPO₄(Serva, Nemačka)
- 1.5 mM KH₂PO₄ (Serva, Nemačka).

Pufer za magnetno sortiranje

- 2 mM EDTA
- 0,5% goveđeg serum-albumina (Sigma, Nemačka)
- PBS

4.2 Izolacija i kultivacija humanih ćelija

4.2.1 Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Mononuklearne ćelije (PBMNC) su izolovane iz periferne krvi zdravih dobrovoljaca koji su dali pismenu saglasnost. U procesu izdvajanja plazme u kliničke svrhe, na Institutu za transfuziologiju Vojnomedicinske akademije između sloja plazme na vrhu i eritrocita na dnu, izdvaja se frakcija koja sadrži sve ćelijske elemente krvi osim eritrocita (engl. Buffy coat). Iz ove frakcije su korišćenjem gustinskog gradijenta Lymphoprep (PAA Laboratories) gustine 1,077g/ml izolovane PBMC za eksperimente. Po uputstvu proizvođača, napravljena je ćelijska suspenzija u medijumu 0,02% Na-EDTA u PBS (u razmeri 1:2 do 1:4, suspenzija: Na-EDTA/PBS), a zatim pažljivo pipetom suspenzija je nanošena na površinu Lymphoprep gradijenta kako bi se dobila dvofazna suspenzija, u finalnom odnosu 1:4 u korist ćelija. Nakon centrifugiranja (2200 rpm, 20 minuta na sobnoj temperaturi) se izdvaja prsten PBMNC. Nakon uklanjanja gornjeg sloja plazme sakupljena je faza PBMC iz svih epruveta i ćelije su isprane od gradijenta u medijumu 0,02% Na-EDTA u PBS, centrifugiranjem na 2500 rpm, 15 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon odstranjivanja gradijenta, suspenzija ćelija je ispirana još četiri puta centrifugiranjem na 1000 rpm, 10 minuta, na sobnoj temperaturi, uz postupno povećavanje udela kompletnog medijuma za kultivaciju u rastvoru za ispiranje tako da je na kraju ova ćelijska suspenzija isprana i od tragova NaEDTA. Ovako dobijene ćelije su korišćene u daljem toku eksperimenta za izolaciju monocita i T limfocita.

4.2.2 Izdvajanje ćelija korišćenjem magnetnog sortiranja

Čiste ćelijske frakcije korišćene u eksperimentima dobijene su negativnim magnetnim sortiranjem PBMC, korišćenjem mešavine antitela priložene u pakovanju i po proceduri preporučenoj od strane proizvođača (Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) tako da izolovane ćelije koje se koriste u eksperimentima ostaju neobeležene (negativno sortiranje). Monociti periferne krvi dobijeni su korišćenjem Human Monocytes Isolation Kit II sa smešom antitela specifičnih za ne-monocitne ćelije (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a). Takođe negativnim sortiranjem, dobijeni su i ukupni CD3+ T limfociti korišćenjem Pan-T cell Isolation Kit sa smešom antitela CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, CD235a), i CD4+ T limfociti korišćenjem CD4+ T cell Isolation Kits sa smešom antitela CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , CD235a. Čistoća dobijenih frakcija bila je uvek preko 90%. Ovako dobijeni monociti korišćeni su za dobijanje DC a limfociti su korišćeni za ispitivanje funkcije DC. Korišćena procedura je uključivala nekoliko uzastopnih koraka koji su vodili sortiranju ćelija. Najpre su izbrojane ćelije dobijene prečišćavanjem PBMC na gustinskom gradijentu. Na osnovu broja ćelija DC odnosno limfocita potrebnih za eksperiment izračunata je zapremina antitela potreban za izolaciju određenog tipa ćelija. Nakon ispiranja izdvojenih ćelija u PBS-u centrifugiranjem na 300 x g, 10 minuta, ćelije su inkubirane 10 minuta u određenoj zapremini pufera (PBS sa dodatkom 2mM EDTA i 0.5% BSA) sa odgovarajućom koncentracijom smeše antitela konjugovanih biotinom. Nakon isteka ove inkubacije, ćelije u suspenziji su tokom 15 minuta inkubirane u prisustvu anti-biotin antitela konjugovanih sa magnetnim mikrokuglicama. Po isteku ove inkubacije ćelije su isprane i resuspendovane u PBS/NA-EDTA/BSA puferu, nakon čega su postavljene na kolonu za magnetno sortiranje ćelija koja je postavljena na magnet (Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Nakon dodatnog ispiranja kolone postavljene na magnetu, ćelije koje nisu zaostale u koloni su isprane prvo u PBS/EDTA/BSA puferu, a zatim i u kompletnom medijumu za kultivaciju.

4.3 Brojanje ćelija

Vijabilnost i broj ćelija je utvrđen bojenjem tripan-plavim. Ćelije su obojene 0,1% rastvorom tripan – plavog u PBS što je omogućilo brojanje ćelija u komori po Burker-Turk-u na svetlosnom mikroskopom. Tokom brojanja uočavaju se ćelije koje nisu vijabilne i koje se boje plavo i vijabilne neobojene ćelije. Konačan broj vijabilnih ćelija je računat kao

$$N(\text{ml}) = \frac{\sum^4 \text{brojanja}}{4} \times \text{faktor razblaženja u tripanu} \times 10^4$$

% vijabilnih ćelija je izračunat kao 100% - % tripan plavih ćelija, pri čemu je brojano najmanje 500 ćelija

4.4 Diferencijacija DC iz monocita

Monociti izolovani negativnim magnetnim sortiranjem ili aderencom u trajanju od 1h su korišćeni u analizi ekspresije CD69, CD36 i CD16 u cilju procene njihovog aktivacionog statusa, kao i u postupku diferencijacije DC konvencionalnim protokolom (cDC) i protokolom ubrzane diferencijacije (fDC) pri čemu su uvek korišćeni monociti istog donora za oba protokola diferencijacije.

4.4.1 Dobijanje DC konvencionalnim protokolom

Monociti dobijeni na opisan način su kultivisani tokom 5 dana u plastičnim flaskovima, na 37°C, u atmosferi zasićenoj vodenom parom sa 5% CO₂ u kompletnom medijumu uz dodatak 100 ng/ml GM-CSF (Leucomax, specifične aktivnosti 4.44x10⁶ IU) - nabavljen od Sandoz-Schering Plough, Švajcarska) i 20 ng/ml IL-4 (Roche Diagnostics GmbH, Nemačka). Po isteku petog dana kultivacije, nezrele DC su u vidu neadherentnih ćelija sakupljene i u medijumu sa GM-CSF i IL-4 stimulisane tokom 48 sati koktelom proinflamatornih medijatora (10 ng/ml TNF- α (R&D), 10 ng/ml IL-1 β (R&D), 10 ng/ml IL-6 (R&D) i 1 μ g/ml PGE2 (Sigma) ili su DC stimulisane samo sa Poly I:C (5, 25, 50 μ g/ml). Takođe u nekim eksperimentima praćen je uticaj dodatka TNF- α (10ng/ml) zajedno sa Poly I:C na apoptozu DC. Nakon kultivacije, ćelije su sakupljene, isprane u kompletnom medijumu i kao takve korišćene u fenotipskim i funkcionalnim testovima. Supernatanti iz svih kultura su skupljeni i smrznuti na -20°C u cilju kasnijeg određivanja citokinskog profila, a ćelije su korišćene u analizi fenotipskih i funkcijskih svojstava.

4.4.2 Dobijanje DC protokolom ubrzane diferencijacije

Monociti izolovani iz istih donora kao i oni korišćeni za dobijanje cDC su korišćeni i u postupku ubrzane diferencijacije. Monociti su najpre kultivisani tokom 24h u prisustvu GM-CSF (100 ng/ml) i IL-4 (20 ng/ml). Po isteku prvog dana kultivacije, nezrele DC su u vidu neadherentnih ćelija sakupljene i stimulisane 48 sati koktelom proinflamatornih medijatora (10 ng/ml TNF- α (R&D), 10 ng/ml IL-1 β (R&D), 10 ng/ml IL-6 (R&D) i 1 μ g/ml PGE2 (Sigma) ili su DC stimulisane samo sa Poly I:C (5, 25, 50 μ g/ml). U cilju ispitivanja uticaja IL-6 na diferencijaciju fDC, monociti su u nekim eksperimentima diferencirani u prisustvu blokirajućeg aIL-6R (tocilizumab, 5 μ g/ml) ili izotipskog antitela u istoj koncentraciji. Nakon kultivacije, ćelije su sakupljene, isprane u kompletnom medijumu i kao takve korišćene u fenotipskim i funkcionalnim testovima. Supernatanti iz svih bazena u kojima su ćelije bile kultivisane su skupljeni i smrznuti na -20°C u cilju kasnijeg određivanja citokinskog profila.

4.4.3 Krioprezervacija u protokolima diferencijacije DC

Osim standardnog dizajna za poređenje fenotipa i funkcija cDC i fDC od istog donora, u nekim eksperimentima je korišćen alternativni pristup u cilju sinhronne analize i manipulacije cDC i fDC. U ovim eksperimentima PBMC su prvo bile prezervirane zamrzavanjem na -80°C, da bi ćelije za diferencijaciju po protokolu za cDC bile odleđivane 4 dana pre ćelija za diferencijaciju za fDC. Nakon diferencijacije u GM-CSF/IL-4 ukupno 5 dana, odnosno 24 časa, i stimulacije sa poly (I:C) tokom 48 časova, dobijene su cDC, odnosno fDC.

4.5 Morfološka analiza DC

Morfološka analiza ćelija diferenciranih po konvencionalnom ili ubrzanom portokolu je urađena nakon pripreme citospin preparata, pomoću svetlosne i konfokalne mikroskopije.

4.5.1 Priprema citospin preparata

Kultivisane cDC i fDC su prošpricane i isprane u medijumu sačinjenom od osnovnog u koji je dodato 2% FCS. Nakon toga je po 100 μ l ćelijske suspenzije (1-2 x 10⁴ MoDC po preparatu) naneto na mikroskopske pločice, prethodno premazane poli-L-lizinom (PLL) i centrifugirano 5 min na 30 g u citocentrifugi (MPW-35, Poljska).

4.5.2 May-Griinwald Giemsa bojenje preparata

Citospin preparati cDC i fDC preliveni su May-Griinwald rastvorom (Merck KGaA, Nemačka) i inkubirani 5 min. Po isteku inkubacije, preparati su isprani destilovanom vodom i potom tretirani 15 min Giemsa rastvorom (razblaženja 1:10 u destilovanoj vodi), (Merck KGaA, Nemačka). Nakon inkubacije, preparati su ponovo isprani destilovanom vodom, a zatim osušeni na sobnoj temperaturi i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom OLYMPUS CX31 (Olympus, Japan).

4.5.3 Konfokalna mikroskopija

Citospin preparati fDC diferenciranih iz monocita pomoću Poly (I:C) 10µg/ml, u prisustvu tocilizumaba (5 µg/ml) su obojeni sa anti-HLA-DR Alexa488 Ab i Syto59, bojom za jedra, i analizirani pomoću konfokalne mikroskopije.

4.6 Procena funkcionalnih karakteristika MoDC

4.6.1 Alostimulatorna aktivnost

Alostimulatorna sposobnost cDC i fDC je određivana na osnovu proliferacije alogenih CD4⁺ ili CD3⁺ T limfocita u kulturi mešane leukocitne reakcije (MLR). Tretirane DC su korišćene kao stimulatori, a kao responderi su korišćeni T limfociti alogenog davaoca. U ploču od 96 mesta sa "U" ili ravnim dnom (Sarstedt, Nemačka) dodati su stimulatori kao duplikati dvostruko opadajućih razblaženja (1×10^4 - 0.625×10^4) i responderi u konstantnoj koncentraciji od 1×10^5 po bazenu. Čelije su kultivisane 5 dana u kompletnom medijumu u termostatu na +37°C i 5% CO₂ u ukupnoj zapremini od 200µl po bazenu. U jedan deo kultura pre isteka poslednjih 18 sati ćelijama je dodat timidin obeležen tricijumom ([³H]-timidin; Amersham International, Velika Britanija), specifične aktivnosti 6.7 Ci/mmol u koncentraciji 1µCi po bazenu. Nakon isteka kulture, ćelije su pokupljene automatskim skidačem kultura (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, USA). Ugradnja [³H]-timidina izmerena je scintilacionim beta brojačem (LKB-1219 Rackbeta, Finland) i izražena je kao broj otkućaja u minuti (engl. Counts Per Minute, cpm) ili kao indeks proliferacije (engl. proliferation index, PI).

4.6.2 Sposobnost DC da indukuju diferencijaciju određenog Th odgovora

Ko-kulture DC i CD4⁺ T limfocita u kojima je ispitivana sposobnost DC da indukuju diferencijaciju određenog Th odgovora postavljene su u odnosu 1: 10 (1x10⁴ DC: 1x10⁵ CD4⁺ T limfocita) na isti način kao i ko-kulture za ispitivanje alostimulatorne sposobnosti DC. Tokom poslednja 4 sata kultivacije u ove ko-kulture dodato je 20 ng/mL forbol miristat acetata (PMA, Sigma-Aldrich) i 500 ng/mL jonomicina (Merck, Vienna, Austria) kako bi se podstakla produkcija sintetisanih citokina. U ko-kulture u kojima je merena intracelularna ekspresija citokina je pored PMA, jonomicina dodat i monenzin kako bi se sprečila sekrecija citokina van ćelija.

4.6.3 Test supresije

U cilju procene sposobnosti DC da indukuju Treg ćelije urađen je test supresije. DC (1x10³ po bazenu ploče 96 mesta sa U dnom) su kultivisane sa naivnim CD3⁺ (1x10⁵ po bazenu) čime je odnos ćelija DC/CD3⁺ ćelija bio 1:100. CD3⁺ T ćelije su kokultivisane 3 dana sa DC (priming) a nakon toga izolovane iz kokulture pomoću imunomagnetnog sortiranja, kao što je ranije opisano, a zatim su tretirane rekombinantnim IL-2 (2 ng/ml, RnD) naredna 2 dana. Da bi se ispitao efekatIDO-1 ispoljen na fDC na tolerogenu funkciju ovih ćelija i sposobnost da izazovu supresiju proliferacije T limfocita i indukuju Treg, u nekim eksperimentima u toku priminga je dodat inhibitorIDO-1, 1- metiltriptofan (1-MT). Prajmovane T ćelije su analizirane pomoću protočne citometrije u cilju utvrđivanja ekspresije CD4, CD25 i Foxp3 i korišćene u sekundarnom MLR. Responderske CD3⁺ T ćelije istog donora su u paralelnim kulturama prajmovane sa imobilisanim anti-CD3 antitelima (5 µg/ml, eBioscience) i solubilnim anti-CD28 antitelima (2 µg/ml, eBioscience), i tretirane sa IL-2 na isti način kao i T ćelije iz kokulture sa DC. U sekundarnom MLR CD3⁺ T limfociti iz kokulture sa DC (4 x 10⁴ ili 2x10⁴) i responderski CD3⁺ T limfociti (2x10⁵/bazen) su kokultivisani u odnosima 5:1 odnosno 10:1 u ploči sa 96 mesta obloženoj sa anti-CD3 antitelima u prisustvu solubilnog anti-CD28 antitela naredna tri dana. Kao dodatne kontrole, korišćeni su responderski CD3⁺ T limfociti (2,4 x 10⁵, 2,2 x 10⁵ i 2,0 x 10⁵ /bazen) kultivisani bez prisustva CD3⁺ T ćelija iz kokulture sa DC, kao i sami CD3⁺ T limfociti iz kokulture sa DC (4 x 10⁴ ili 2x10⁴) kultivisani bez responderskih CD3⁺ T limfocita. Kulture rađene u šestoplikatima su tretirane ³H timidinom (1µCi / bazenu, Amersham, Books, UK) tokom poslednjih 18 sati kulture a radioaktivnost je merena pomoću β scintilacionog brojača (LKB-1219, Rackbeta, Finland).

4.7 Protočna citometrija

4.7.1 Fenotipska analiza DC i T limfocita

Određeni molekuli na ćelijskoj membrani ili intracelularni molekuli DC i T limfocita detektovani su korišćenjem antitela specifična za humane antigene. U **Tabeli 4.5.1.1** data su mišija monoklonska antitela (mAt) korišćena za analizu DC.

Analiza ekspresije Foxp3 u CD3⁺ limfocitima ko-kultivisanim sa DC je izvršena metodom intracitoplazmatskog bojenja. CD3⁺ T limfociti skupljeni iz ko-kulture su isprani u PBS1 a zatim inkubirani sa anti-CD4 antitelom konjugovanog biotinom (eBioscience,1:20) i anti-CD25 antitelom konjugovanog PE (eBioscience,1:20) tokom 30 minuta na +4°C. Ćelije su isprane centrifugiranjem na 1400 rpm 8 min. a na pelet je dodat streptavidin PECy5 (eBioscience,1:200) i ćelije su inkubirane tokom narednih 15 minuta. Nakon ispiranja u PBS-u, dodat je fix/perm reagens A pufer (Invitrogen) i ćelije su inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS2 na pelet je dodat fix/perm reagens B sa anti-Foxp3 –FITC antitelom (eBioscience, 1:20). prema uputstvima proizvođača. Ćelije su blago vorteksovane i inkubirane 20 min u mraku, na sobnoj temperaturi a zatim isprane u PBS1. Nakon resuspendovanja peleta u PBS1 analizirana je ekspresija CD4, CD25 i Foxp3 na protočnom citometru. Kao dodatne kontrole korišćeni su uzorci obeleženi sa po dva od navedena tri antitela na osnovu kojih je određena nespecifična fluorescencija za fluorohrom koji nedostaje (engl. fluorescence minuse one control).

U nekim eksperimentima određivana je ekspresija intracelularnih citokina u CD4⁺ limfocitima ko-kultivisanim sa DC. Tokom zadnja 4 sata ko-kultivacije u kulture je dodat PMA i monenzin i nakon toga ćelije su sakupljene permeabilizovane na isti način kao i za analizu Foxp3 nakon čega su po uputstvu proizvođača dodavana antitela za citokine.

Fenotip obeleženih ćelija je analiziran na EPICS XL-MCL protočnom citofluorimetru (Coulter, Krefeld, Nemačka) i Cube 6 (Sysmex Partec, Nemačka). Detaljna analiza je izvedena primenom FCS Express 4 programa. Rezultati citofluorimetrijske analize predstavljeni su kao numerička vrednost procenta obeleženih ćelija, srednje vrednosti intenziteta fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, mfi). MFI predstavlja aritmetičku sredinu intenziteta fluorescence pojedinačnih događaja (ćelija) izraženu u relativnim brojevima kanala fluorescencije (0-1024).

Analizirano je najmanje 5000 ćelija po uzorku. Nivo nespecifične fluorescence određivan je u uzorcima koji su inkubirani sa irelevantnim mAt.

Tabela 4.7.1.1. Antiela korišćena u fenotipskoj analizi DC

mAt	Razblaženje	Proizvođač
CD33 (APC)	1:10	R&D Systems, V.Britanija
CD16	1:10	Serotec, V.Britanija
CD36	1:10	Serotec, V.Britanija
CD69	1:10	Serotec, V.Britanija
CD14 (FITC)	1:10	Serotec, V.Britanija
CD1a (PECy5)	1:10	Immunotech
HLA-DR (PerCP)	1:10	Serotec, V.Britanija
CD83 (FITC)	1:5	BD Biosciences, SAD
CD86 (PE)	1:10	Serotec, V.Britanija
CD80 (FITC)	1:10	Thermo Fisher, SAD
CCR6 (PE)	1:10	R&D Systems, V.Britanija
CCR7 (PE)	1:20	eBioscience
CD54 (PE)	1:20	eBioscience
ILT3 (PE)	1:10	eBioscience
CD209 (PerCP)	1:20	eBioscience
PD-1L (PE)	1:20	eBioscience

4.8 Izolacija RNK iz ćelija i tkiva

Izolacija ukupne RNK iz dobijenih DC urađena je prema protokolu koji su opisali Lukic i sar., 2013. Za izolaciju je korišćen denaturišući rastvor koji se sastojao iz: 4 M guanidin tiocijanata, 25 mM natrijum-citrata, 0.1 M 2-merkaptioetanol i 0,5% natrijumove soli N-lauroilsarkozina. Zaleđene ćelije su resuspendovane direktno u denaturišućem rastvoru. Nakon topljenja ćelije su dodatno homogenizovani nastavkom od 1 ml. Dalje je dodata jednaka zapremina kiselog fenola (pH=4), 1/10 zapremine 2 M natrijum acetata (pH=4) i 1/5 zapremine hloroforma. Homogenati ćelija su pažljivo izmućkani i ostavljeni na ledu 10-15 min. Smeša je centrifugirana 20 min na

13000 rpm, 4°C (5417R, Eppendorf centrifuge) i gornja faza prebačena u nove tube. Korak fenolske ekstrakcije ponovljen je kako bi se smanjio sadržaj proteina i eliminisala potencijalna genomska DNK. RNK je precipitirana dodatkom jedne zapremine izopropanola inkubacijom na –20°C u trajanju od 30 min i centrifugiranjem na 13000 rpm, 4°C u trajanju od 20 min (5417R, Eppendorf centrifuge). Talogu je resuspendovan u denaturišućem rastvoru i postupak ponovljen. Nakon što je RNK isprecipitirana po drugi put, talog je resuspendovan u 75% etanolu i smeša centrifugirana na 13000 rpm, 4°C u trajanju od 20 min (5417R, Eppendorf centrifuge). Talog je osušen na sobnoj temperaturi (10-15 min) i resuspendovan u bidestilovanoj vodi bez RNaza. Koncentracija izolovane RNK određena je na Nanovue Plus spektrofotometru (GE Healthcare). Izolovana RNK čuvana je na –80°C.

4.9 Reverzna transkripcija

Sinteza komplementarne DNK (Complementary DNA, cDNK) urađena je prema protokolu proizvođača korišćene reverzne transkriptaze (Thermo Scientific). Kao početna matrica u reakciji reverzne transkripcije korišćeno je 200 ng izolovane RNK. Ovoj koncentraciji RNK dodato je 100 pmola nasumičnih heksamera (Thermo Scientific) i bidestilovane vode i dobijena je finalna zapremina smeše od 13 µl. Inkubacijom smeše na 65°C tokom 5 min denaturisane su sekundarne strukture RNK molekula. Nakon toga je u reakciju dodato: 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora (Thermo Scientific), 1 mM dNTP smeše (Thermo Scientific), 200 U RevertAid H Minus reverzne transkriptaze (Thermo Scientific) i 1 × reakcionog pufera, do konačne zapremine od 20 µl. Paralelno, za svaki uzorak postavljena je reakcija bez dodavanja reverzne transkriptaze. Uslovi reakcije bili su sledeći: 10 min na 25°C, 60 min na 42°C i 10 min na 70°C. Nakon završene reverzne transkripcije prisustvo cDNK (u uzorcima kojima je dodata reverzna transkriptaza) i odsustvo genomske DNK (u uzorcima kojima nije dodata reverzna transkriptaza) potvrđeno je lančanom reakcijom polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR). Reakciona smeša napravljena je od 1 U Kapa Taq DNK Polimeraze (Kapa Biosystems, Cape Town, Južna Afrika), 1 × reakcionog pufera sa magnezijumom, 0.2 mM dNTP (Thermo Scientific), 10 pmola prajmera za konstitutivno eksprimiran gen (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GAPDH) i 1 µl sintetisane cDNK ili 1 µl kontrolnog uzorka koji nije sadržao enzim reverznu transkriptazu. Uslovi PCR reakcije podešeni su na sledeći način: početna denaturacija DNK na 94°C 5 min, nakon čega je usledilo 30 ciklusa pri čemu se svaki ciklus sastojao od denaturacije DNK na 94°C 30 s,

hibridizacije prajmera na 55°C 30 s i sinteze fragmenata na 72°C 30 s. Na kraju je usledila sinteza nedovršenih fragmenata na 72°C u trajanju od 7 min. Prisustvo umnoženih fragmenata provereno je metodom horizontalne elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Za pripremu gelova rastvorena je agarozna (Sigma) u 1 × TAE (40 mM Tris-Acetate pH = 8, 1 mM EDTA) puferu i u rastvor je dodat etidijum bromid (0,5 µg/ml). Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 80 V. Za određivanje veličine DNK fragmenata korišćen je DNK standard GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). PCR i reakcije reverzne transkripcije urađene su u Gene AmpR System 2 700 (Applied Biosystems).

4.10 Kvantitativna PCR

Sintetisana cDNK korišćena je za kvantifikaciju ekspresije IDO-1 molekula metodom kvantitativnog PCR-a (Quantitative, qPCR). Konačna zapremina reakcije iznosila je 10 µl i sadržala je 4 pmola prajmera, 1 × KAPA SYBR FAST Universal Master Mix (Kapa Biosystems), 0.2 µl Rox Low Reference boje i 1 µl cDNK matrice. Umnožavanje cDNK izvršeno je aparatom 7500 Real Time System (Applied Biosystems) po sledećem programu: aktivacija enzima 3 min na 95°C i 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i od po 60 s na 60°C. Efikasnost prajmera i procena količine cDNK potrebne za izvođenje reakcije određeni su u eseju apsolutne kvantifikacije. Korišćena su desetostruka razblaženja cDNK (1/10-1/10000). U eseju relativne kvantifikacije ekspresija gena izračunata je po formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Vrednost $\Delta\Delta Ct$ (Ct , prazna vrednost ciklusa) predstavlja razliku između ΔCt željenog uzorka i ΔCt uzorka koji je definisan kao kalibrator (nestimulisane cDC). Vrednost ΔCt predstavlja razliku između Ct vrednosti dobijene za ciljni gen i Ct vrednosti dobijene za konstitutivno eksprimirani gen (GAPDH, unutrašnja kontrola) (Livak i Schnittgen, 2001).

4.11 ELISA

Produkcija pro-inflamacijskih (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) i imunoregulatornih (TGF- β , IL-10 i IL-8) citokina od strane monocita u ranoj fazi diferencijacije u DC merena je ELISA testom. Funkcija DC je procenjena i na osnovu produkcije citokina IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, TNF- α i IFN- γ u supernatantima kultura DC tretiranih odgovarajućim stimulusom. Određivani su nivoi citokina upotrebom komercijalnih ELISA testova po uputstvu proizvođača.

4.12 Statistička analiza podataka

U analizi podataka korišćeni su Studentov t test, jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), dvosmerna ANOVA sa Bonferoni post-testom, Spermanov test i neparametarski Wilkoksonov parni test. Korišćeni statistički test označen je u opisu figura.

Statističke značajnosti označene su zvezdicama i njihovo značenje je * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

*** $P < 0.005$ u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.

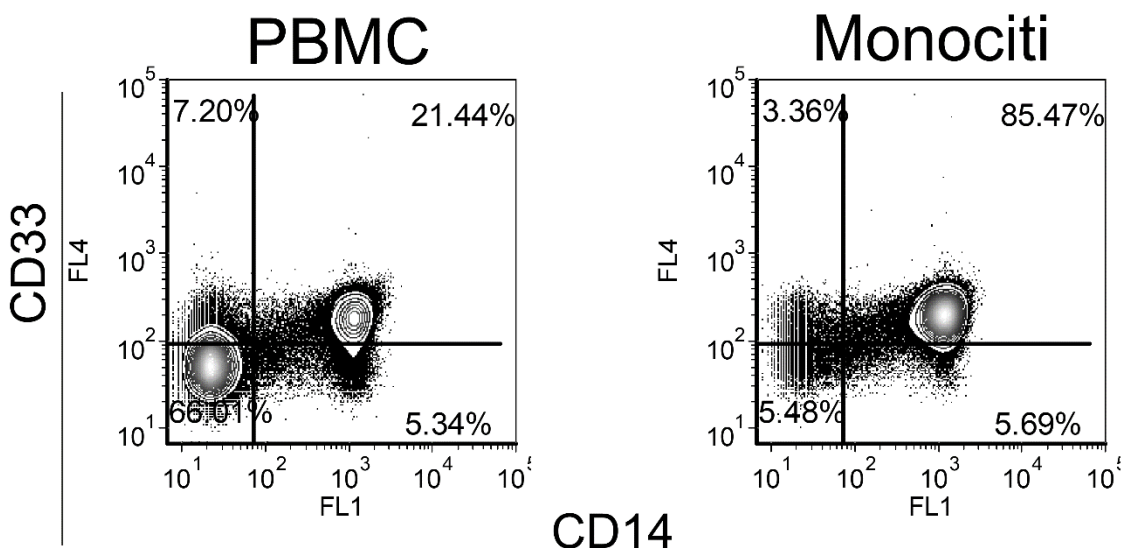
5 Rezultati

5.1 Fenotipska svojstva DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije korišćenjem proinflamacijskog koktela

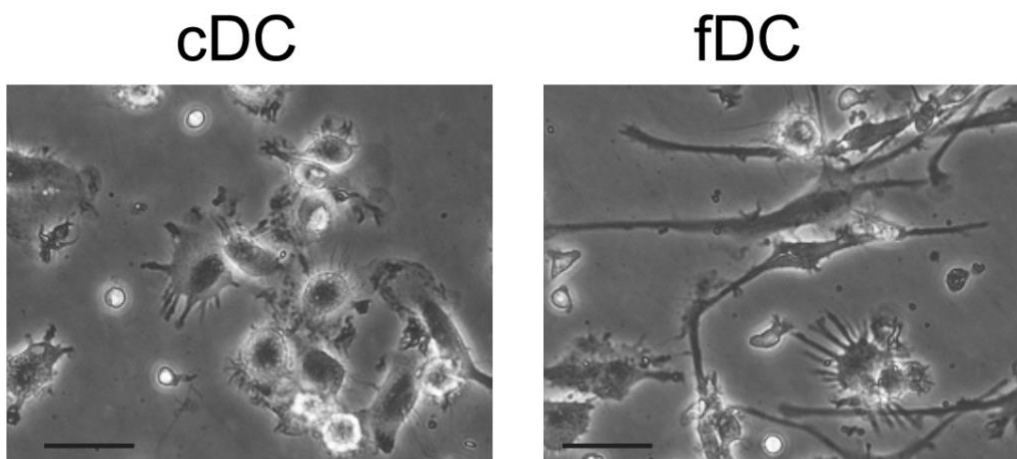
Prvi cilj rada je bio da se ispituju i uporede fenotipska svojstva DC dobijenih iz monocita istog donora, konvencionalnim protokolom i protokolom ubrzane diferencijacije. Monociti su izolovani magnetnim sortiranjem (engl. Magnetic Activated Cell Sorting, MACS) kao negativna frakcija (**Grafikon 5.1.1**), ili na osnovu njihovog adherentnog svojstva, a zatim su kultivisani u medijumu za diferencijaciju DC. Konvencionalni protokol diferencijacije DC (cDC) je uključivao kultivaciju monocita u prisustvu GM-CSF i IL-4 u toku 5 dana, nakon čega je sazrevanje ovih ćelija stimulirano koktelom proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE-2) tokom 48 časova. Za razliku od ovog protokola, protokol ubrzane diferencijacije je podrazumevao kultivaciju monocita tokom 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4, nakon čega su ćelije stimulirane koktelom narednih 48 časova.

Analiza ćelija pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa (**Slika 5.1.1**) i citospin preparata obojenih pomoću MGG metode (**Slika 5.1.2**), je pokazala da su cDC i fDC morfološki različite. Uočeno je da u kulturi fDC, veći procenat ćelija ima vretenast oblik i imaju slabije izražene dendritske nastavke u odnosu na kulturu cDC. Osim toga, veličina ćelija u odnosu na veličinu jedara je bila manja kod ćelija dobijenih ubrzanom protokolom (fDC) u odnosu na cDC.

U cilju procene stepena diferencijacije i sazrevanja dobijenih ćelija, analizirana je ekspresija ključnih markera diferencijacije (CD14, CD1a) i sazrevanja (CD86, CD83, HLA-DR) i migratornog potencijala (CCR7, CCR6) DC. Rezultati reprezentativnih fenotipskih analiza, i objedinjenih podataka za 10 donora su prikazani na **grafikonima 5.1.2. – 5.1.8**. Uočeno je da DC diferencirane ubrzanom protokolom (fDC) imaju značajno veću ispoljenost CD14 monocitnog markera, i manju ekspresiju CD1a, u poređenju sa cDC dobijenim od istog donora. Međutim, treba istaći da je ekspresija CD14 bila značajno manja od ekspresije na prečišćenim monocitima gde je više od 95% ćelija imalo ispoljen CD14 marker, i odsustvo ekspresije CD1a. fDC su ispoljavale statistički značajno viši nivo CD14 i CCR6, kao i značajno niži nivo CD1a, CD86, CD83, CCR7 i HLA-DR u odnosu na cDC.

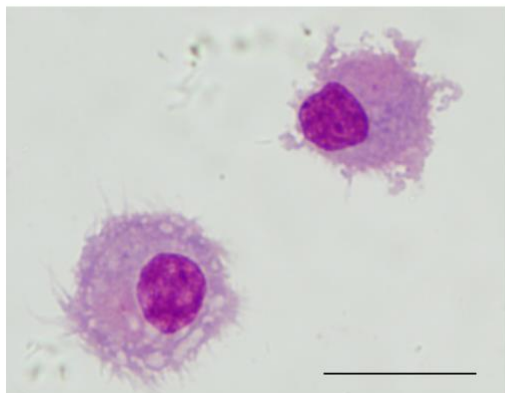


Grafikon 5.1.1. Ekspresija CD14 i CD33 molekula na površini monocita. Monociti su izolovani iz populacije PBMC negativnim MACS, nakon čega je analizirana ekspresija CD14 i CD33 na njihovoj površini. Prikazani su konturni dijagrami iz jednog reprezentativnog eksperimenta.

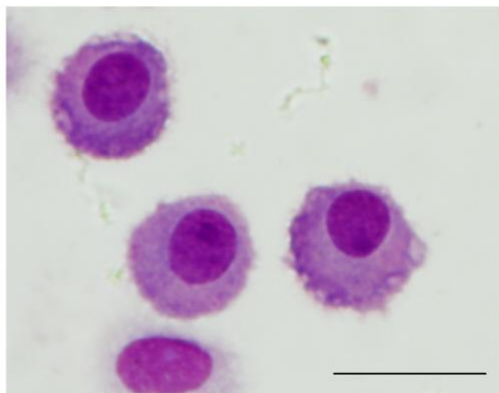


Slika 5.1.1. Morfološka analiza DC dobijenih konvencionalnim i ubrzanim protokolom-analiza fazno kontrastnim mikroskopom. Prikazane su reprezentativne slike cDC i fDC dobijene sedmog, odnosno, trećeg dana kulture, pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa. Skala u donjem levom uglu slika označava 50 μ m.

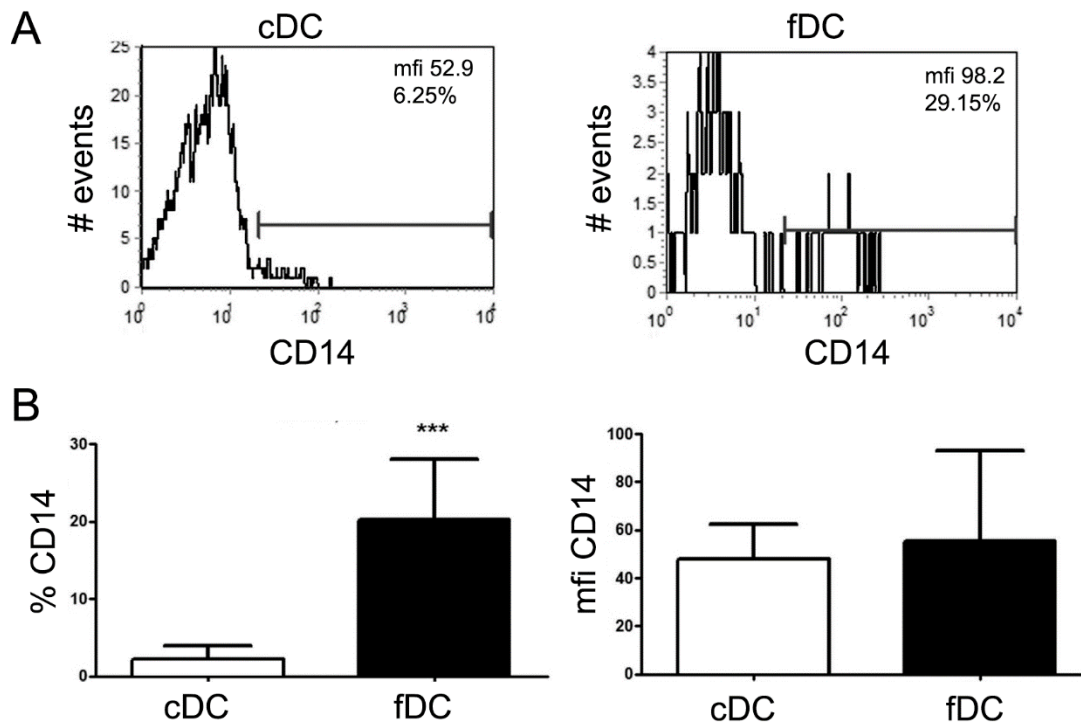
cDC



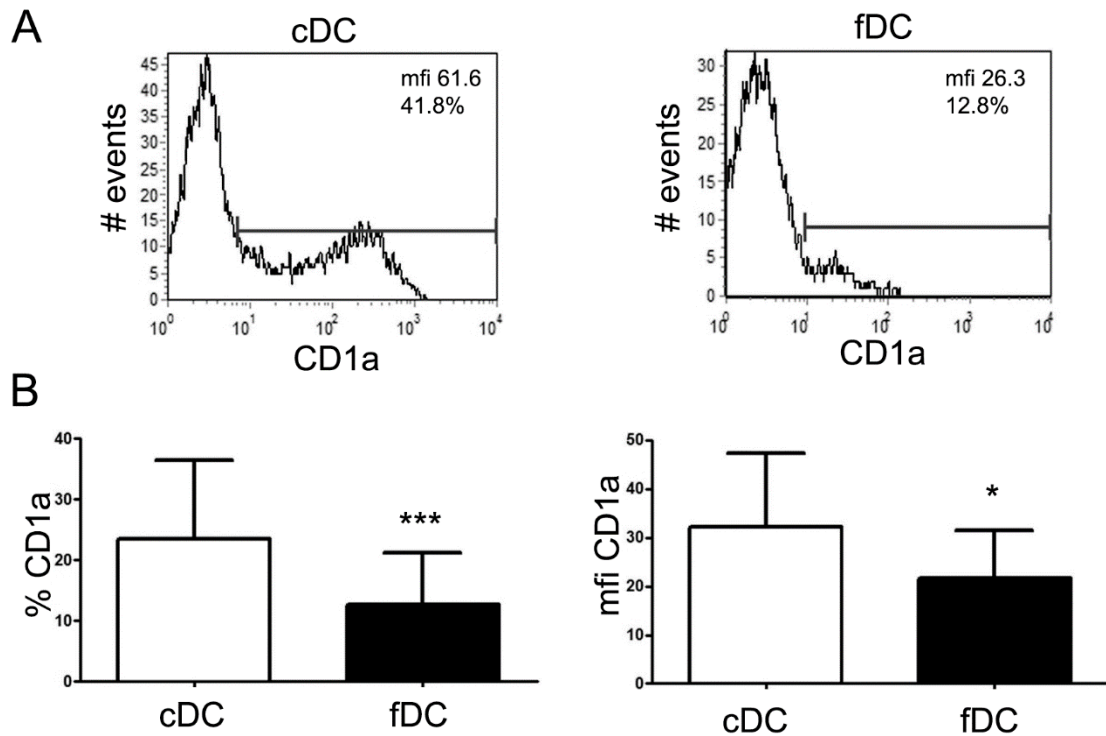
fDC



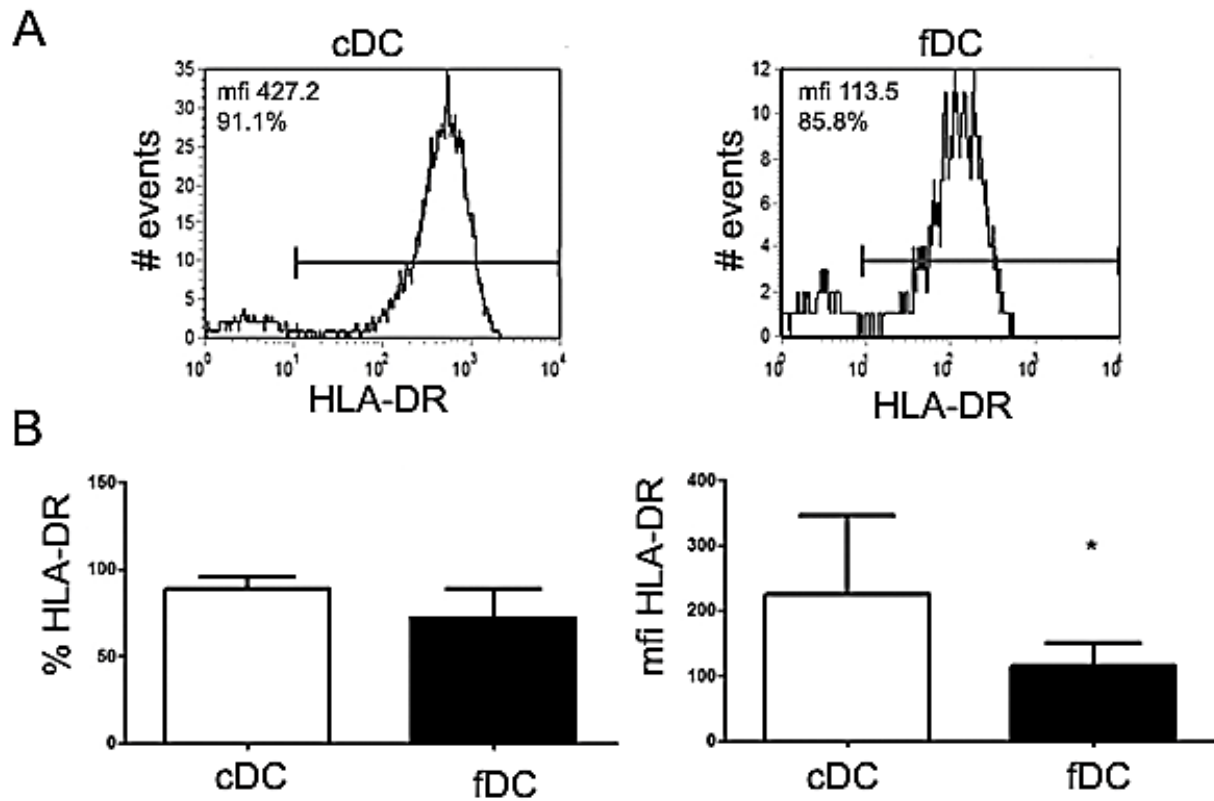
Slika 5.1.2. Morfološki izgled DC dobijenih konvencionalnim i ubrzanim protokolom- analiza citospin preparata obojenih MGG metodom. cDC i fDC poreklom od monocita istog donora su kultivisane sedam, odnosno, tri dana. Čelije su sakupljene i pripremljeni su citospin preparati, koji su zatim obojeni pomoću MGG. Skala u donjem desnom uglu slika označava 50 μm .



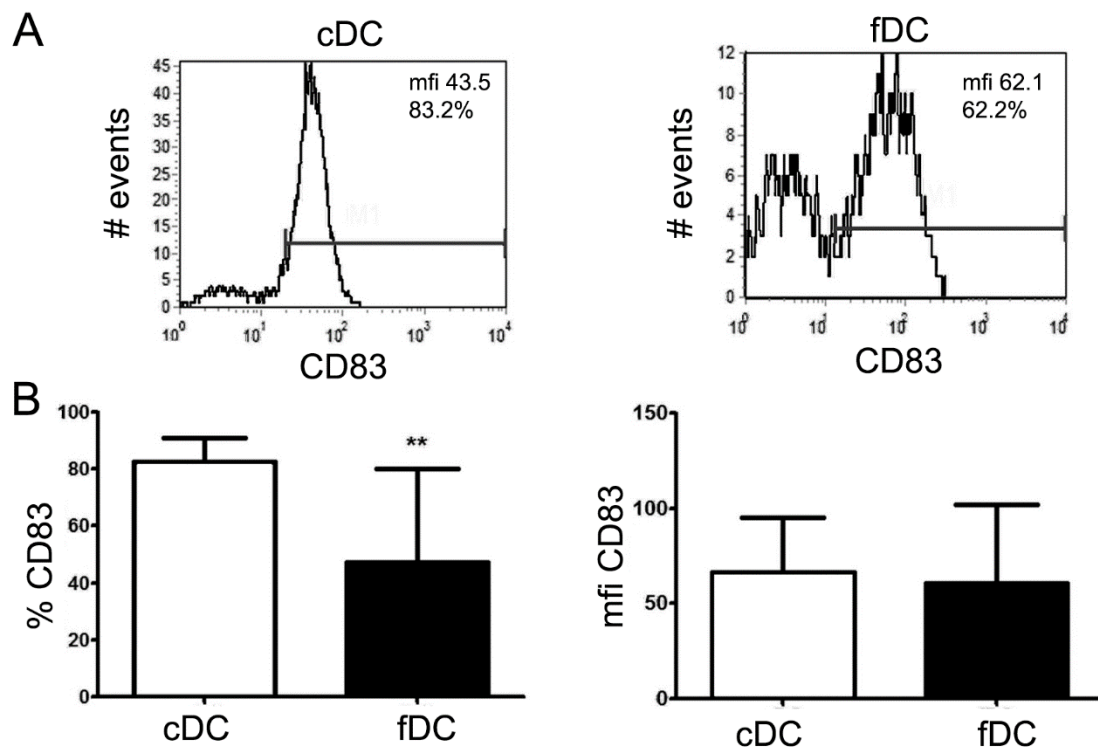
Grafikon 5.1.2. Ekspresija CD14 molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprerentativni histogrami analize površinske ekspresije CD14 na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. *** $p < 0.005$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).



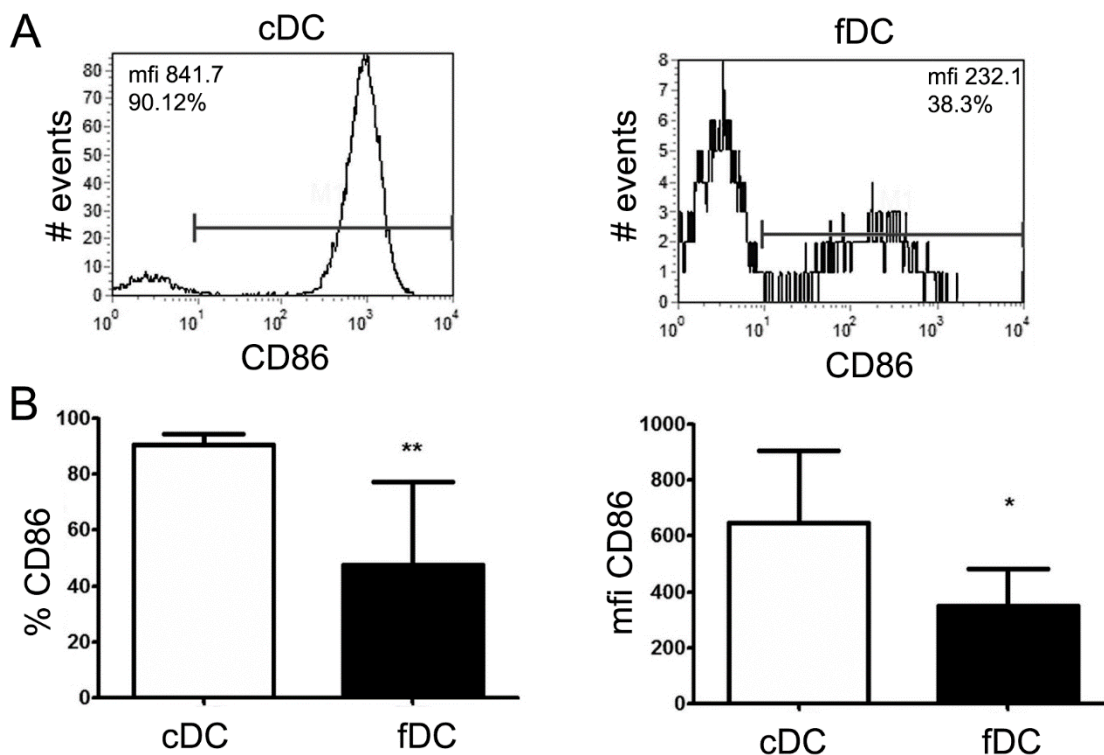
Grafikon 5.1.3. Ekspresija CD1a molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprezentativni histogrami analize površinske ekspresije CD1a na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).



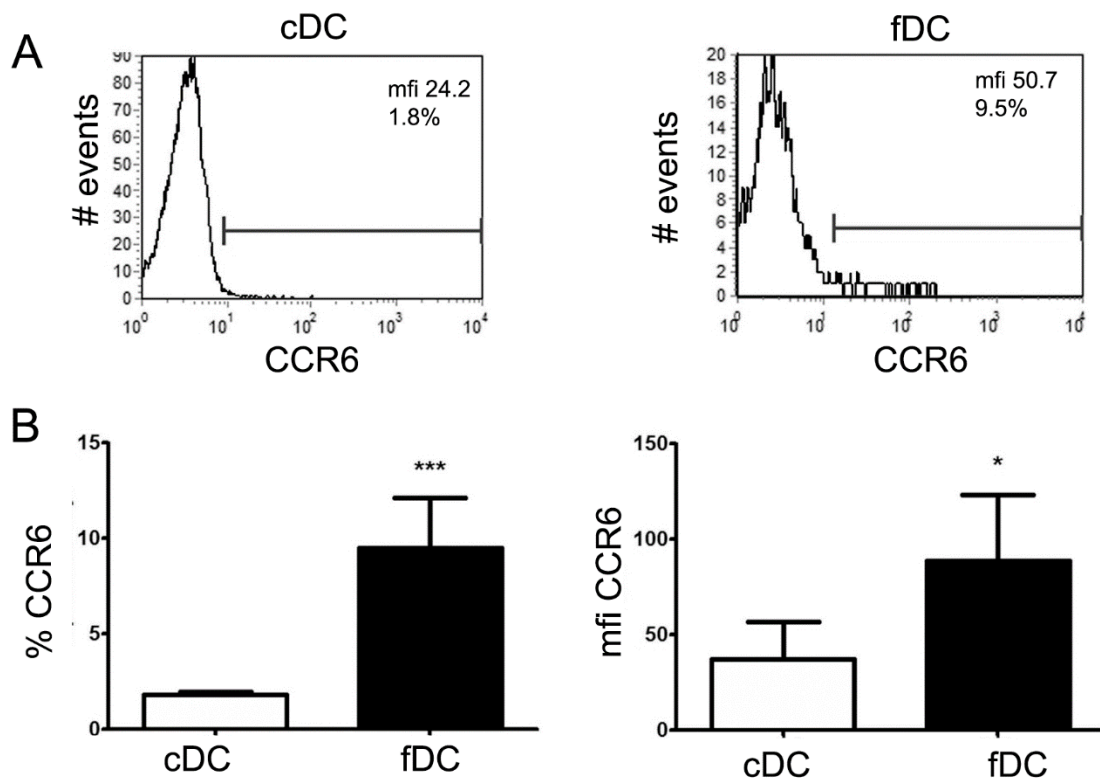
Grafikon 5.1.4. Ekspresija HLA-DR molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprezentativni histogrami analize površinske ekspresije HLA-DR na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).



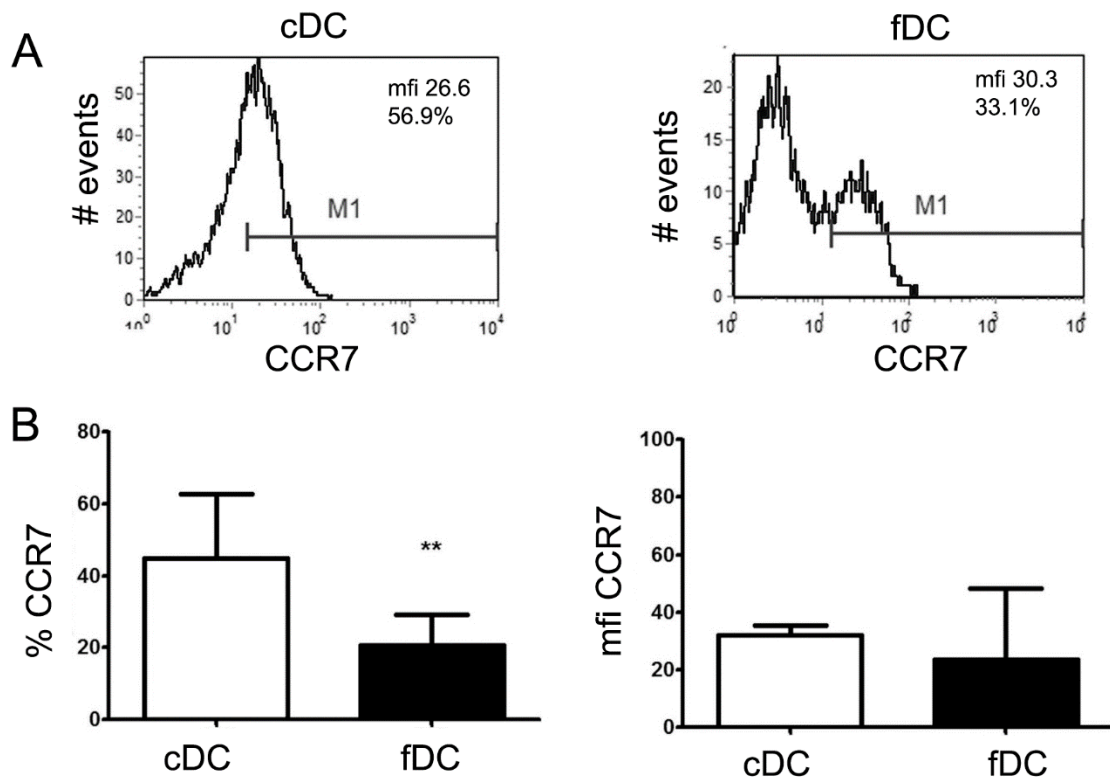
Grafikon 5.1.5. Ekspresija CD83 molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprerentativni histogrami analize površinske ekspresije CD83 na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. ** $p < 0.01$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).



Grafikon 5.1.6. Ekspresija CD86 molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprezentativni histogrami analize površinske ekspresije CD86 na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).



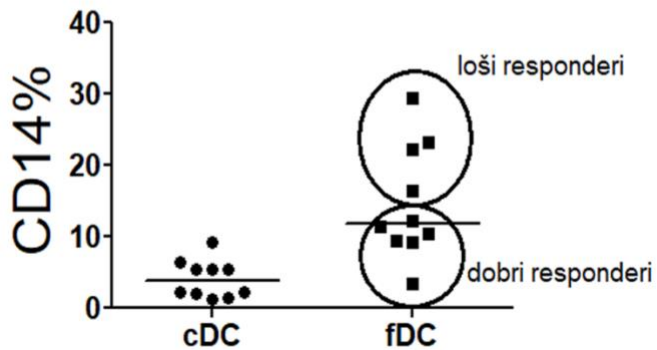
Grafikon 5.1.7. Ekspresija CCR6 molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprerentativni histogrami analize površinske ekspresije CCR6 na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).



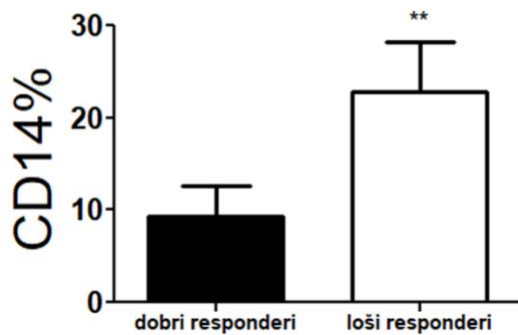
Grafikon 5.1.8. Ekspresija CCR7 molekula na površini cDC i fDC. Monociti su diferencirani u DC po konvencionalnom, odnosno, ubrzanom protokolu diferencijacije, nakon čega je analizirana površinska ekspresija molekula (% pozitivnih ćelija i srednji intenzitet fluorescence-mfi) protočnom citometrijom. A) Reprerentativni histogrami analize površinske ekspresije CCR7 na DC poreklom od istog donora. B) objedinjeni rezultati za svih analiziranih donora (n=10) su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ cDC vs fDC (Wilcoxon-ov parni test).

Analizom ćelija pojedinačnih donora je zapaženo da procenat CD14⁺ ćelija diferenciranih po ubrzanom protokolu varira od 4.0-29.5%, što je verovatno odraz različitog potencijala ćelija ovih donora da se diferenciraju u DC, tj. da smanje ekspresiju CD14 molekula po ubrzanom protokolu diferencijacije u DC. Pri tome su ćelije od istih donora diferencirane po konvencionalnom protokolu skoro kompletno smanjile ekspresiju CD14 (Grafikon 5.1.9 A). Zbog toga se na osnovu ispoljavanja CD14 molekula mogu formirati 2 grupe: 1) donori čije ćelije u postupku ubrzane diferencijacije smanjuju ekspresiji CD14 ispod 15% pozitivnih ćelija – dobri responderi, i 2) donori čije ćelije ne smanjuju ekspresiji CD14 iznad 15% - loši responderi (Grafikon 5.1.9 A, B).

A

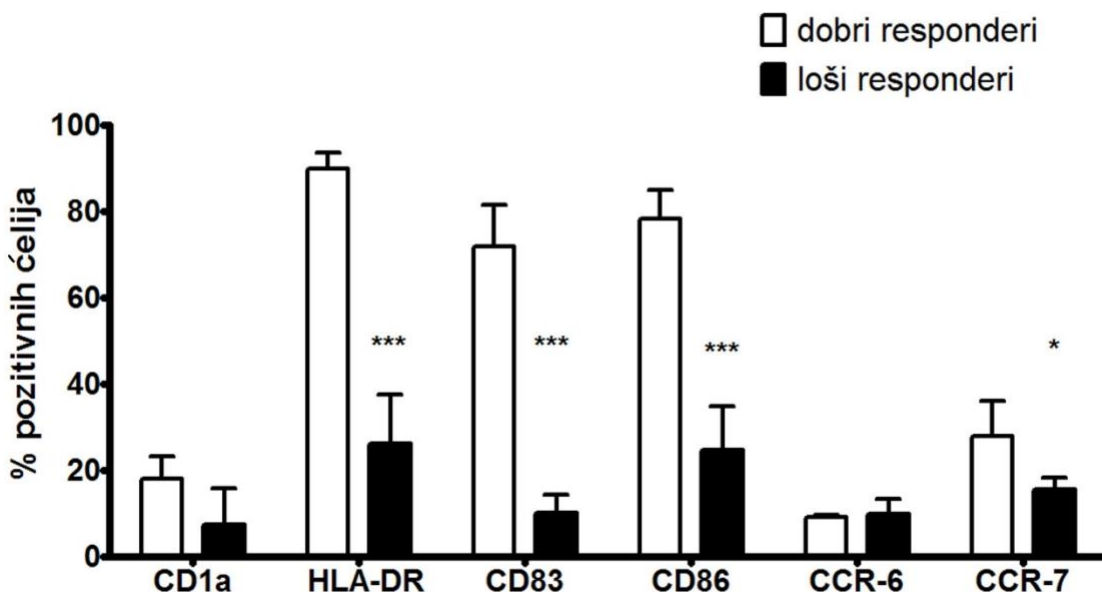


B



Grafikon 5.1.9. Različit stepen ekspresije CD14 molekula na fDC određuje potencijal za diferencijaciju po ubrzanom protokolu. A) DC su dobijene od humanih monocita korišćenjem protokola standardne ili ubrzane diferencijacije, u cilju dobijanja cDC, odnosno, fDC. Ekspresija CD14 molekula je određivana protočnom citometrijom, a na osnovu ekspresije su definisane grupe donora čije fDC imaju manje od 15% CD14⁺ ćelija (dobri responderi, n=6) i više od 15% CD14% ćelija (loši responderi, n=4). B) Grafički je prikazana ekspresija CD14 u okviru grupe dobrih i loših respondera, kao srednja vrednost % pozitivnih ćelija \pm SD. ** = $p < 0.01$ responderi vs neresponderi.

U cilju provere da li nivo ekspresije CD14 na fDC negativno koreliše sa ekspresijom drugih markera diferencijacije i sazrevanja, upoređena je ekspresija markera između grupe dobrih i loših respondera za protokol ubrzane diferencijacije (**Grafikon 5.1.10**). Rezultati ove analize su pokazali da fDC poreklom od donora sa lošim potencijalom za diferencijaciju imaju manju ekspresiju CD86, CD83, HLA-DR i CCR7 u odnosu na donore sa dobrim potencijalom za diferencijaciju, dok nisu uočene razlike u ekspresiji i CD1a i CCR6.



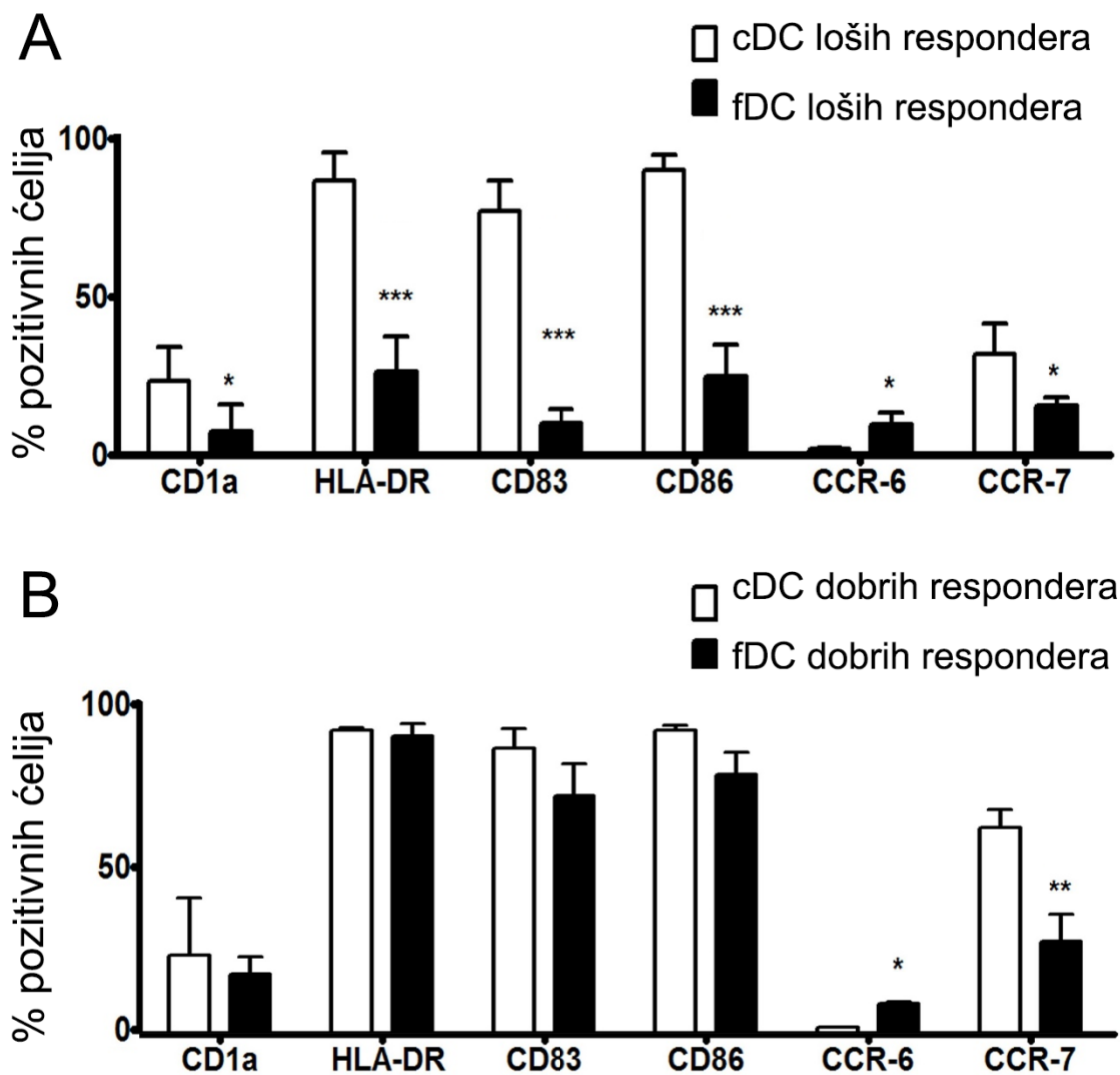
Grafikon 5.1.10. Ekspresija markera na DC dobrih i loših respondera, dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije. DC su dobijene od humanih monocita korišćenjem protokola ubrzane diferencijacije, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Fenotipske karakteristike DC su određivane protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija odgovarajućim antitelima. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost % pozitivnih ćelija \pm SD za n=4 donora (loši responderi) odnosno n= 6 donora (dobri responderi). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$ loši u odnosu na dobre respondere

Imajući u vidu navedene razlike u fenotipskim svojstvima fDC između dobrih i loših respondera, naredni cilj je bio da se analizira i upoređi ekspresija markera na fDC i odgovarajućih cDC u okviru svake grupe donora. Analiza je pokazala da fDC donora sa lošim potencijalom za diferencijaciju imaju značajno manji procenat ćelija pozitivnih za CD1a, HLA-DR, CD83, CD86 i CCR7, a veći procenat CCR6⁺ ćelija, u odnosu na cDC od istih donora (**Grafikon 5.1.11 A**). Sa druge strane, fDC donora sa dobrim potencijalom diferencijacije (ekspresijom CD14<15%) su imale sličan procenat HLA-DR, CD83 i CD86 kao i odgovarajuće cDC, ali je i dalje bio prisutan manji procenat CCR7⁺ ćelija, i veći procenat CCR6⁺ ćelija na fDC u odnosu na cDC istih donora (**Grafikon 5.1.11 B**).

5.2 Povezanost ekspresije aktivacionih markera i produkcije proinflamacijskih citokina od strane monocita, sa potencijalom diferencijacije DC kod različitih donora

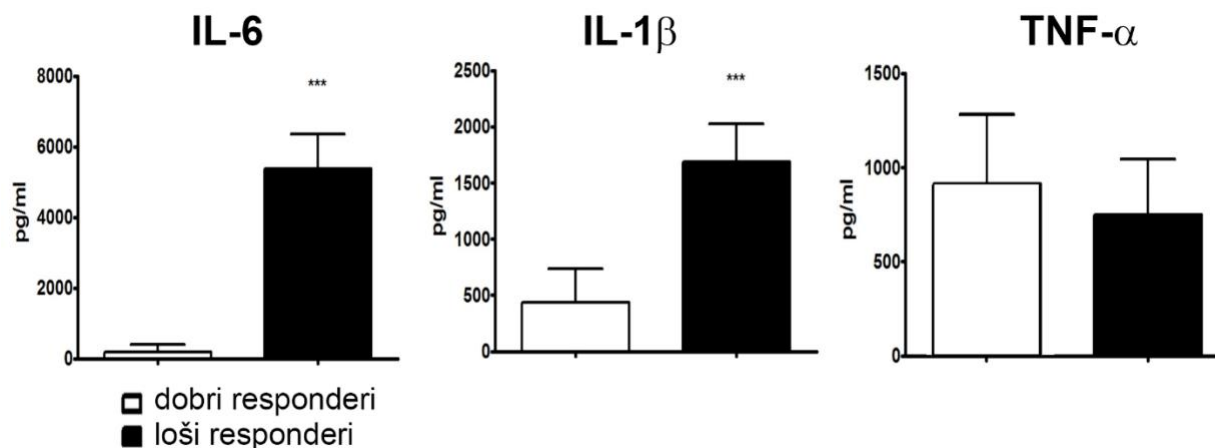
Prethodni rezultati su pokazali da nakon stimulacije sa proinflamacijskim koktelom postoji određen broj respondera koji loše odgovaraju na protokol ubrzane diferencijacije. Obzirom da se kod loših respondera može očekivati dobijanje fDC sa lošim imunogenim osobinama, postoji veliki rizik za primenu ovakvih ćelija u imunoterapiji tumora. Stoga je neophodno predvideti potencijalno loše respondere za ubrzani protokol diferencijacije već nakon 24 časa kultivacije monocita (pre stimulacije sazrevanja), a u cilju prepoznavanja i odvajanja onih respondera za koje je neophodno primeniti konvencionalni protokol za dobijanje imunogenih DC.

Monociti različitih donora imaju različit fenotip i poseduju različit kapacitet za produkciju citokina. Uzimajući u obzir da pojedini citokini mogu imati negativan uticaj na procese diferencijacije monocita u DC, ispitano je kakve su fenotipske i funkcionalne razlike između monocita dobrih i loših respondera na protokol ubrzane diferencijacije. U tom cilju je izmerena produkcija IL-1 β , IL-6, TNF- α , TNF- β i IL-8 u ranoj fazi diferencijacije u DC, 24 časa od njihovog tretmana sa GM-CSF i IL-4. Nivoi dobijenih citokina su zatim upoređivani sa potencijalom različitih donora za diferencijaciju u fDC. Pri tome je kao stimulus za sazrevanje korišćen proinflamacijski koktel (IL-1 β , IL-6, PGE-2 i TNF- α) tokom 48 časova, a kriterijum za segregaciju loših i dobrih respondera je bio stepen smanjenja ekspresije CD14, kao što je već opisano.



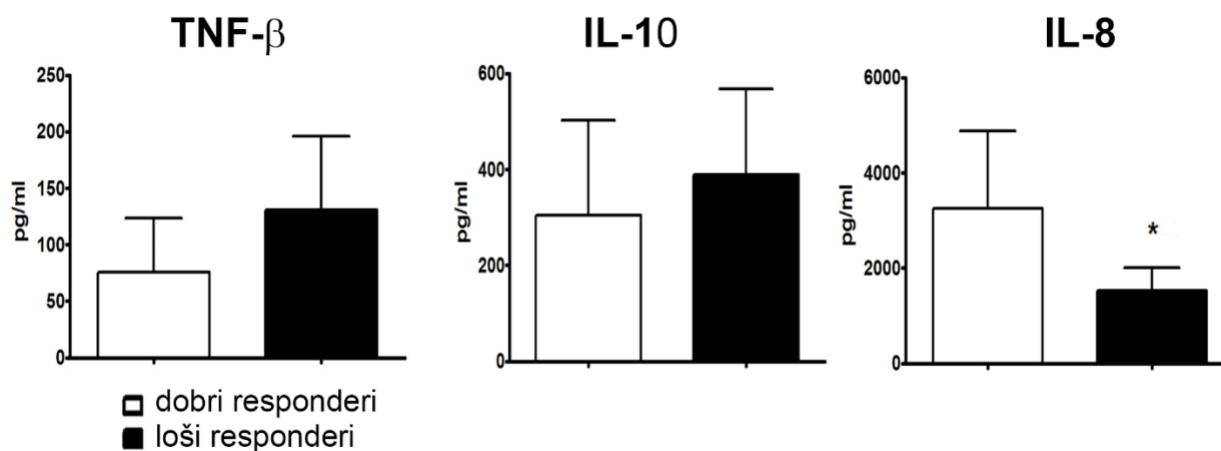
Grafikon 5.2.1. Usporedna analiza ekspresije markera na DC dobrih i loših respondera. DC su dobijene od humanih monocita korišćenjem standardnog ili ubrzanog protokola diferencijacije, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Fenotipske karakteristike DC su određivane protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija odgovarajućim antitelima. A) Analiza ekspresije markera na fDC i cDC u okviru grupe loših respondera (n=4). B) Analiza ekspresije markera fDC i cDC u okviru grupe dobrih respondera (n=6). Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost % pozitivnih ćelija \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,005$ fDC u odnosu odgovarajuće cDC istih donora (Wilcoxon-ov parni test).

Uočeno je da već nakon 24 časa, monociti loših respondera produkuju značajno više IL-6 i IL-1 β , u poređenju sa monocitima dobrih respondera (**Grafikon 5.2.1**). Produkcija TNF- α , IL-10 i TNF- β se nije značajno razlikovala između monocita dobrih i loših respondera, dok je uočeno da monociti loših respondera značajno manje produkuju IL-8 nakon stimulacije sa GM-CSF i IL-4 posle 24 časa (**Grafikon 5.2.2**).



Grafikon 5.2.2. *Produkcija IL-1 β , IL-6 i TNF- α od strane monocita dobrih i loših respondera za protokol ubrzane diferencijacije.* Monociti su kultivisani sa GM-CSF/IL-4 tokom 24 časa, a nivo citokina je određen u supernatantima kultura ELISA testom. fDC dobrih respondera (n=6) i loših respondera (n=4) su određeni nakon dodatne stimulacije sa proinflammacijskim koktelom tokom 48 časova, na osnovu ekspresije CD14. ***p<0.005, ćelije dobrih respondera u odnosu na ćelije loših respondera.

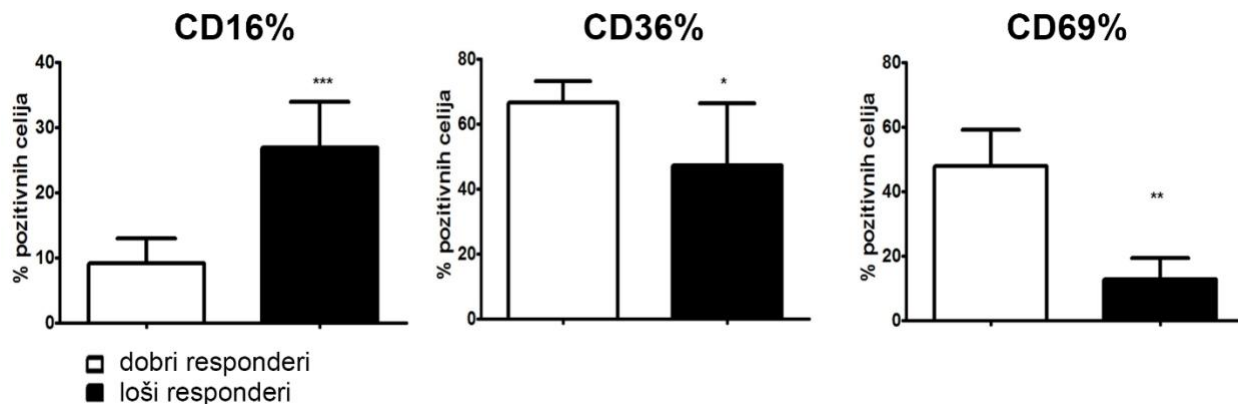
Osim produkcije citokina, ispitana je i ekspresija ključnih aktivacionih markera monocita (CD16, CD36 i CD69) nakon 24 časa kultivacije (**Grafikon 7.2.3**), obzirom da je pokazano da ekspresija ovih markera može biti povezana sa potencijalom monocita za diferencijaciju u makrofage i DC. Uočeno je da monociti dobrih respondera imaju veću ekspresiju CD69 i CD36 u odnosu na monocite loših respondera. Suprotno tome, monociti loših respondera ispoljavali su značajno više CD16, u poređenju sa monocitima dobrih respondera.



Grafikon 5.2.3. *Produkcija TNF-β, IL-10 i IL-8 od strane monocita dobrih i loših respondera za protokol ubrzane diferencijacije.* Monociti su kultivisani sa GM-CSF/IL-4 tokom 24 časa, a nivo citokina je određen u supernatantima kultura ELISA testom. fDC dobrih respondera (n=6) i loših respondera (n=4) su utvrđeni nakon dodatne stimulacije sa proinflamacijskim koktelom tokom 48 časova, na osnovu ekspresije CD14. *p<0.05, ćelije dobrih respondera u odnosu na ćelije loših respondera.

U narednom koraku je na osnovu prethodnih rezultata utvrđeno kako nivo ekspresije membranskih markera monocita korelira sa produkcijom proinflamacijskih citokina u ranoj fazi diferencijacije monocita (Tabela 5.2.1- Tabela 5.2.2). Uočeno je da povećana ekspresija CD16 molekula pozitivno korelira sa većom produkcijom IL-1β i IL-6, a negativno sa produkcijom IL-8 u ranoj fazi diferencijacije DC. Sa druge strane ekspresija CD36 i CD69 je negativno korelirala sa produkcijom IL-1β i IL-6.

Na osnovu rezultata, može se pretpostaviti da će monociti sa visokom ekspresijom CD69, CD36 i niskom ekspresijom CD16, koji u kulturi sa GM-CSF i IL-4 produkuju niske nivoe IL-6 i IL-1β, imati dobar potencijal za diferencijaciju u DC. Sa druge strane, monociti sa niskom ekspresijom CD69, CD36, i visokom ekspresijom CD16, koji pored toga produkuju visok nivo IL-6 i IL-1β, će imati loš potencijal za diferencijaciju u DC po ubrzanom protokolu, i za takve donore je neophodno primeniti konvencionalni protokol diferencijacije.



Grafikon 5.2.4. Ekspresija CD16, CD36 i CD69 od strane monocita dobrih i loših respondera za protokol ubrzane diferencijacije. Monociti su kultivisani sa GM-CSF/IL-4 tokom 24 časa, a zatim je analizirana ekspresija površinskih markera protočnom citometrijom. fDC dobrih respondera (n=6) i loših respondera (n=4) su utvrđeni nakon dodatne stimulacije sa proinflamacijskim koktelom tokom 48 časova, na osnovu ekspresije CD14. * ćelije dobrih respondera u odnosu na ćelije loših respondera.

Tabela 5.2.1. Korelacija ekspresije CD16 na monocitima sa produkcijom citokina u ranoj fazi diferencijacije DC

marker:citokin	koeficijent korelacije	p - značajnost	korelacija (p<0.1)
CD16:TNF- α	-0.315	0.271	Odsustvo korelacija
CD16:TNF- β	0.355	0.217	Odsustvo korelacije
CD16:IL-1- β	0.645	0.057	Pozitivna korelacija
CD16:IL-6	0.785	0.018	Pozitivna korelacija
CD16:IL-8	-0.584	0.084	Negativna korelacija
CD16:IL-10	0.210	0.326	Odsustvo korelacije

Ekspresija CD16 na monocitima 10 donora (6-dobrih respondera i 4-loša respondera), kultivisanih 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4 je korelisana sa nivoom produkovanih citokina. Koeficijent korelacije je određen Spearman-ovim testom, a za kriterijum značajnosti je odabrana jednostrana značajnost, $p < 0.1$.

Tabela 5.2.2. Korelacija ekspresije CD36 na monocitima sa produkcijom citokina u ranoj fazi diferencijacije DC

marker:citokin	koeficijent korelacije	p - značajnost	korelacija (p<0.1)
CD36:TNF-α	0.270	0.250	Odsustvo korelacije
CD36:TNF-β	-0.189	0.343	Odsustvo korelacije
CD36:IL-1-β	-0.884	0.004	Negativna korelacija
CD36:IL-6	0.813	0.013	Negativna korelacija
CD36:IL-8	-0.064	0.446	Odsustvo korelacija
CD16:IL-10	0.841	0.009	Negativna korelacije

Ekspresija CD36 na monocitima 10 donora (6-dobrih respondera i 4-loša respondera), kultivisanih 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4 je korelisana sa nivoom produkovanih citokina. Koeficijent korelacije je određen Spearman-ovim testom, a za kriterijum značajnosti je odabrana jednostrana značajnost, $p < 0.1$.

Tabela 5.2.3. Korelacija ekspresije CD69 na monocitima sa produkcijom citokina u ranoj fazi diferencijacije DC

marker:citokin	koeficijent korelacije	p - značajnost	korelacija (p<0.1)
CD69:TNF-α	0.516	0.118	Odsustvo korelacije
CD69:TNF-β	-0.354	0.218	Odsustvo korelacije
CD69:IL-1-β	-0.606	0.074	Negativna korelacija
CD69:IL-6	-0.689	0.043	Negativna korelacija
CD69:IL-8	-0.050	0.458	Odsustvo korelacija
CD69:IL-10	0.339	0.228	Odsustvo korelacije

Ekspresija CD69 na monocitima 10 donora (6-dobrih respondera i 4-loša respondera), kultivisanih 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4 je korelisana sa nivoom produkovanih citokina. Koeficijent korelacije je određen Spearman-ovim testom, a za kriterijum značajnosti je odabrana jednostrana značajnost, $p < 0.1$.

Ova pretpostavka je proverena i na osnovu korelacije ekspresije membranskih markera na monocitima sa markerima fDC dobijenih pomoću proinflamacijskog koktela (**Tabela 5.2.4-5.2.6**). Ovakvom analizom je zapaženo da ekspresija CD16 na monocitima pozitivno korelira sa ekspresijom CD14 na fDC, a negativno sa ekspresijom CD1a, CD83, CD86, HLA-DR i CCR7 na ovim ćelijama. Suprotno tome, uočena je negativna korelacija ekspresije CD36 molekula na monocitima sa ekspresijom CD14 na fDC, a pozitivna za ekspresiju CD1a, CD83, CD86, HLA-DR i CCR7 na fDC. Ekspresija CD69 na monocitima je negativno korelisala sa ekspresijom CD14, a pozitivno sa ekspresijom HLA-DR i CD86 na fDC, dok sa ostalim markerima fDC nije uočena značajna korelacija.

Tabela 5.2.4. Korelacija ekspresije CD16 na monocitima sa markerima ispoljenim na fDC nakon 48-časovne stimulacije proinflamacijskim koktelom.

marker: marker	koeficijent korelacije	p - značajnost	korelacija (p<0.1)
CD16: CD14	0.833	0.01	Pozitivna korelacija
CD16: CD1a	-0.733	0.03	Negativna korelacija
CD16: CD83	-0.897	0.003	Negativna korelacija
CD16: CD86	-0.958	0.001	Negativna korelacija
CD16: HLA-DR	-0.931	0.001	Negativna korelacija
CD16: CCR7	-0.805	0.014	Negativna korelacija
CD16: CCR6	0.087	0.426	Odsustvo korelacije

Ekspresija CD16 na monocitima 10 donora (6-dobrih respondera i 4-loša respondera), kultivisanih 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4 je korelisana na nivoom ekspresije markera na fDC dobijenim nakon stimulacije proinflamacijskim koktelom. Koeficijent korelacije je određen Sperman-ovim testom, a za kriterijum značajnosti je odabrana jednostrana značajnost, $p < 0.1$.

Tabela 5.2.5. Korelacija ekspresije CD36 na monocitima sa markerima ispoljenim na fDC nakon 48-časovne stimulacije proinflamacijskim koktelom.

marker: marker	koeficijent korelacije	p - značajnost	korelacija (p<0.1)
CD36: CD14	-0.454	0.15	Odsustvo korelacije
CD36: CD1a	0.824	0.011	Pozitivna korelacija
CD36: CD83	0.785	0.018	Pozitivna korelacija
CD36: CD86	0.856	0.007	Pozitivna korelacija
CD36: HLA-DR	0.834	0.001	Pozitivna korelacija
CD36: CCR7	0.554	0.098	Pozitivna korelacija
CD36: CCR6	0.449	0.156	Odsustvo korelacije

Ekspresija CD36 na monocitima 10 donora (6-dobrih respondera i 4-loša respondera), kultivisanih 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4 je korelisana na nivoom ekspresije markera na fDC dobijenim nakon stimulacije proinflamacijskim koktelom. Koeficijent korelacije je određen Sperman-ovim testom, a za kriterijum značajnosti je odabrana jednostrana značajnost, $p < 0.1$.

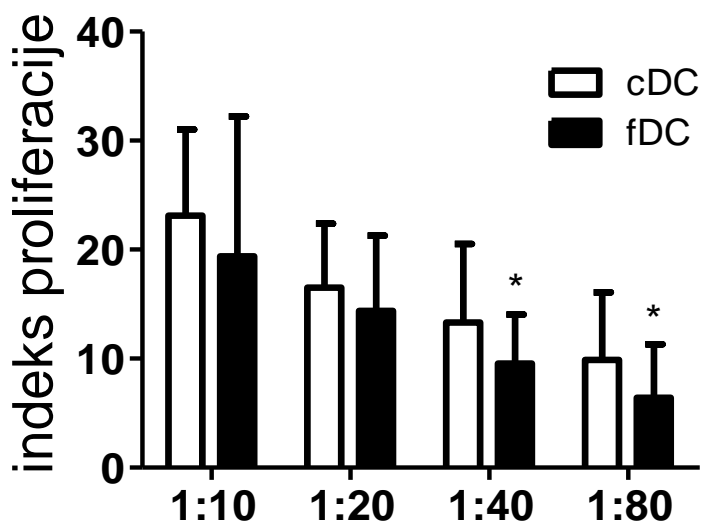
Tabela 5.2.6. Korelacija ekspresije CD69 na monocitima sa markerima ispoljenim na fDC nakon 48-časovne stimulacije proinflamacijskim koktelom.

marker: marker	koeficijent korelacije	p - značajnost	korelacija (p<0.1)
CD69: CD14	-0.680	0.015	Negativna korelacije
CD69: CD1a	0.523	0.114	Odsustvo korelacije
CD69: CD83	0.382	0.138	Odsustvo korelacije
CD69: CD86	0.820	0.012	Pozitivna korelacija
CD69: HLA-DR	0.446	0.097	Pozitivna korelacija
CD69: CCR7	0.100	0.398	Odsustvo korelacije
CD69: CCR6	-0.123	0.396	Odsustvo korelacije

Ekspresija CD69 na monocitima 10 donora (6-dobrih respondera i 4-loša respondera), kultivisanih 24 časa u prisustvu GM-CSF i IL-4 je korelisana na nivoom ekspresije markera na fDC dobijenim nakon stimulacije proinflamacijskim koktelom. Koeficijent korelacije je određen Sperman-ovim testom, a za kriterijum značajnosti je odabrana jednostrana značajnost, $p < 0.1$.

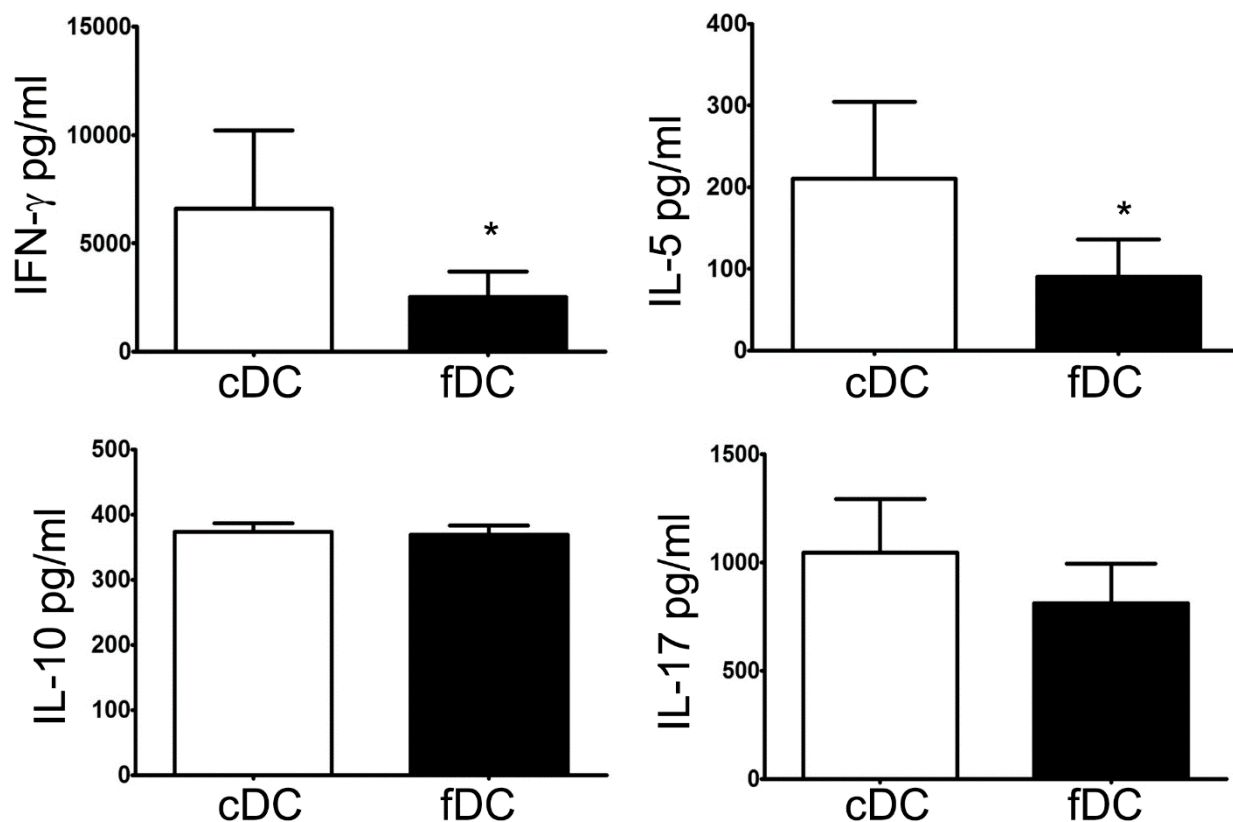
5.3 Funkcionalna svojstva DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije korišćenjem proinflamacijskog koktela

Ključna funkcija DC je aktivacija i stimulacija proliferacije naivnih antigen specifičnih T limfocita. Osim toga, produkcijom različitih citokina DC regulišu diferencijaciju naivnih T limfocita u efektorske Th i CTL, što se označava kao polarizacija T ćelijskog odgovora. Jedan od standardnih testova za određivanje kapaciteta DC za stimulaciju proliferacije T ćelija i polarizaciju T ćelijskog odgovora je test alogene stimulacije, koji se zasniva na kapacitetu 15-20% naivnih T limfocita da prepoznaju alogeni MHC u kompleksu sa peptidima, kao sopstveni MHC u kompleksu sa stranim peptidom. Na osnovu ovoga, sledeći cilj istraživanja bio da se uporedi alostimulacijski potencijal DC dobijenih standardnim i ubrzanim protokolom diferencijacije i sazrevanja u prisustvu proinflamacijskog koktela citokina. U tom cilju su DC ko-kultivisane sa magnetno prečišćenim alogenim CD4⁺ T limfocitima u različitim odnosima (1:10 - 1:80) u toku 5 dana, a proliferacija je određena analizom inkorporacije 3H- timidina, kao što je opisano u poglavlju Materijal i Metode. Objedinjeni rezultati dobijeni iz 10 različitih kokultura DC/T ćelija su prikazani na **Grafikonu 5.3.1**. Uočeno je da fDC slabije stimulišu proliferaciju alogenih T ćelija u odnosu na cDC, a statistički značajna razlika je uočena u manjim odnosima DC i T ćelija (1:20, i 1:80), dok za veće odnose DC i T ćelija nije bilo statistički značajne razlike.



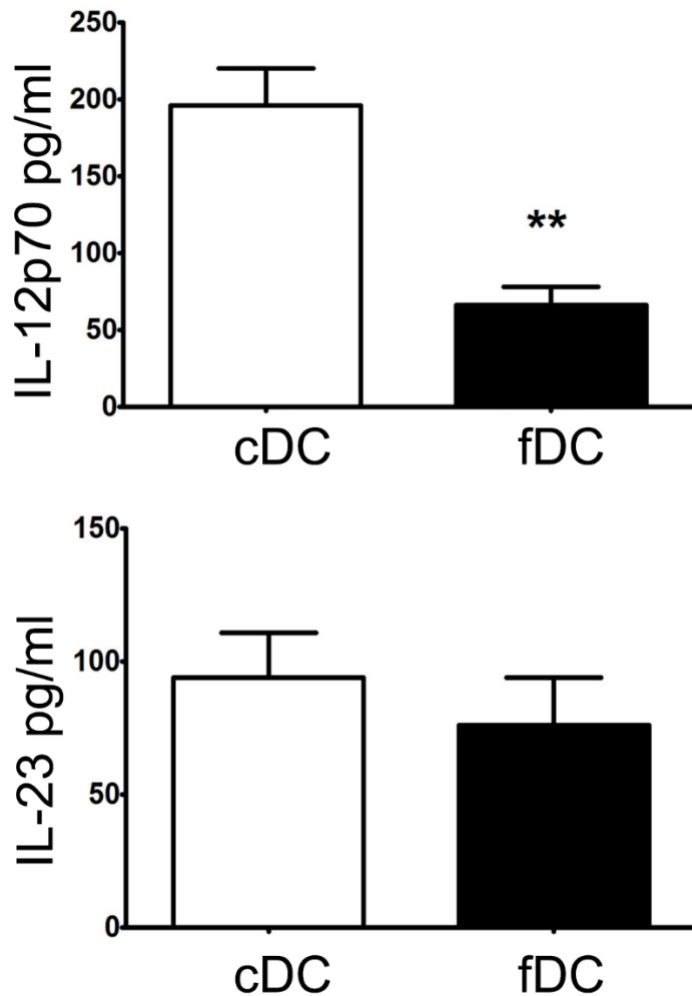
Grafikon 5.3.1. Alostimulacijska sposobnost fDC i cDC u kokulturi sa $CD4^+T$ ćelijama. DC diferencirane korišćenjem standardnog ili ubrzanog protokola diferencijacije, su kokultivisane sa prečišćenim alogenim $CD4^+T$ ćelijama (1×10^5 /otvoru ploče sa 96 mesta) tokom 5 dana u navedenim odnosima DC i T ćelija (1:10-1:80, broj DC u odnosu na T). Kulture su tretirane 3H-timidinom poslednjih 18 časova. Inkorporacija radioaktivnog timidina je određena β -scintilatnim brojačem. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti indeksa proliferacije \pm SD iz 10 kokultura DC od različitih donora i alogneih T ćelija. Indeks proliferacije iz svake kokulture je određen na osnovu bazalne proliferacije T ćelija u odsustvu DC. * $p < 0.05$ fDC u odnosu cDC istih donora (Wilcoxon-ov parni test).

U cilju određivanja Th polarizacijskog odgovora indukovanog od strane fDC i cDC u kulturi sa pomoćničkim $CD4^+$ T ćelijama, izmerena je količina citokina koji su karakteristični za Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5), Th17 (IL-17) i regulatorne populacije T ćelija (IL-10) (Grafikon 7.3.2). Uočeno je da fDC indukuju značajno manju produkciju IFN- γ i IL-5, kao i nešto manju produkciju IL-17, dok produkcija IL-10 nije značajnije modulirana u poređenju sa cDC istih donora.



Grafikon 5.3.2. *Th* polarizacijska sposobnost fDC i cDC u kokulturi sa $CD4^+T$ ćelijama. DC diferencirane korišćenjem standardnog ili ubrzanog protokola diferencijacije, su kokultivisane sa prečišćenim alogenim $CD4^+T$ ćelijama (1×10^5 /otvoru ploče sa 96 mesta) tokom 5 dana u odnosu 1:20, DC:T. Kulture su tretirane sam PMA/Ca jonoforom poslednjih 4 časa, a nivo citokina u supernatantu bez ćelija je određen specifičnim ELISA testovima. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracije (pg/ml normalizovanih na 1×10^5 ćelija \pm SD iz 10 kokultura DC od različitih donora i alogneih T ćelija. * $p < 0.05$ fDC u odnosu cDC istih donora (Wilcoxon-ov parni test).

Ovi rezultati su bili u korelaciji sa smanjenim kapacitetom fDC da produkuju IL-12p70 nakon 48-časovne stimulacije proinflamacijskim koktelom u odnosu na cDC od istih donora. Takođe, fDC su slabije produkovale IL-23 nakon stimulacije, ali nije uočena statistički značajna razlika u poređenju sa odgovarajućim cDC (Grafikon 5.3.3).



Grafikon 5.3.3. *Produkcija IL-12p70 i IL-23 od strane fDC i cDC.* Supernatanti DC diferenciranih korišćenjem standardnog ili ubrzanog protokola diferencijacije su sakupljeni 48 časova nakon stimulacije proinflamacijskim koktelom, i nivo citokina određen je specifičnim ELISA testom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracije (pg/ml normalizovanih na 1×10^6 ćelija \pm SD iz 10 kokultura DC od različitih donora. ** $p < 0.01$ fDC u odnosu cDC istih donora (Wilcoxon-ov parni test).

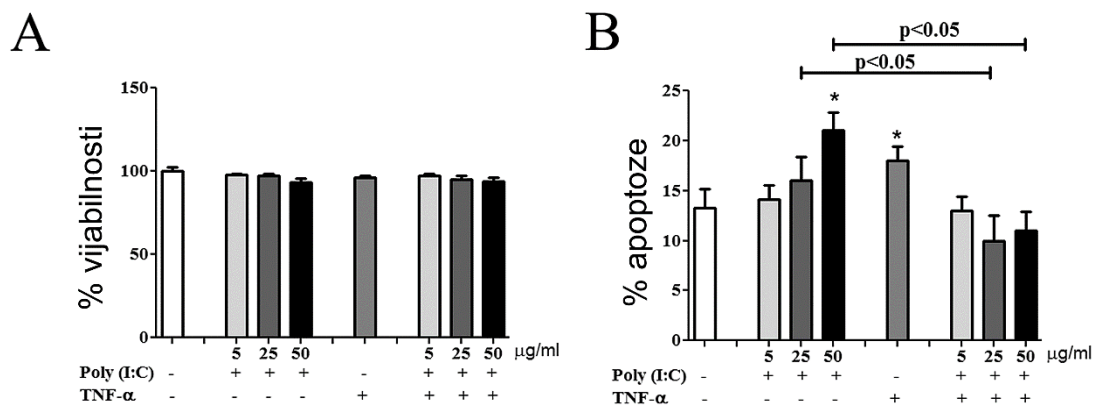
U zaključku se može istaći da u odnosu na konvencionalni protokol diferencijacije, monociti većine donora nakon diferencijacije po ubrzanom protokolu imaju slabiji kapacitet za sazrevanje nakon stimulacije proinflamacijskim koktelom, slabije indukuju proliferaciju T ćelija i njihovu diferencijacije u Th1 ćelije.

5.4 Vijabilnost i Th1 polarišuća svojstva DC dobijenih stimulacijom sa Poly (I:C) i TNF- α

Literaturni podaci ukazuju na to da proinflamacijski koktel ne stimulira značajnu produkciju IL-12 od strane DC, i sledstveno tome Th1 imunski odgovor (Palucka i Banchereau, 2013). Za TLR3 agonist, Poly (I:C), je pokazano da dovodi do snažne indukcije Th1 i Th17 polarišućih svojstava kod DC (Dzopalic, Rajkovic, Dragicevic, i Colic, 2012; Verdijk i sar., 1999). Zbog toga je sledeći cilj bio da se ispita da li korišćenje snažnog Poly (I:C) umesto proinflamacijskog koktela, može poboljšati protokol ubrzane diferencijacije u imunogene fDC, pogotovo kod donora koji imaju slabiji potencijal za diferencijaciju po ovom protokolu (loši responderi).

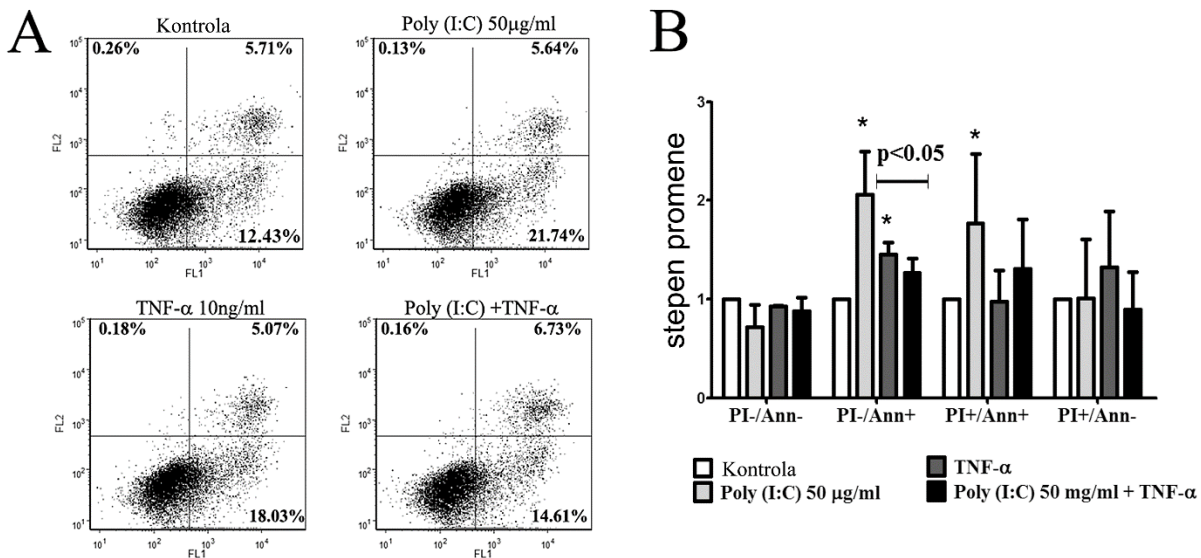
Međutim, pojedini podaci ukazuju da poly (I:C), osim stimulacije Th1 polarišućih svojstava DC, indukuje i njihovu apoptozu, tako što povećava ekspresiju pro-apoptotskih proteina kao što je BAK (engl. Bcl-2 homolog antagonist/killer) (Lehner i sar., 2012). Prethodna istraživanja su pokazala da proapoptotski efekat Poly (I:C) na DC antagonizuje aktivacija receptora TNF superfamilije, kao što su CD40 ili TNFR. Međutim nije potpuno poznato kako TNF- α utiče na Th1 polarišuća svojstva DC indukovana sa Poly (I:C). Zbog toga je prvo ispitivan dozno zavisni efekat Poly (I:C) na vijabilnost DC i njihova funkcionalna svojstva, pogotovo Th1 polarišuća svojstva, kao i to kako TNF- α utiče na funkcije DC modulirane sa Poly (I:C). Za ispitivanja su korišćene DC diferencirane od monocita periferne krvi po konvencionalnom protokolu (cDC), nakon čega su ćelije stimulirane sa Poly (I:C) (5, 25, 50 μ g/ml), i / ili TNF- α (10ng/ml) tokom 48 časova.

Nakon stimulacije cDC sa Poly (I:C) i/ili TNF- α je uočeno da se procenat ćelija sa permeabilizovanom membranom (nevijabilne, primarno nekrotične i sekundarno apoptotične ćelije) ne menja značajno u odnosu na nestimulisane DC (**Grafikon 5.4.1 A**). Na osnovu merenja procenta ćelija sa hipodiploidnom količinom DNK (kasno apoptotskih ćelija) je uočeno da najveće doze Poly (I:C) (50 μ g/ml) indukuju značajno povećanje apoptoze. TNF- α je takođe indukovao povećanje apoptoze u DC. Međutim, procenat apoptotskih cDC tretiranih kombinacijom Poly (I:C) i TNF- α je bio značajno manji u poređenju sa ćelijama tretiranim pojedinačnim agensima (**Grafikon 5.4.1 B**).



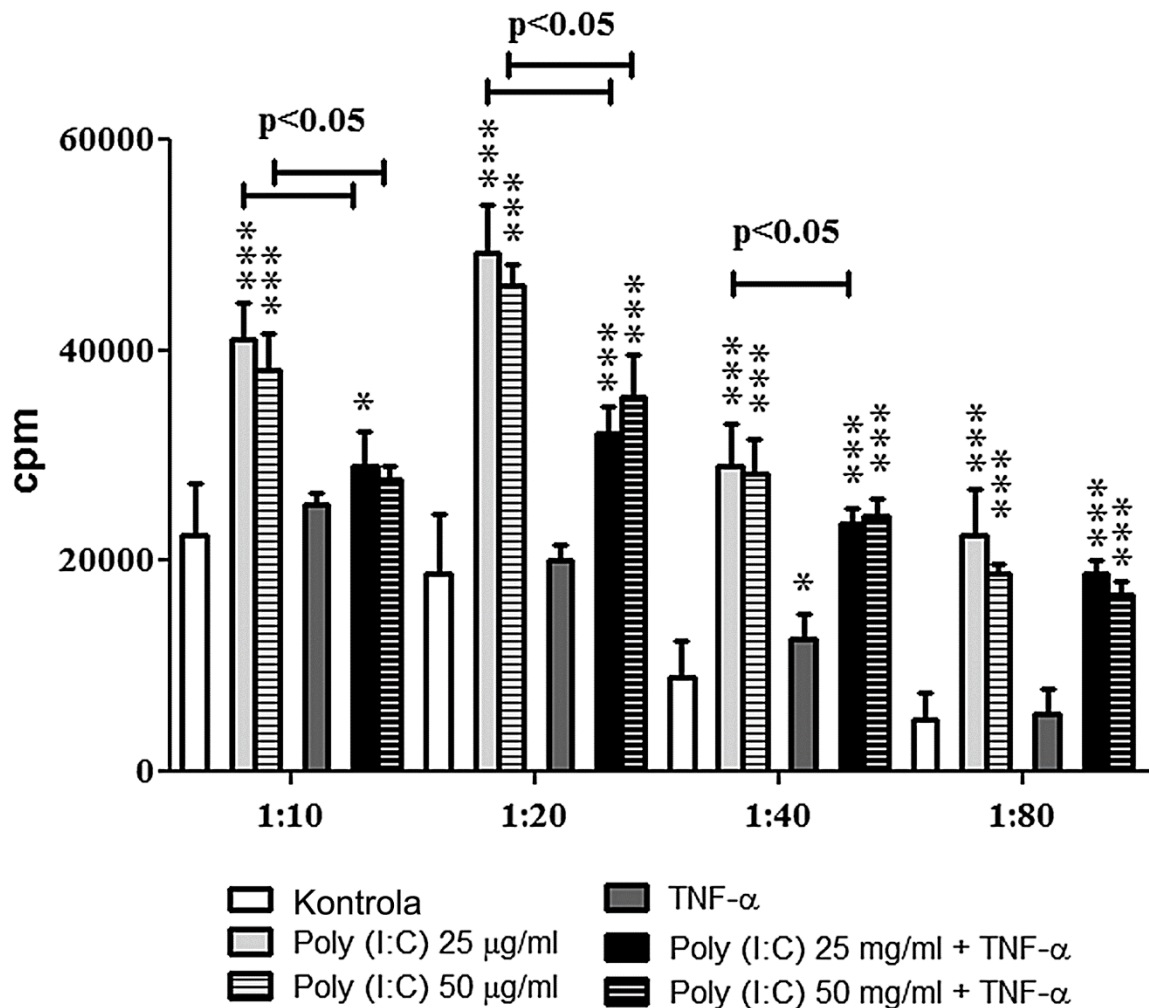
Grafikon 5.4.1. Efekat Poly (I:C), TNF- α i njihove kombinacije na vijabilnost i apoptozu cDC. Nezrele DC su dobijene u prisustvu GM-CSF/IL-4 a zatim stimulisane različitim dozama Poly (I:C), TNF- α (10ng/ml) ili njihovom kombinacijom 48 časova. A) Vijabilnost je određena nakon 48 časova bojenjem ćelija sa PI bez permeabilizacije, a rezultati su predstavljeni kao procenat vijabilnosti u odnosu kontrolu (100%). B) Apoptoza DC je određena bojenjem ćelija sa PI u hipotonom, permeabilizirajućem puferu, nakon čega je analiziran procenat ćelija sa hipodiploidnom količinom DNK. Rezultati pod A i B su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD iz 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ u odnosu na nestimulisane cDC, ili kako je naznačeno (Wilcoxon-ov parni test).

U cilju provere rezultata dobijenih posle 48 časova stimulacije sa Poly (I:C) i TNF- α analizom hipodiploidnih ćelija (kasno apoptotskih ćelija), analiza apoptoze stimulisanih DC je urađena i posle 24 časa, i to bojenjem ćelija sa Aneksin-V i PI koji omogućavaju detekciju ranih i kasnih stadijuma apoptoze. Ova analiza je takođe pokazala da Poly (I:C) u visokoj dozi (50 μ g/ml) značajno povećava procenat cDC u ranoj I fazi apoptoze (**Grafikon 7.4.2**). Iako je uočeno da sâm TNF- α povećava procenat cDC u ranoj apoptozi (do 1.6 puta), ovaj citokin značajno je inhibirao pojavu ranih događaja u apoptozi koje kod cDC izaziva Poly (I:C).



Grafikon 5.4.2. Efekat Poly (I:C), TNF- α i njihove kombinacije na apoptozu cDC. Nezrele DC su dobijene u prisustvu GM-CSF/IL-4 a zatim stimulisane različitim dozama Poly (I:C), TNF- α (10ng/ml) ili njihovom kombinacijom 24 časa. Apoptoza DC je određena nakon bojenja ćelija sa Aneksin-V (osa FL1) i PI (osa FL2) na protočnom citometru. A) Predstavljena je analiza apoptoze iz jednog eksperimenta a B) objedinjeni podaci iz 3 nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednje vrednosti iz svakog kvadranta \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na odgovaraće nestimulisane DC ili kako je naznačeno.

U kokulturama sa prečišćenim alogenim CD4⁺ T limfocitima je pokazano da male doze Poly (I:C) (5 μ g/ml) ne stimulišu značajno alostimulacijski kapacitet cDC, dok ga koncentracije 25 μ g/ml i 50 μ g/ml značajno potenciraju (Grafikon 5.4.3). cDC tretirane sa TNF- α izazivale su slab alostimulacijski odgovor T ćelija. Međutim, cDC koje su bile stimulisane kombinacijom Poly (I:C) i TNF- α su značajno manje stimulisale odgovor alogenih T ćelija u kokulturi, u poređenju sa cDC koje su bile stimulisane samo sa Poly (I:C). Ovi rezultati ukazuju da TNF- α inhibira povećanje alostimulacijskog kapaciteta cDC koji izaziva Poly (I:C).

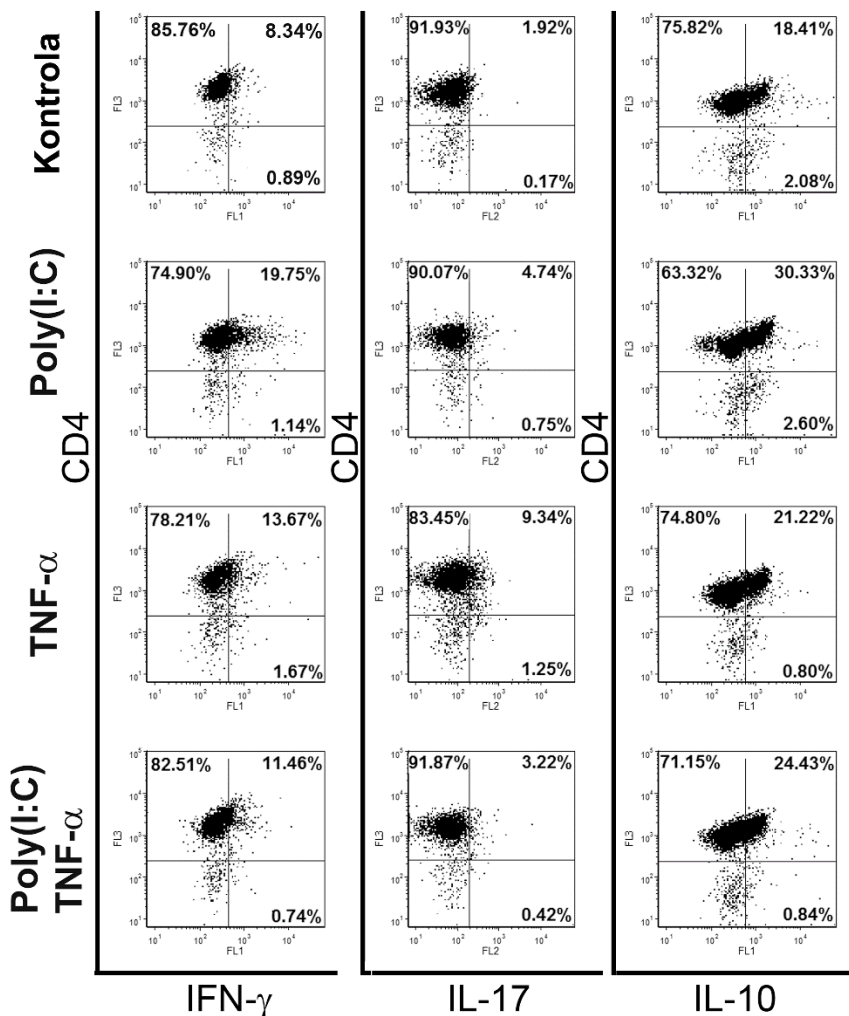


Grafikon 5.4.3. Efekat Poly (I:C), TNF- α i njihove kombinacije na alostimulacijsku sposobnost cDC. Nezrele DC su dobijene u prisustvu GM-CSF/IL-4 a zatim stimulisane razliĉitim dozama Poly (I:C), TNF- α (10ng/ml) ili njihovom kombinacijom tokom 48 ĉasova. cDC su zatim kokultivisane sa preĉišćenim CD4+T ćelijama (1×10^5 /otvoru) u razliĉitim brojnim odnosima (1:10-1:80) tokom 5 dana, a kultura je tretirana radioaktivnim timidinom poslednjih 18 ĉasova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti radioaktivnih događaja u minutu (engl. count per minute, cpm) \pm SD triplikata. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment od ukupno 3 sa sliĉnim odnosima između eksperimentalnih grupa. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ u odnosu na nestimulisane cDC (kontrola) ili kako je naznaĉeno (jednosmerna ANOVA).

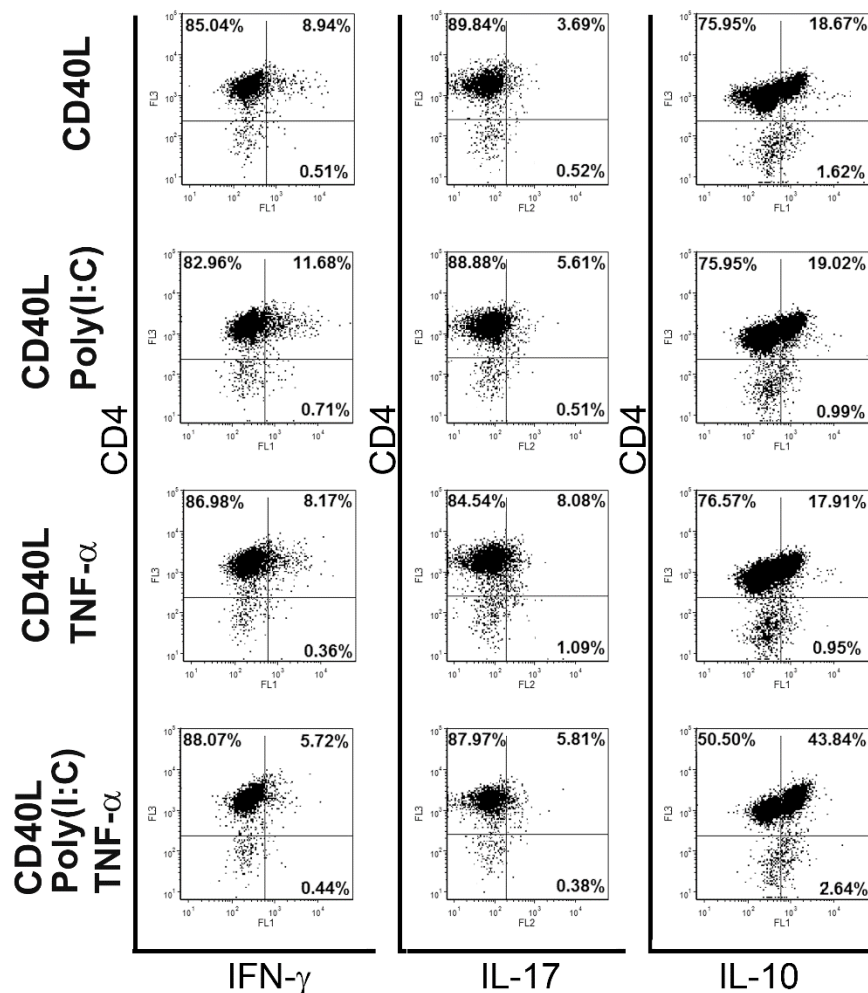
U cilju određivanja Th polarizacionog svojstva cDC stimuliranih sa Poly (I:C), samim ili u kombinaciji sa TNF- α , analizirano je prisustvo intraćelijskih citokina (IFN- γ , IL-17 i IL-10) u kokultiviranim CD4⁺T ćelijama (**Grafikon 5.4.4**). Rezultati su pokazali da cDC tretirane sa 25 μ g/ml Poly (I:C) tokom 24 sata, snažno potenciraju ekspresiju IFN- γ , i slabo IL-10, u alogenim Th ćelijama. cDC stimulirane sa TNF- α (10ng/ml) su indukovale predominantno Th17 ćelije u kokulturi. Sa druge strane, cDC stimulirane kombinacijom Poly (I:C) i TNF- α su indukovale manju ekspresiju IFN- γ i IL-17 u T ćelijama u odnosu na cDC tretirane pojedinačnim agonistima.

Fenomen da TNF- α inhibira Th1 polarizacijsku sposobnost DC stimuliranih sa Poly (I:C) je dobijen i kada su cDC dodatno bile stimulirane sa CD40L (**Grafikon 5.4.5**). Međutim, pri tome je uočeno da cDC stimulirane sa CD40L i kombinacijom Poly (I:C) i TNF- α snažno potenciraju ekspresiju regulatornog citokina IL-10 u CD4⁺T ćelijama, što može biti posledica povećane tolerogenosti ovako stimuliranih ćelija.

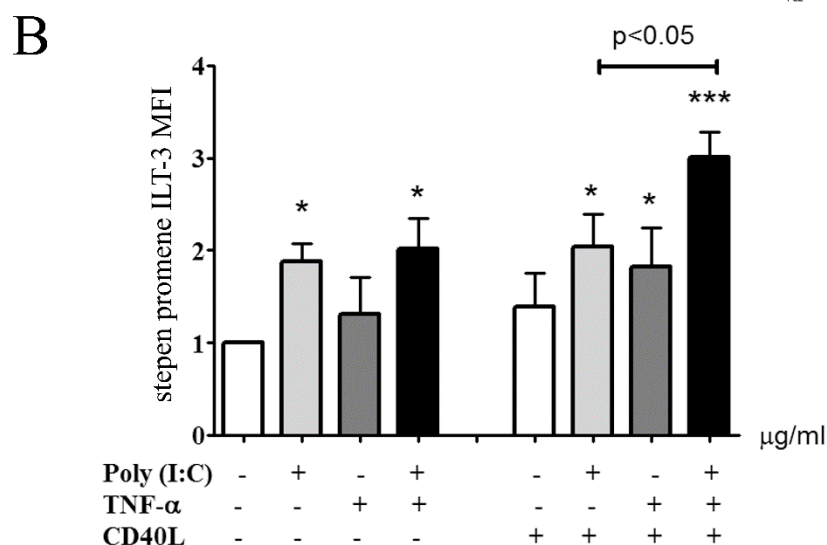
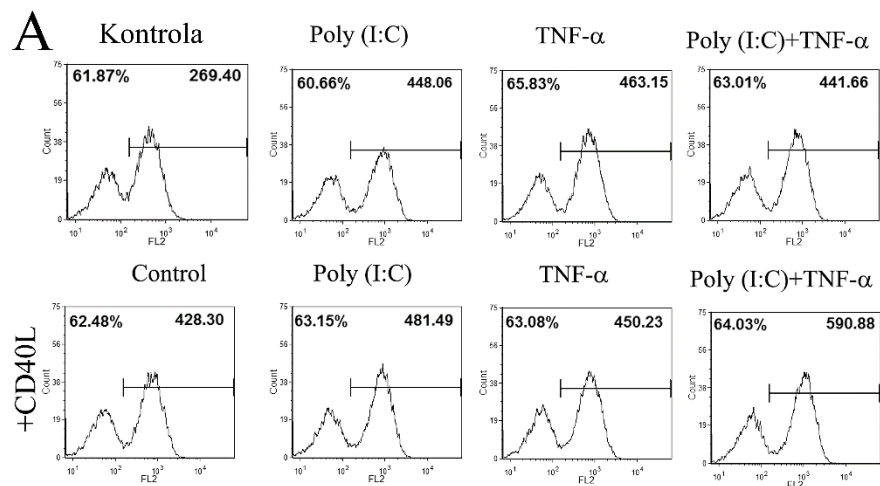
Zbog toga je nakon stimulacije cDC ispitana i ekspresija ILT3 molekula nakon 48 časovne stimulacije sa Poly (I:C), TNF- α , CD40L, ili njihove kombinacije. Uočeno je da iako sam CD40L ne stimuliše ekspresiju ILT-3, u kombinaciji sa Poly I:C, TNF- α ili njihovom kombinacijom indukuje se ekspresija ovog tolerogenog molekula (**Grafikon 5.4.6**). U odsustvu CD40L je zapaženo da poly (I:C) povećava ekspresiju ILT-3 na cDC. Sa druge strane, TNF- α nije značajnije uticao na ILT-3 ekspresiju, i nije modulirao ekspresiju ovog molekula kada je dodavan u kombinaciji sa Poly (I:C) za stimulaciju cDC.



Grafikon 5.4.4. Efekat Poly (I:C), TNF- α i njihove kombinacije na Th polarizacijsku sposobnost cDC. Nezrele DC su dobijene u prisustvu GM-CSF/IL-4 a zatim stimulisane sa Poly (I:C) (25 μ g/ml), TNF- α (10ng/ml) ili njihovom kombinacijom tokom 24 časa. cDC su zatim kokultivisane sa alogenim CD4+T ćelijama 5 dana u odnosu 1:10 (DC:T) i tretirane sa PMA/Ca jonofor/monensin poslednjih 5 sati kulture. Sve ćelije su sakupljene i obojene na CD4 i IFN- γ , IL-17 i IL-10, kao što je naznačeno. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment od ukupno 3 sa sličnim rezultatima.



Grafikon 5.4.5. Efekat Poly (I:C), TNF- α i njihove kombinacije na Th polarizacijsku sposobnost cDC stimulisanih sa CD40L. Nezrele DC su dobijene u prisustvu GM-CSF/IL-4 a zatim stimulisane sa CD40L (10 μ g/ml), Poly (I:C) (25 μ g/ml), TNF- α (10ng/ml), ili njihovom kombinacijom tokom 24 časa. cDC su zatim kokultivisane sa alogenim CD4+T ćelijama 5 dana u odnosu 1:10 (DC:T) i tretirane sa PMA/Ca jonofor/ monensin poslednjih 5 sati kulture. Sve ćelije su sakupljene i obojene na CD4 i IFN- γ , IL-17 i IL-10, kao što je naznačeno. Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment od ukupno 3 sa sličnim rezultatima.



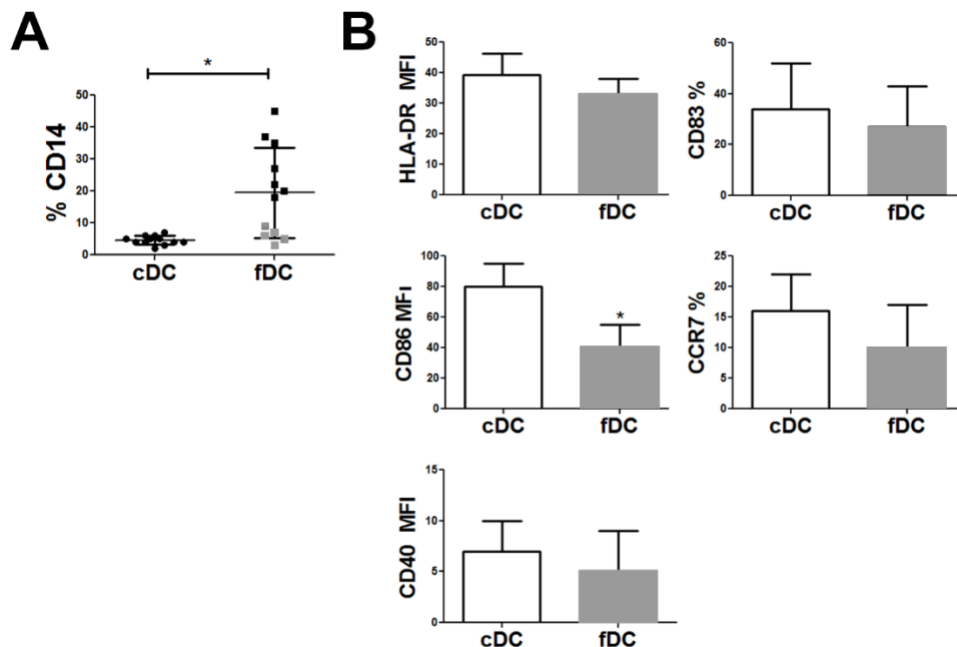
Grafikon 5.4.6. Efekat Poly (I:C), TNF- α , CD40L na ekspresiju ILT-3 na cDC. Nezrele DC su dobijene u prisustvu GM-CSF/IL-4 a zatim stimulisane sa CD40L (10 $\mu\text{g/ml}$), Poly (I:C) (25 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α (10ng/ml), ili njihovom kombinacijom tokom 24 časa. Nakon toga je analizirana ekspresija ILT3 na cDC protočnom citometrijom. A) Prikazan je jedan reprezentativni eksperiment, dok su B) objedinjeni rezultati prikazani kao promena srednje florescence ILT-3 u odnosu na kontrolu \pm SD. * $p < 0.05$ u poređenju sa nestimulisanim cDC ili kako je naznačeno.

U zaključku, ovi rezultati su pokazali da Poly (I:C) stimuliše Th1 polarisuća svojstva kod cDC u različitim dozama, ali dodatna primena TNF- α , mada smanjuje pro-apoptotski efekat visokih doza Poly (I:C), inhibira i Th1 polarizacioni kapacitet DC stimulisanih sa ovim TLR3 agonistom. Zbog toga je u daljim ispitivanjima korišćen sâm Poly (I:C) kao faktor sazrevanja cDC i fDC, i to u dozama 10 ili 25 $\mu\text{g/ml}$ koja ne izazivaju značajno povećanje markera apoptoze kod DC.

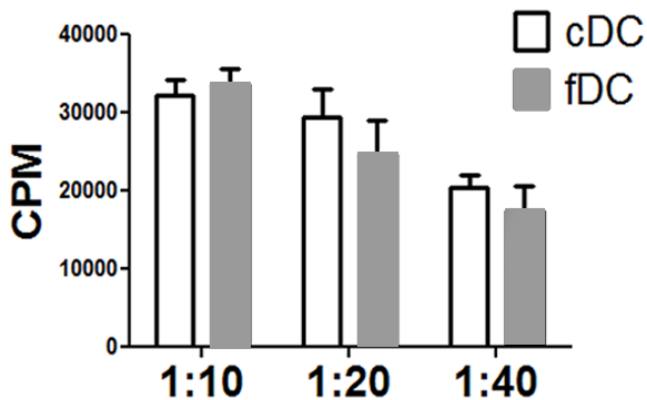
5.5 Fenotipske i funkcionalne osobine DC dobijenih ubrzanim protokolom pomoću Poly (I:C)

Uzimajući u obzir da Poly (I:C) snažno potencira Th1 polarizacionu sposobnost kod cDC, u prvom koraku je ispitano da li njegovo korišćenje u protokolu za ubranu diferencijaciju može doprineti boljem odgovoru ćelija. Osim standardnog dizajna za poređenje fenotipa i funkcija cDC i fDC od istog donora, u nekim eksperimentima je korišćen alternativni pristup u cilju sinhronne analize i manipulacije cDC i fDC. Naime, PBMC su u nekim eksperimentima prvo bile prezervirane zamrzavanjem na -80°C, da bi ćelije za diferencijaciju po protokolu za cDC bile odleživane 4 dana pre ćelija za diferencijaciju za fDC. Nakon diferencijacije u GM-CSF/IL-4 ukupno 5 dana, odnosno 24 časa, i stimulacije sa poly (I:C) tokom 48 časova, dobijene su cDC, odnosno fDC.

Analiza ekspresije markera diferencijacije CD14 je pokazala da su sve ćelije diferencirane po protokolu za cDC (12 različitih donora) kompletno smanjile ekspresiju CD14, dok to nije bio slučaj za ćelije diferencirane po ubrzanom protokolu (**Grafikon 5.5.1**). fDC dobijene od 5 različitih donora (ćelije od 3 donora su korišćene u alternativnom protokolu sa smrzavanjem, a od 2 donora direktno iz periferne krvi) su kompletno smanjile ekspresiju CD14 (dobri responderi). fDC dobijene iz dobrih respondera su ispoljavale HLA-DR, CD83, CCR7 i CD40 u sličnoj meri, i manje CD86, u odnosu na DC dobijene konvencionalnim protokolom. Ovi rezultati su bili u skladu sa sličnim kapacitetom cDC i fDC za stimulaciju proliferacije alogenih CD4⁺ T ćelija (**Grafikon 5.5.2**). Ovi rezultati su bili očekivani na osnovu prethodnih ispitivanja sa proinflamacijskim koktelom.

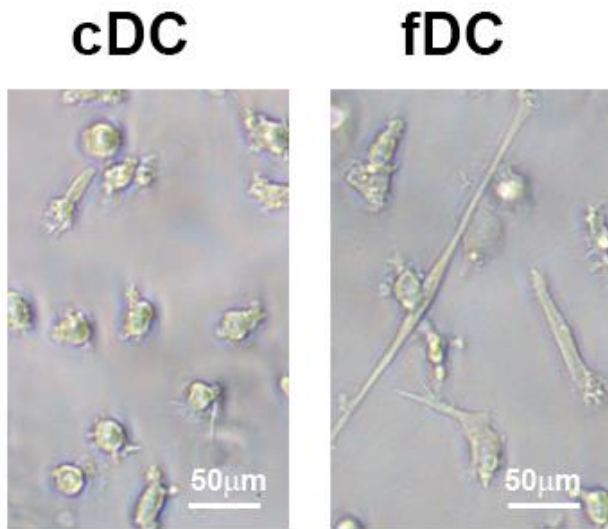


Grafikon **5.5.1.** Potencijal monocita različitih donora za diferencijaciju i sazrevanje po standardnom i ubrzanom DC protokolu. cDC i fDC su stimulisane sa Poly (I:C) (10 μ g/ml) tokom 48 časova, a ekspresija CD14 je određena protočnom citometrijom. A) Prikazani su objedinjeni podaci za ćelije iz 12 različitih donora sa % medijane \pm SD. Sivim tačkama su predstavljeni podaci dobijeni od 5 donora čija je ekspresija CD14 u protokolu za fDC bila manja od 10% (dobri responderi), a crnim tačkama preko 10% (n=7, loši responderi). B) Ekspresija markera na cDC i fDC dobijene od ćelija dobrih respondera (n=5) je prikazana kao srednja vrednost MFI ili % \pm SD. *p<0.05 fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).

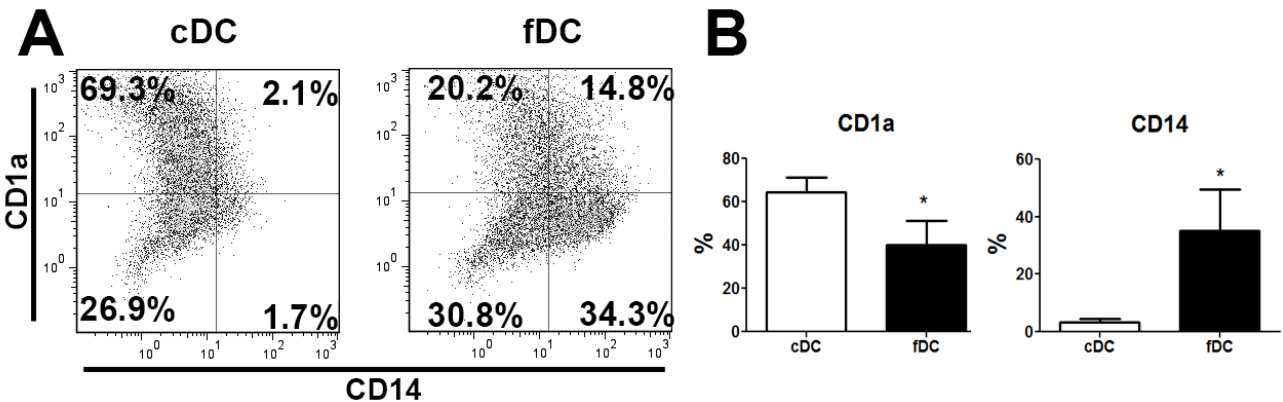


Grafikon 5.5.2. Alostimulatorni potencijal fDC i cDC dobrih respondera. cDC i fDC su stimulisane sa Poly (I:C) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tokom 48 časova, nakon čega su ćelije kokultivisane 5 dana sa prečišćenim alogenim CD3⁺T ćelijama ($1 \times 10^5/\text{otvoru}$) u različitim brojnim odnosima (1:10-1:40). Prikazani podaci iz jednog reprezentativnog eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost cpm \pm SD šestoplikata, od 5 eksperimenata sa sličnim rezultatima.

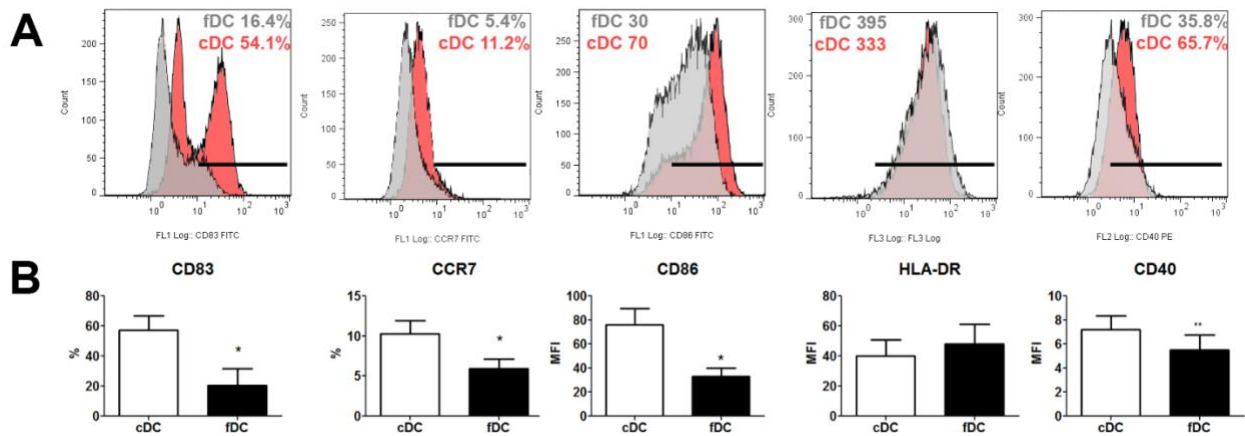
Poseban fokus daljih ispitivanja je bila grupa loših respondera (7/12) kod kojih nije uočeno smanjenje CD14 markera nakon diferencijacije po ubrzanom protokolu. Obzirom da ovakve ćelije mogu imati tolerogena svojstva, njihova primena u imunoterapiji tumora nije prihvatljiva. Detaljnijom analizom morfologije fDC i cDC od istog donora pomoću faznog kontrastnog mikroskopa je uočeno da fDC loših respondera čvrsto adheriraju za podlogu dok se cDC relativno lako odlepljuju u toku pipetiranja. Osim toga fDC su imale morfologiju sličniju makrofagima u kulturi nego DC (**Slika 5.5.1**). U skladu sa tim, analiza protočnom citometrijom je pokazala da fDC loših respondera, osim ekspresije CD14, imaju i nisku ekspresiju CD1a (**Grafikon 5.5.3**). fDC loših respondera su ispoljavale i značajno manje CD86 molekula (2.3 puta manje prema MFI), CD83 (3.3 puta manje prema %), CD40 (1.3 puta manje prema MFI) i CCR7 (1.9 puta manje prema %) u odnosu na cDC istih donora (**Grafikon 5.5.4**). Za razliku od toga, ekspresija HLA-DR je bila slična između fDC i cDC loših respondera.



Slika 5.5.1. Izgled fDC i cDC loših respondera u kulturi. Slike cDC i fDC su dobijene pomoću fazno-kontrastnog svetlosnog mikroskopa 48h nakon stimulacije sa Poly (I:C).

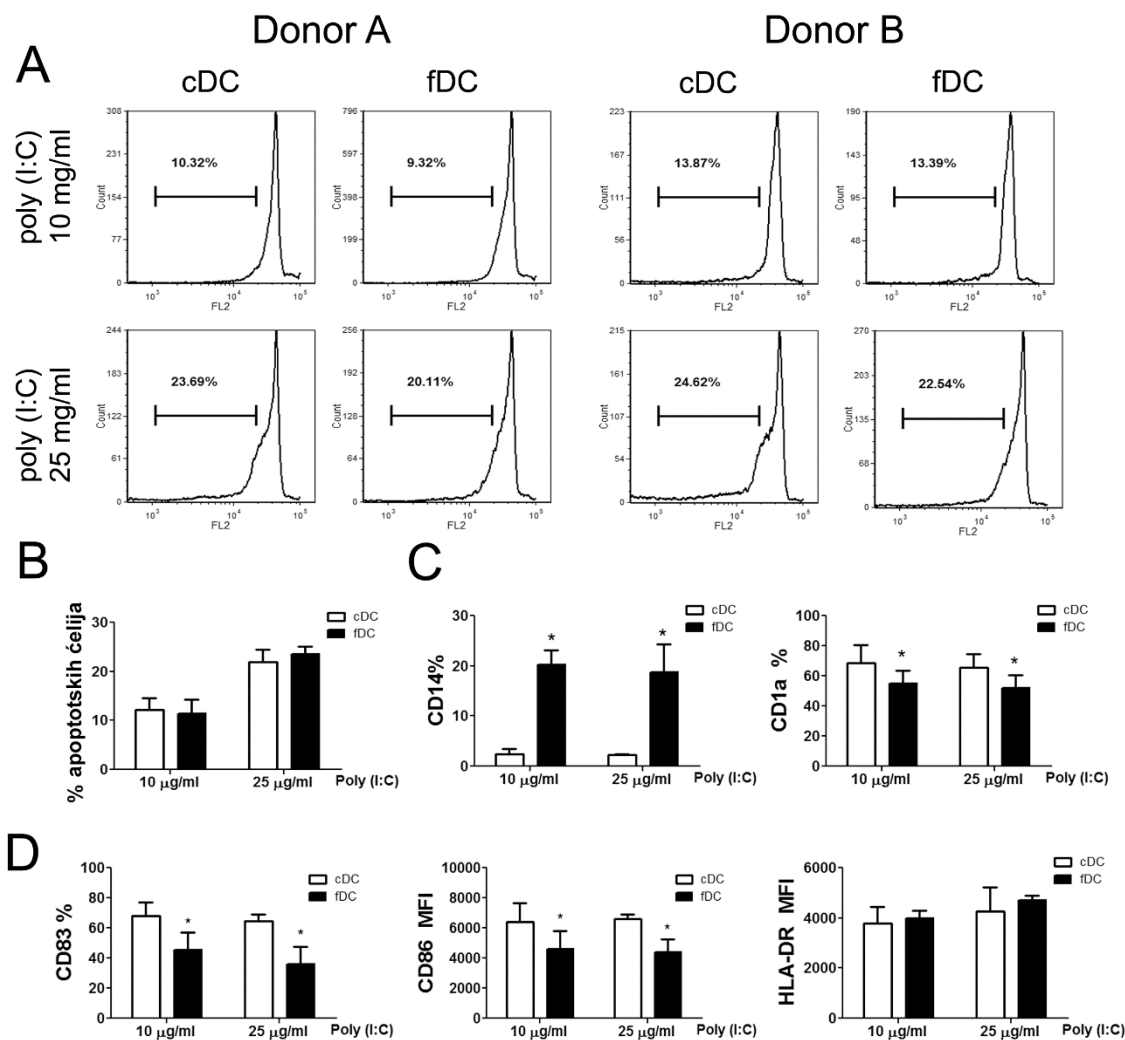


Grafikon 5.5.3. Koekspresija CD14 i CD1a na fDC i cDC loših respondera. cDC i fDC su stimulisane sa Poly (I:C) (10 μ g/ml) tokom 48 časova, nakon čega je analiziran fenotip ćelija protočnom citometrijom. A) Prikazana je jedna reprezentativna analiza ekspresije CD1a i CD14 a B) objedinjeni podaci za 7 različitih donora u grupi loših respondera su prikazani kao srednja vrednost % \pm SD. * p <0.05 fDC u odnosu na cDC.

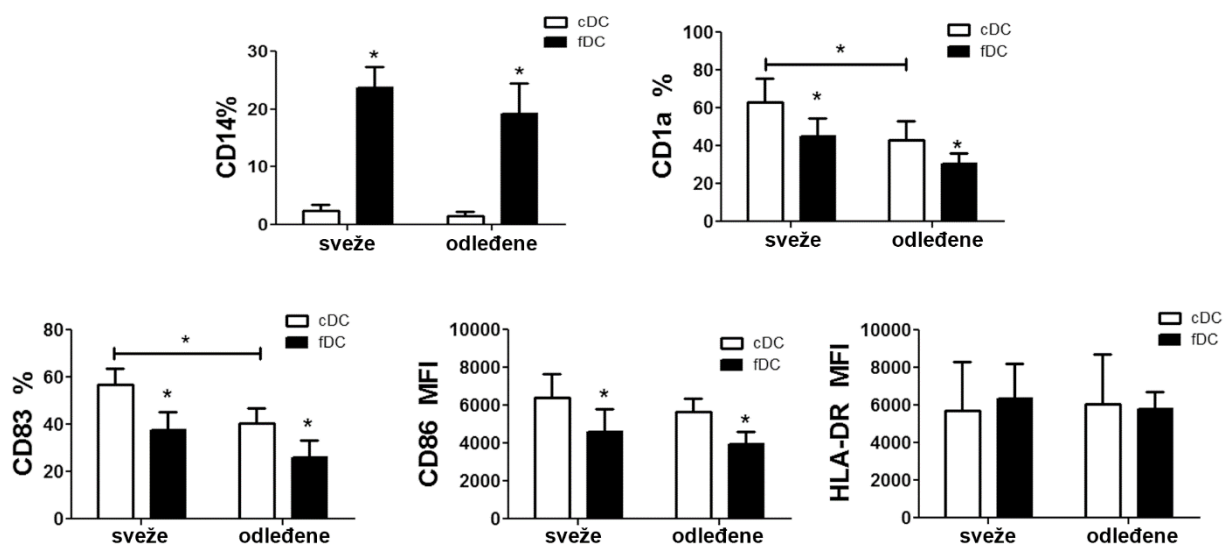


Grafikon 5.5.4. Ekspresija markera sazrevanja na fDC i cDC loših respondera. cDC i fDC su stimulirane sa Poly (I:C) (10 µg/ml) tokom 48 časova, nakon čega je analiziran fenotip ćelija protočnom citometrijom. A) Prikazani su histogrami jedne reprezentativne analize ekspresije markera sazrevanja, a B) objedinjeni podaci za 7 različitih donora u grupi loših respondera su prikazani kao srednja vrednost % ili MFI ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ fDC u odnosu na cDC.

Slične razlike u fenotipskom sazrevanju su uočene i kada je korišćena veća doza Poly (I:C) od 25 µg/ml (**Grafikon 5.5.5**), a ovakav fenomen nije zavisio od toga da li su korišćene sveže ćelije za diferencijaciju fDC i cDC ili prethodno zamrznute (**Grafikon 5.5.6**). Međutim, veća doza Poly (I:C) od 25 µg/ml je indukovala veći procenat ćelija sa hipodiploidnom količinom DNK (apoptotske ćelije), kako fDC, tako i cDC. Sa druge strane, uočeno je da krioprezervacija delimično smanjuje sposobnost ćelija da u toku diferencijacije povećaju ekspresiju CD1a, i povećaju ekspresiju CD83 nakon stimulacije sa Poly (I:C). Međutim, ovakav fenomen nije zavisio od toga da li su korišćene fDC ili cDC u analizi.

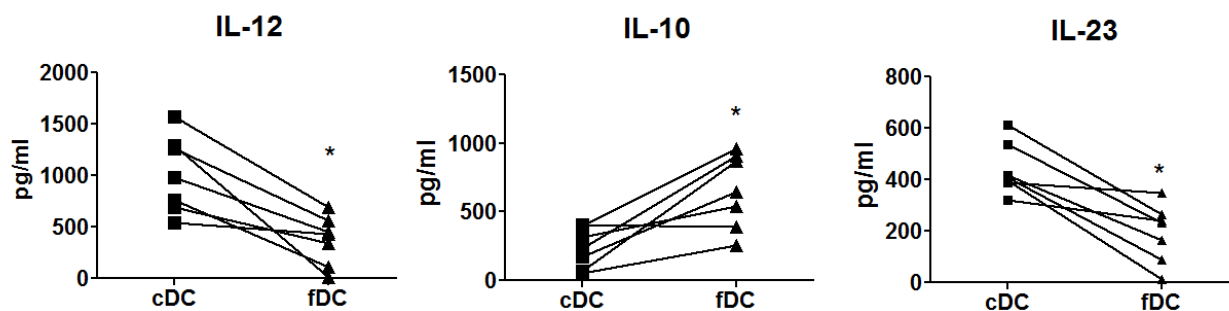


Grafikon 5.5.5. Efekat Poly (I:C) na apoptozu i fenotipsko sazrevanje fDC i cDC loših respondera. Monociti iz dva donora definisanih kao loši responderi, su kultivisani u prisustvu GM-CSF/IL-4 tokom 24 časa (fDC) ili 5 dana (cDC) nakon čega su stimulisani sa Poly (I:C) 10 µg/ml ili 25 µg/ml tokom 48 časova. Apoptoza kod fDC i cDC je analizirana nakon bojenja ćelija sa PI u hipotonom rastvoru. A) Prikazani su histogrami dobijeni protočnom citometrijom za svakog donora, a B) objedinjeni rezultati su predstavljeni kao srednji % hipodiploidnih ćelija ± SD (n=2). C) Ekspresija markera diferencijacije CD14 i CD1a, i D) markera sazrevanja CD83, CD86 i HLA-DR od strane fDC i cDC su prikazani kao srednje vrednosti % ili MFI ± SD. *p<0.05, fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).



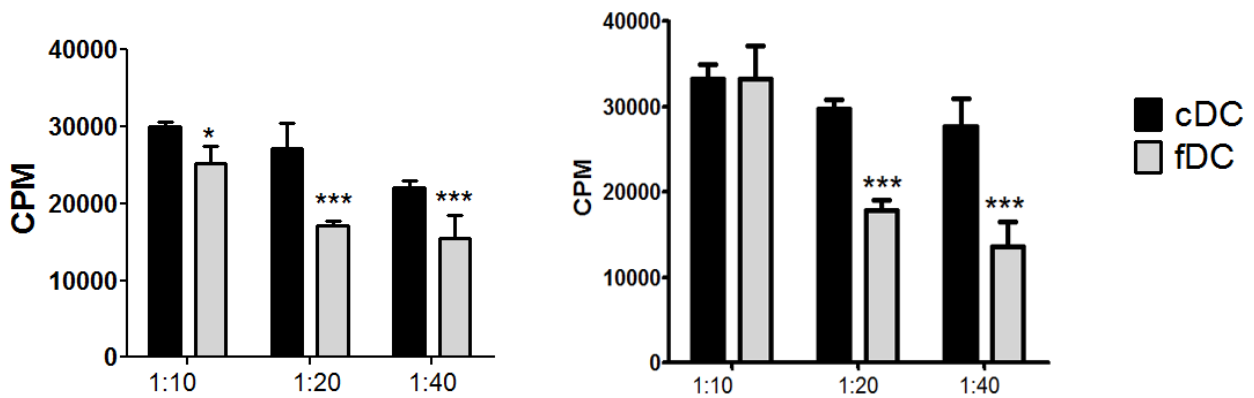
Grafikon 5.5.6. Efekat krioprezervacije na diferencijaciju i fenotipsko sazrevanje fDC i cDC loših respondera. Monociti iz dva donora definisanih kao loši responderi, su izolovani iz PBMC kao što je opisano u poglavlju Materijal i Metode. PBMC su korišćene direktno nakon izolacije (sveže) za diferencijaciju DC po standardnom protokolu, ili su prvo bile zamrznute u FCS/10% DMSO najmanje 4 sata. Čelije su zatim odleživane 0. ili 4. dana za dobijanje cDC i fDC. Za dobijanje fDC iz sveže izolovanih PBMC, isti donori su dali uzorke 4. dana od početka eksperimenta. Monociti su kultivisani u prisustvu GM-CSF/IL-4 tokom 24 časa (fDC) ili 5 dana (cDC) nakon čega su stimulisani sa Poly (I:C) 10 $\mu\text{g/ml}$ tokom 48 časova, nakon čega je analiziran fenotip ovih ćelija protočnom citometrijom. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti % ili MFI \pm SD (n=2). * $p < 0.05$, fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).

Osim analize fenotipa, analiziran je kapacitet za sekreciju ključnih citokina DC koji su uključeni u polarizaciju Th odgovora (IL-12p70, IL-23 i IL-10). Pri tome su u eksperimente uključene samo ćelije loših respondera diferencirane po konvencionalnom i ubrzanom protokolu. Rezultati merenja citokina 48 časova nakon stimulacije su pokazali da fDC loših respondera proizvode značajno manje IL-12p70 (medijana, opseg) (435, 15-689 pg/ml) i IL-23 (232, 12-350 pg/ml), u odnosu na cDC istih donora (IL12, 977, 546-1567 pg/ml) (IL-23, 408, 322-611 pg/ml) (Grafikon 5.5.7). Za razliku od toga, uočeno je da fDC proizvode značajno više IL-10 (644, 256-958 pg/ml) u odnosu na cDC od istih donora (232, 53-404 pg/ml).



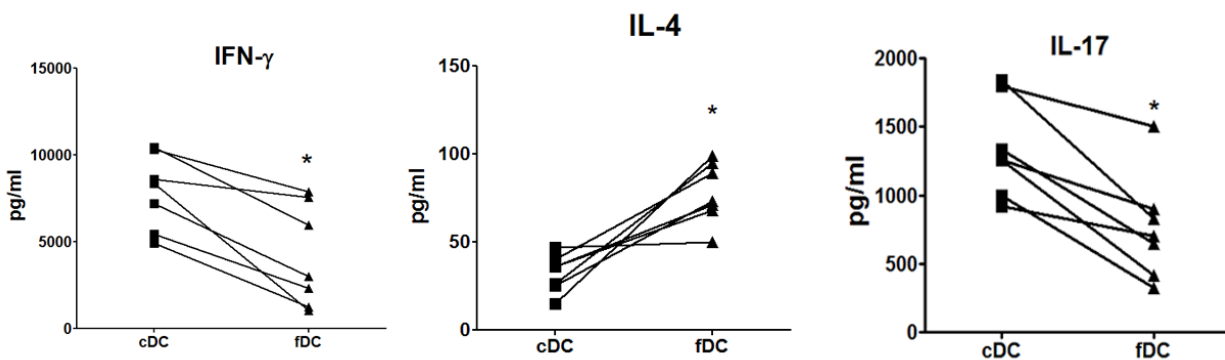
Grafikon 5.5.7. *Th* polarizacioni kapacitet *fDC* i *cDC* loših respondera. Supernatanti kultura *fDC* i *cDC* su 48 časova nakon tretmana kultura sa Poly (I:C) 10 $\mu\text{g/ml}$ korišćene za određivanje IL-12, IL-10 i IL-23 pomoću ELISA testa. Prikazane su koncentracije citokina iz svih dobijenih kultura sa ćelijama loših respondera, a linijama su povezane ćelije od istog donora. * $p < 0.05$ *cDC* u odnosu na *fDC* (Wilcoxon-ov parni test).

Osim razlike u produkciji citokina, u kokulturi sa alogenim CD3+T limfocitima je uočeno da *fDC* loših respondera imaju značajno slabiji alostimulacijski kapacitet u odnosu na *cDC* istih donora ($n=7$), u odnosima DC:T 1:20 i 1:40 (Grafikon 5.5.8). U tri od sedam slučajeva je uočeno da *fDC* ispoljavaju slabiji alostimulacijski kapacitet od *cDC* i u odnosu DC:T 1:10.



Grafikon 5.5.8. Kapacitet fDC i cDC loših respondera za indukciju proliferacije alogernih T ćelija. Alostimulacijski kapacitet fDC i cDC je određen nakon 5. dnevnih kultura DC sa alogernim CD3+ T ćelijama u različitim brojnim odnosima DC:T (1:10-1:40). Prikazani su rezultati iz dva nezavisna eksperimenta, a vrednosti su prikazane kao srednja vrednost cpm ± SD šestoplikata unutar eksperimenta. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ cDC u odnosu na fDC (dvosmerna ANOVA sa Bonferoni post-testom).

U narednom koraku je ispitano kakav Th profil fDC i cDC loših respondera indukuju u kokulturi sa alogernim T ćelijama. U ovim eksperimentima su DC i T ćelije kokultivisane u odnosu 1:20 tokom 5 dana, a kulture su stimulisane poslednjih 5 časova sa PMA i Ca jonoforom (**Grafikon 5.5.8**). Pokazano je da se u kokulturama sa fDC proizvode značajno manje IFN- γ (2985; 1046-7898) i IL-17 (701, 323-1503), a značajno više IL-4 (73; 50-99) u odnosu na količinu ovih citokina detektovanih u kokulturama sa cDC istih donora (IFN- γ , 8360; 4933-10,460) (IL-17, 1259, 917-1834) (IL-4, 36-15-47).



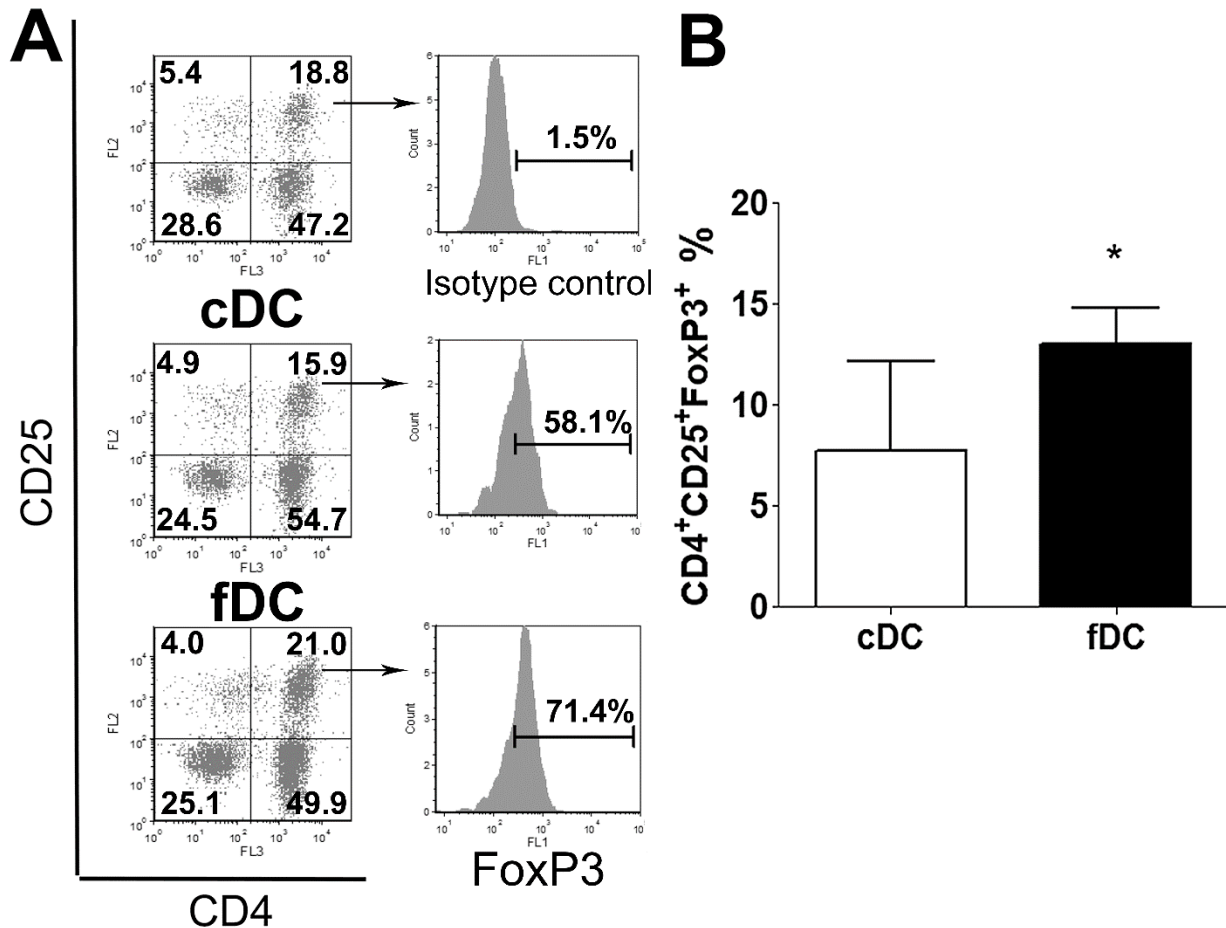
Grafikon 5.5.9. Kapacitet fDC i cDC loših respondera za polarizaciju Th citokina u kokulturi. Nivo IFN- γ , IL-4 i IL-17 je određen u kokulturama DC i CD3+T ćelija koje su bile kokultivisane u odnosu 1:20. Prikazane su koncentracije citokina iz svih dobijenih kokultura sa fDC i cDC loših respondera, a linijama su povezane ćelije od istog donora. * $p < 0.05$ cDC u odnosu na fDC (Wilcoxon-ov parni test).

5.6 Tolerogena svojstva DC loših respondera dobijenih ubrzanim protokolom pomoću Poly (I:C)

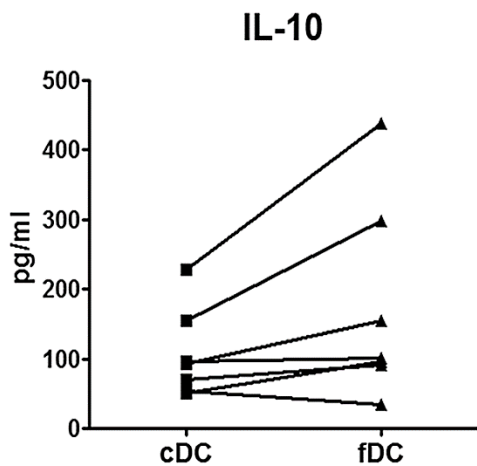
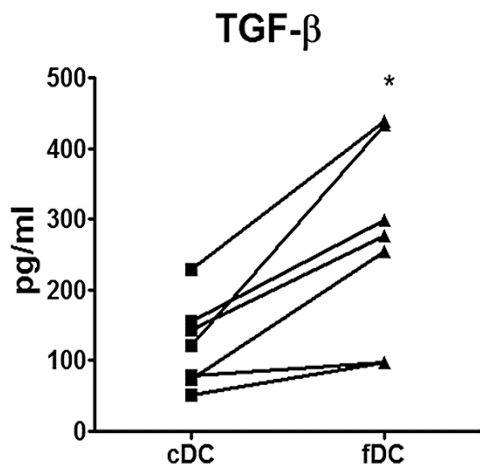
Smanjena ekspresija markera maturacije, loš alostimulacijski kapacitet i polarizacija odgovora Th u pravcu smanjene produkcije pro-inflamacijskih citokina, a povećane produkcije anti-inflamacijskog IL-4, ukazuje na tolerogeni potencijal fDC poreklom od ćelija loših respondera. Zbog toga je u narednom koraku ispitan kapacitet fDC i cDC loših respondera da indukuju diferencijaciju CD4+CD25+FoxP3+ T ćelija u kokulturi.

Rezultati su pokazali da fDC loših respondera indukuju dva puta veći procenat FoxP3+ ćelija u okviru CD4+CD25+ Treg ćelija, u odnosu na cDC istih donora (**Grafikon 5.6.1**). Ovi rezultati su bili u skladu sa većom koncentracijom TGF- β (277, 96-437) i IL-10 (101, 35-437) koja je detektovana u supernatantima kokultura fDC i T, u odnosu na koncentracije detektovane u kokulturama cDC istih donora i T ćelija (TGF- β , 122, 50-229) (IL-10, 94, 50-228) (**Grafikon 5.6.2**). Osim fenotipske potvrde prisustva CD4+CD25+FoxP3+ Treg ćelija, neophodno je bilo ispitati, da li detektovano povećanje procenta Treg u kokulturama sa fDC doprinosi većoj supresivnoj funkciji ukupnih CD3+ T ćelija aktiviranih sa fDC u odnosu na cDC istih donora. U tom cilju su T ćelije koje su bile u kokulturi sa DC, u narednom koraku kokultivisane sa alogenim CD3+T ćelijama iz novog donora, u prisustvu poliklonske stimulacije sa anti-CD3 i anti-CD28

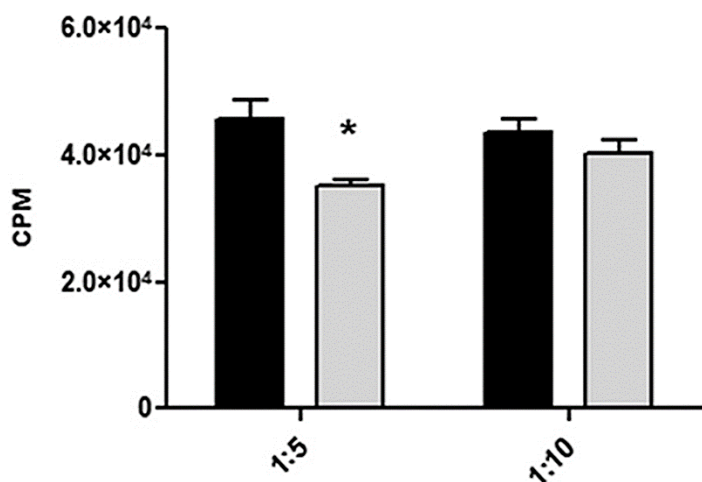
antitelima. Uočeno je da T ćelije aktivirane sa cDC ne modulišu značajno proliferaciju alogenih T ćelija, dok one aktivirane sa fDC inhibiraju takvu proliferaciju (**Grafikon 5.6.3**). Inhibitorni efekat T ćelija aktiviran sa fDC je detektovan samo kada je više T ćelija korišćeno u kokulturi sa poliklonski aktivisanim T ćelijama (odnos T-DC: T 1:5).



Grafikon 5.6.1 Kapacitet fDC i cDC loših respondera da indukuju regulatorne T ćelije. A) Ekspresija FoxP3 u okviru CD4⁺CD25⁺ populacije T ćelija je analizirana nakon kokultivacije CD3⁺ T ćelija sa fDC i cDC 3 dana, i tretiranih sa IL-2, kao što je opisano u materijalu i metodama. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta, dok su B) objedinjeni rezultati za svih 7 eksperimenata prikazani kao srednja vrednost % Treg ± SD. *p<0.05 fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).



Grafikon 5.6.2 *Produkcija TGF- β i IL-10 u kokulturama T ćelija i fDC ili cDC loših respondera.* Citokini su određivani u supernatantu kokultura T ćelija i fDC, odnosno cDC istih donora, nakon trodnevne kokultivacije i tretmana sa IL-2, kao što je opisano u materijalu i metodama. Podaci iz svakog eksperimenta, od ukupno 7 različitih eksperimenata sa ćelijama loših respondera, su prikazani tačkama, a linijama su povezane ćelije poreklom od istog donora. * $p < 0.05$ fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).



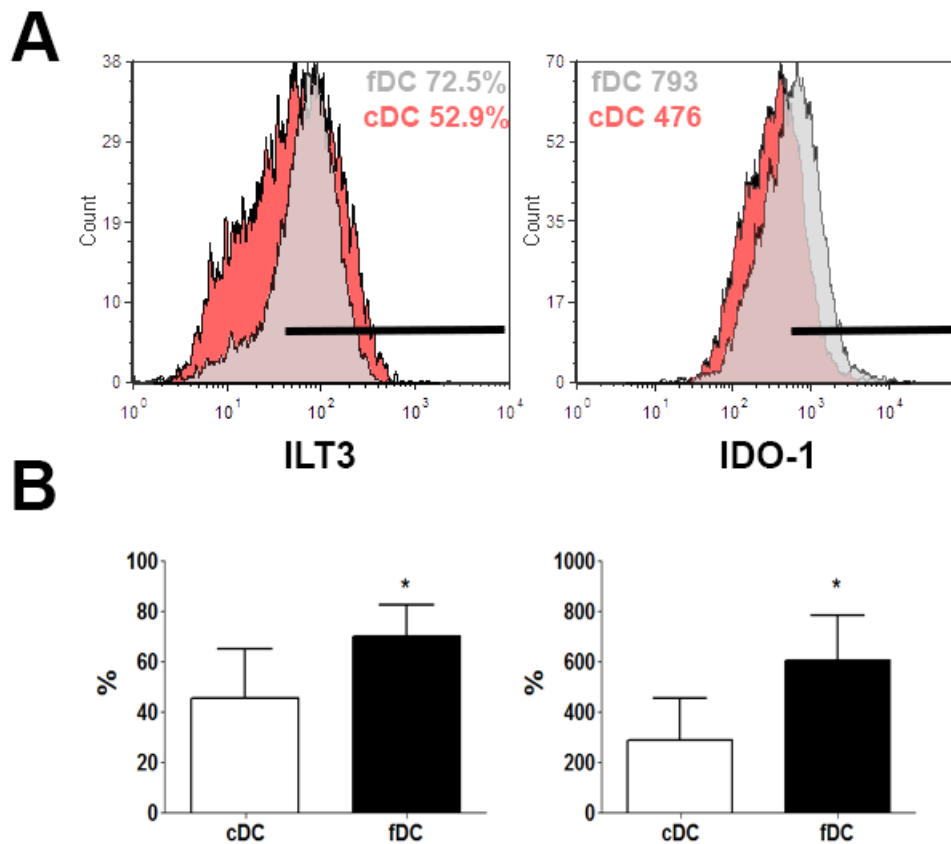
Grafikon 5.6.3 *Supresivni kapacitet T ćelija aktiviranih sa fDC ili cDC loših respondera.* Supresivni kapacitet CD3+T ćelija, aktiviranih sa fDC (sivi stubići) ili cDC (crni stubići) istih donora, je određen nakon njihove kokultivacije sa alogenim T ćelijama iz trećeg donora koje su stimulirane sa anti-CD3 i anti-CD28 antitelima, kao što je opisano u materijalu i metodama. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta kao srednja vrednost cpm ± SD šestoplikata. *p<0.05, fDC u odnosu na cDC (dvosmerna ANOVA sa Bonferoni post testom).

Veći tolerogeni potencijal fDC loših respondera može biti posledica njihovog povećanog kapaciteta da ispolje supresivne molekule kao što su ILT-3 i IDO-1. Stoga je ispitana ekspresija ILT-3 na površini fDC i cDC loših respondera, kao i intraćelijska ekspresija IDO-1 pomoću protočne citometrije (**Grafikon 5.6.4**). Pokazano je da fDC nakon stimulacije sa Poly (I:C) imaju značajno veću ekspresiju ILT-3 i IDO-1, u odnosu na cDC istih donora, što potvrđuje njihov veći tolerogeni potencijal.

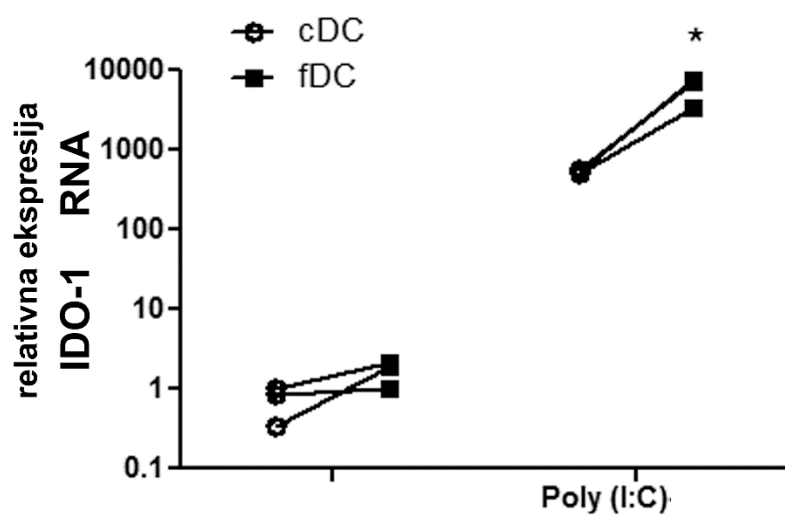
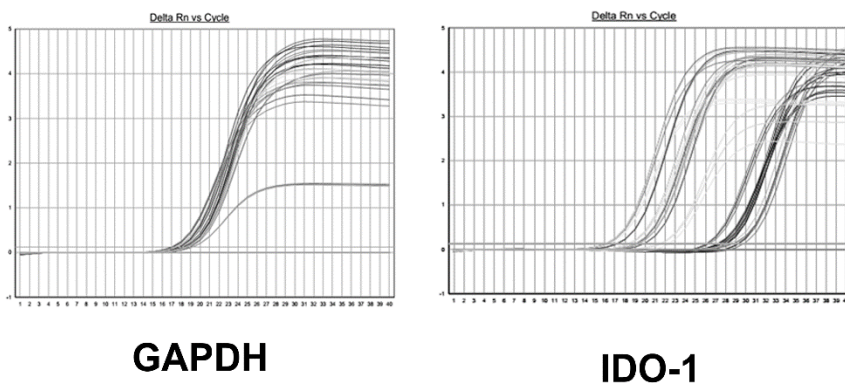
U cilju detaljnijeg ispitivanja uloge IDO-1 u indukciji supresivnih funkcija T ćelija od strane DC, ispitana je ekspresija iRNK za IDO-1 nakon stimulacije fDC i cDC sa Poly (I:C). Pokazano je da Poly (I:C) značajno potencira ispoljavanje IDO-1 i kod cDC i kod fDC. Međutim, fDC nakon stimulacije sa Poly (I:C) imaju značajno veću ekspresiju IDO-1 od cDC istih donora (**Grafikon 5.6.5**).

Osim toga, primenom 1MT koji specifično inhibira funkciju IDO-1, je pokazano da povećana ekspresija IDO-1 utiče na slabiju alostimulacijsku funkciju fDC u odnosu na cDC istih donora.

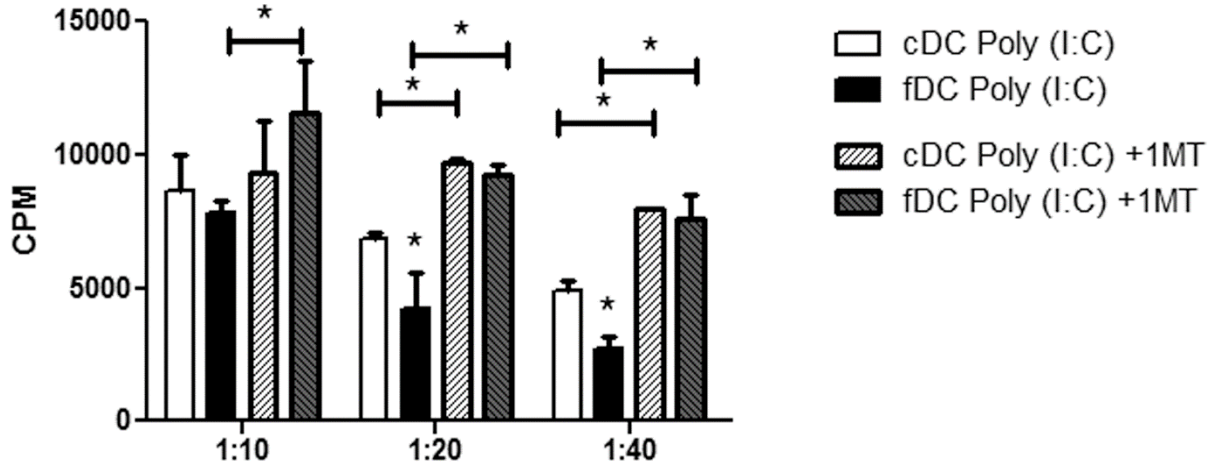
Naime, kada je funkcija IDO-1 bila blokirana pomoću 1MT u toku kokultivacije fDC i cDC sa T ćelijama, fDC i cDC su imale sličan kapacitet za stimulaciju proliferacije T ćelija (**Grafikon 5.6.6**).



Grafikon 5.6.4 Ekspresija tolerogenih markera od strane fDC ili cDC loših respondera. Ekspresija ILT-3 i IDO-1 je određena protočnom citometrijom nakon 48 časovne stimulacije DC sa Poly (I:C) (10 µg/ml), kao što je opisano u materijalu i metodama. A) Prikazani su rezultati iz jedne reprezentativne analize protočnom citometrijom, a B) objedinjeni rezultati prikazani kao srednje vrednosti % ± SD (n=7). *p<0.05, fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).



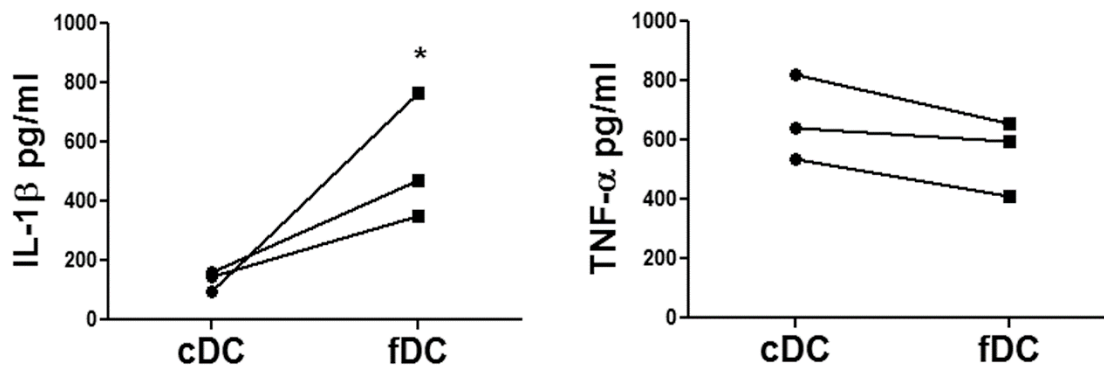
Grafikon 5.6.5 Ekspresija iRNK za IDO-1 od strane fDC ili cDC loših respondera. Ekspresija IDO-1 je određena metodom PCR u realnom vremenu u fDC i cDC stimulisane ili ne, sa Poly (I:C) 48 časova. Prikazani amplifikacioni histogrami ΔRn (y-osa, fluorescenca SYBR zelenog, normalizovana na referentne vrednosti) u odnosu na Ct (x-osa), za vrednosti GAPDH i IDO-1. Relativna ekspresija IDO-1 iRNK kod 3 ispitivana donora je prikazana na grafikonu ispod. * $p < 0.05$ fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).



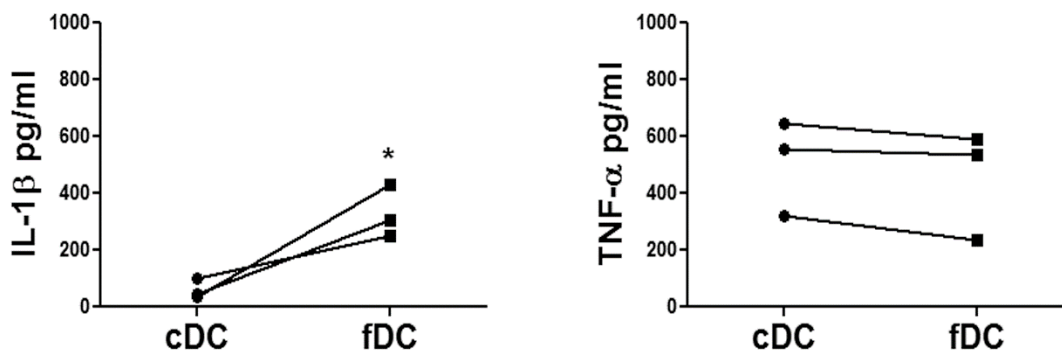
Grafikon 5.6.6 Uloga IDO-1 u alostimulatornom kapacitetu fDC ili cDC loših respondera. Alostimulatorni kapacitet fDC i cDC loših respondera je ispitan kokultivisanjem ovih ćelija sa prečišćenim CD3+T ćelijama, u prisustvu ili odsustvu inhibitora IDO-1, 1MT. DC i T su kokultivisane tokom 5 dana u različitim odnosima DC:T (1:10-1:40), nakon čega je izmerena proliferacija ćelija kvantifikacijom inkorporiranog timidina, kako je opisano u materijalu i metodama. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta od ukupno 3 sa sličnim odnosima između eksperimentalnih grupa, a vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost cpm \pm SD šestoplikata. * $p < 0.05$, fDC u odnosu na cDC (dvosmerna ANOVA sa Bonferoni post-testom).

Prethodno je pokazano da TNF- α potencira diferencijaciju DC iz monocita (Chomarat, Dantin, Bennett, Banchereau, i Palucka, 2003), a da IL-1 β ispoljava suprotan efekat (Makino, Maeda, Mukai, i Kaufmann, 2006). Stoga je u narednom koraku ispitana produkcija ova dva citokina od strane fDC i cDC poreklom od 3 loša respondera i 2 dobra respondera, i to 24 časa i 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C). Rezultati su pokazali da fDC loših respondera proizvode značajno više IL-1 β i nakon 24 časa i nakon 48 časova u poređenju sa cDC istih donora. Sa druge strane koncentracije TNF- α su bile slične između fDC i cDC u grupi loših respondera (**Grafikon 5.6.7**). U kulturama dobrih respondera je utvrđeno da je koncentracija IL-1 β niža od 50 pg/ml, dok je nivo TNF- α bio najmanje 2 puta veći od nivoa detektovanog u kulturama loših respondera. Pri tome, nisu utvrđene značajnije razlike u nivou produkcije ova dva citokina između fDC i cDC (podaci nisu prikazani).

24 h



48 h



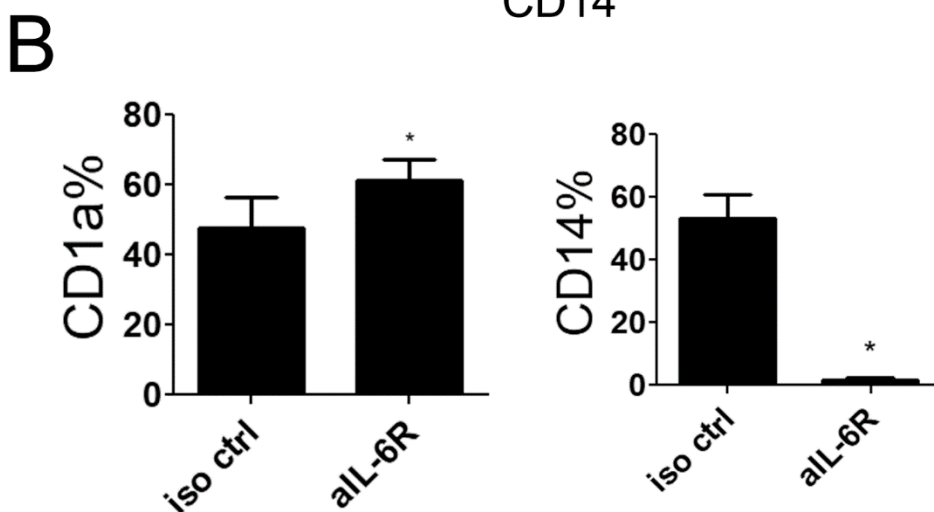
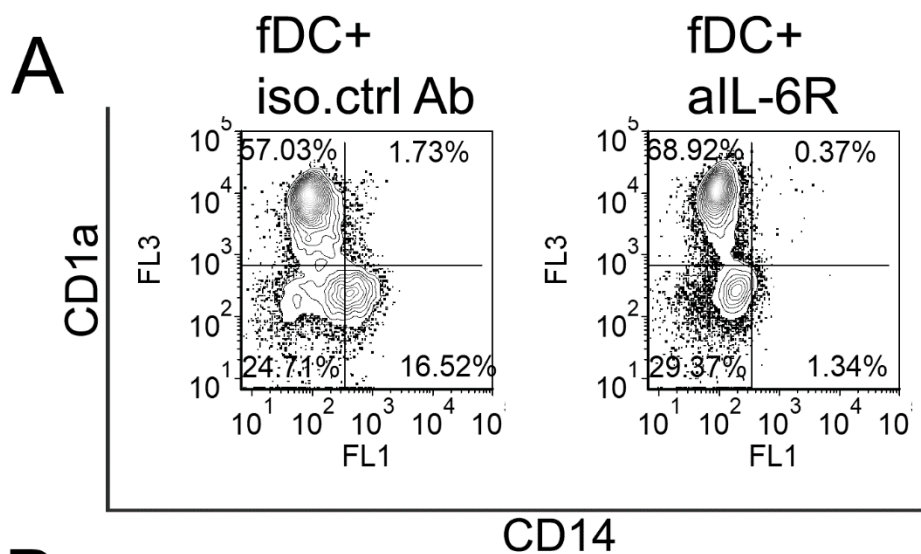
Grafikon 5.6.7. *Produkcija IL-1 β i TNF- α od strane fDC ili cDC loših respondera.* fDC i cDC su diferencirani koristeći monocite loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, a nivo citokina je određivan 24 časa ili 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 μ g/ml). Pojedinačne vrednosti citokina detektovane ELISA testom su prikazane tačkama, a linijama su spojene vrednosti dobijene od istog donora. * $p < 0.05$, fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).

5.7 Uloga IL-6 u diferencijaciji DC po ubrzanom protokolu

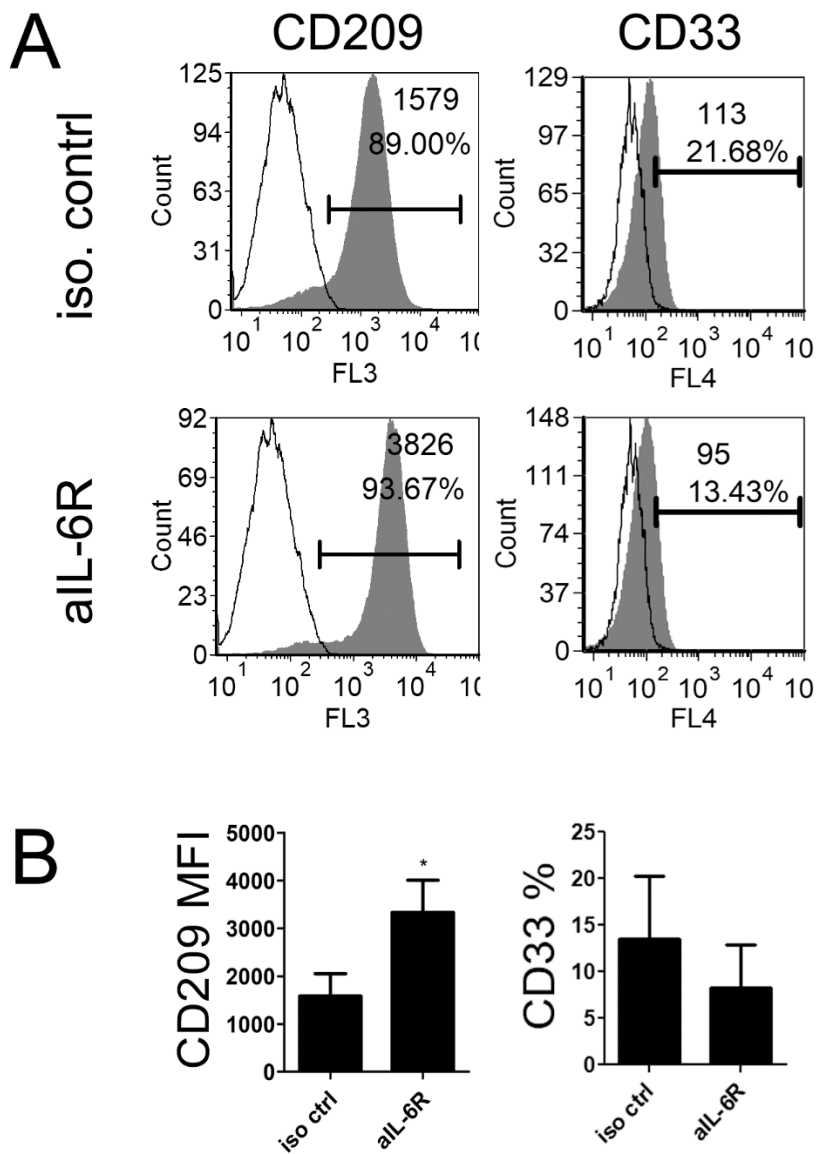
Dobijeni rezultati ukazuju na to da, bez obzira na način stimulacije sazrevanja DC u protokolu za ubranu diferencijaciju (proinflamacijski koktel ili Poly (I:C)), jedan broj donora loše odgovara na ovaj ubrzan protokol. Obzirom da se kod loših respondera može očekivati dobijanje fDC sa tolerogenim osobinama, postoji veliki rizik za primenu ovakvih ćelija u imunoterapiji tumora. Prethodno je pokazano da monociti koji imaju visok kapacitet za produkciju IL-6, loše odgovaraju na protokol ubrane diferencijacije. Obzirom da autokrina produkcija IL-6 može preusmeriti diferencijaciju monocita ka makrofagima (Chomarat, Banchereau, Davoust, i Palucka, 2000), u sledećem koraku je ispitano da li blokada efekata IL-6 može oporaviti diferencijaciju DC po ubrzanom protokolu kod loših respondera, pri čemu je kao stimulus za sazrevanje fDC korišćen Poly (I:C) (10 µg/ml).

Rezultati su pokazali da primena blokirajućeg antitela za receptor IL-6 (tocilizumab), potencira povećanje ekspresije CD1a i smanjenje ekspresije CD14 na fDC loših respondera (n=4) (**Grafikon 5.7.1**), u odnosu na iste ćelije tretirane izotipskim antitelom u toku diferencijacije po ubrzanom protokolu. Ćelije diferencirane u prisustvu tocilizumaba su takođe ispoljavale više markera DC, CD209, a manje monocitnog markera CD33 (**Grafikon 5.7.2**).

Osim toga, uočeno je da je nakon stimulacije sa Poly (I:C) ekspresija markera sazrevanja, CD83, CD86, HLA-DR i CD54 bila veća kod fDC diferenciranih u prisustvu tocilizumaba, u odnosu na kontrolne ćelije tretirane izotipskim antitelom (**Grafikon 5.7.3 i 5.7.4**). Ekspresija CCR7 je bila relativno niska kod fDC tretiranih sa Poly (I:C), dok je ekspresija CD80 bila manja na fDC diferenciranim u prisustvu tocilizumaba.

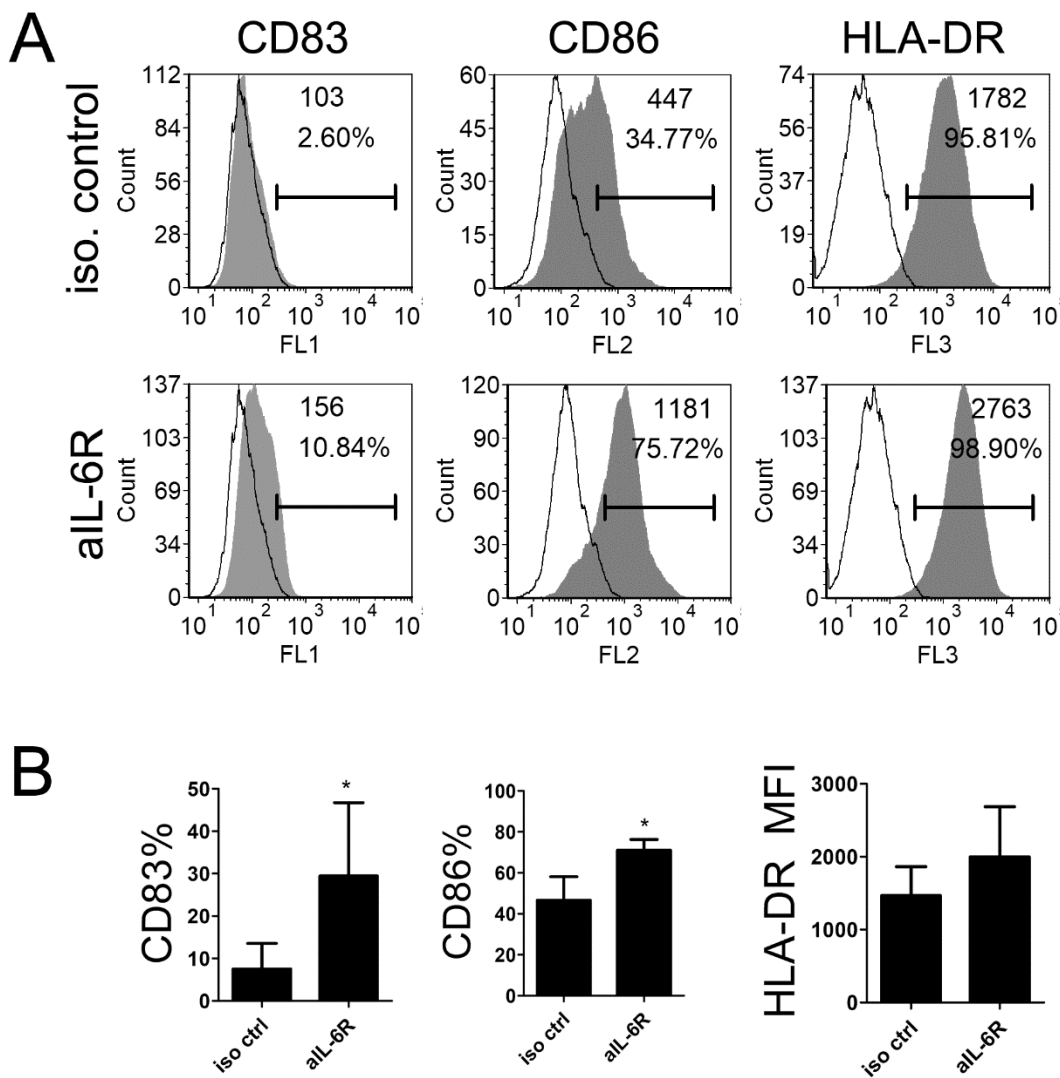


Grafikon 5.7.1. *Potencijal za diferencijaciju fDC loših respondera u prisustvu tocilizumaba.* fDC su diferencirane koristeći monocite loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. Ekspresija CD14 i CD1a je analizirana 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 µg/ml). A) Prikazana je jedna reprezentativna analiza koekspresije CD14 i CD1a, a B) objedinjeni rezultati od 4 donora sa lošim potencijalom za diferencijaciju su prikazani kao srednje vrednosti % ekspresije ± SD. *p<0.05, izotipska kontrola Ab u odnosu na aIL-6R Ab (Wilcoxon-ov parni test).



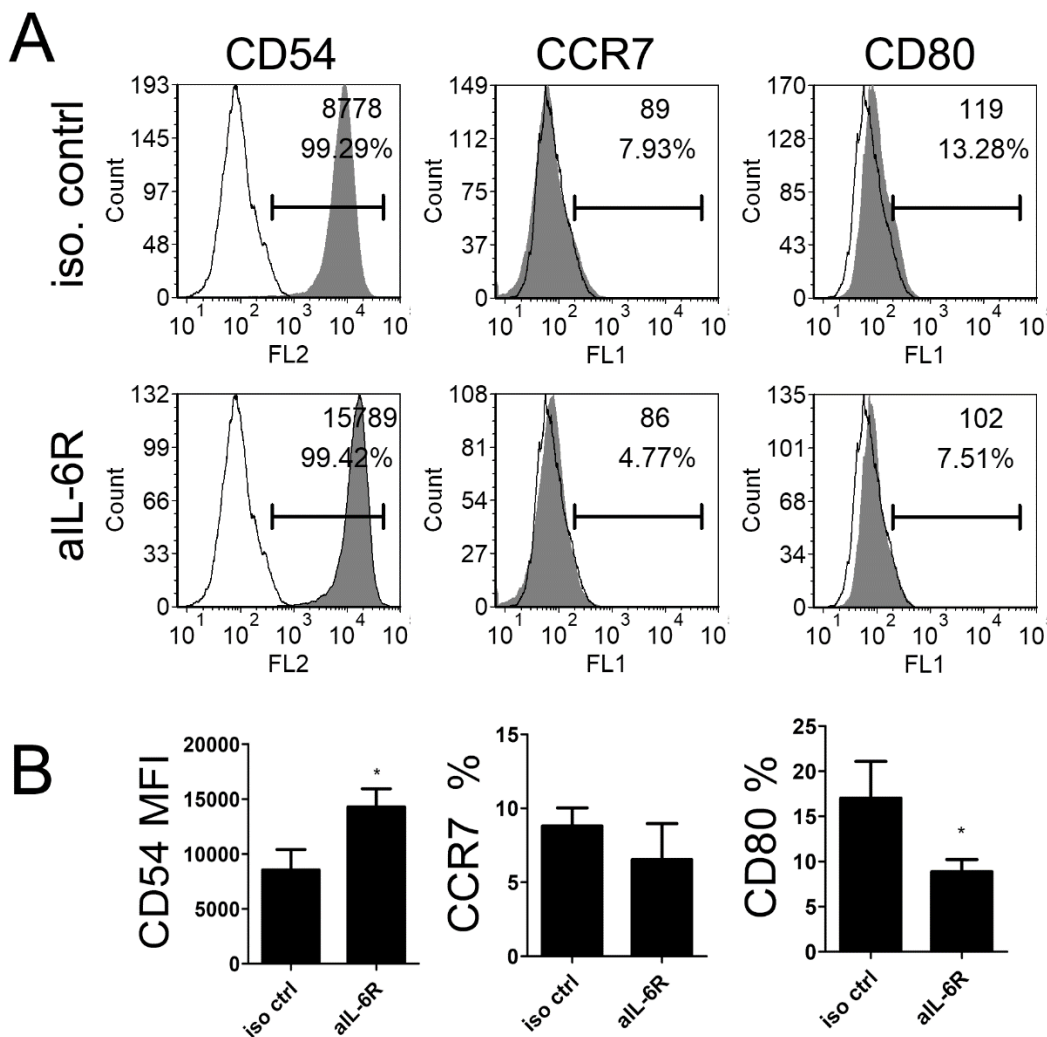
Grafikon 5.7.2. *Potencijal za diferencijaciju fDC loših respondera u prisustvu tocilizumaba.* fDC su diferencirane koristeći monocite loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. Ekspresija CD209 i CD33 je analizirana 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 μ g/ml). A) Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog eksperimenta obojeni specifičnim antitelima (sivi histogrami) ili izotipskom kontrolom (beli histogrami), a B) objedinjeni rezultati od 4 donora sa lošim potencijalom za diferencijaciju

su prikazani kao srednje vrednosti % ili MFI ekspresije \pm SD. * $p < 0.05$, izotipska kontrola Ab u odnosu na aIL-6R Ab (Wilcoxon-ov parni test).



Grafikon 5.7.3. *Potencijal za diferencijaciju fDC loših respondera u prisustvu tocilizumaba.* fDC su diferencirane koristeći monocite loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. Ekspresija CD86, CD83 i HLA-DR je analizirana 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 μ g/ml). A) Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog eksperimenta obojeni specifičnim antitelima (sivi histogrami) ili izotipskom kontrolom (beli histogrami), a B) objedinjeni rezultati od 4 donora sa lošim potencijalnom za

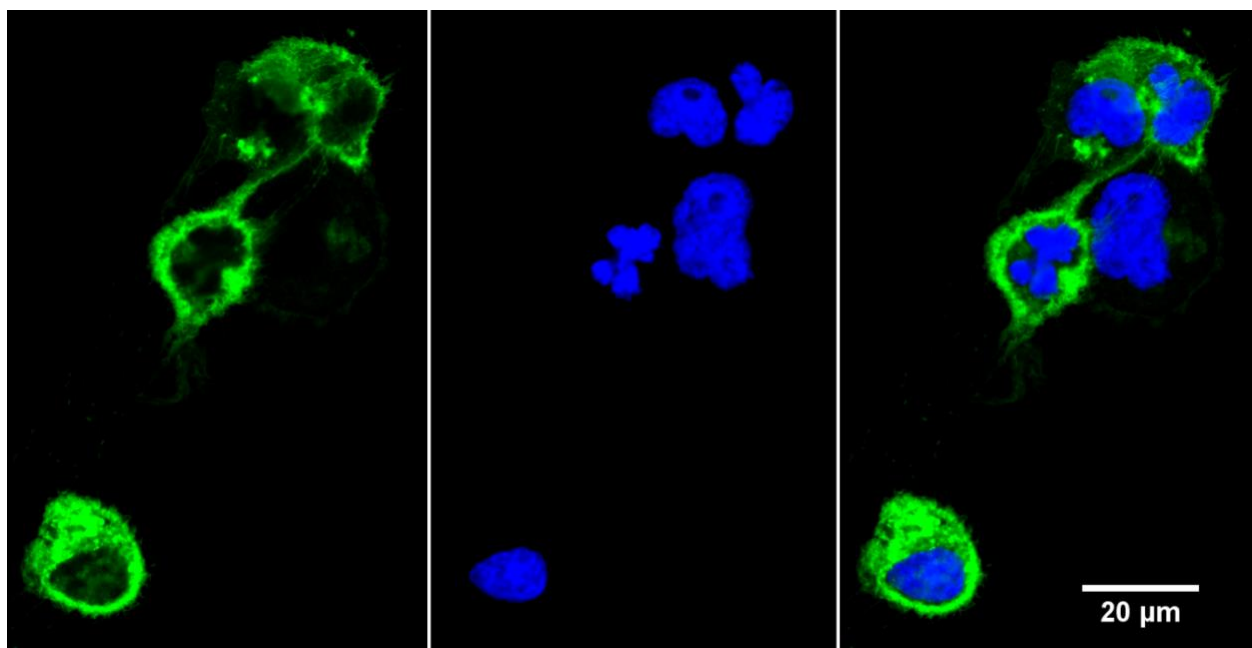
diferencijaciju su prikazani kao srednje vrednosti % ili MFI ekspresije \pm SD. * $p < 0.05$, izotipska kontrola Ab u odnosu na aIL-6R Ab (Wilcoxon-ov parni test).



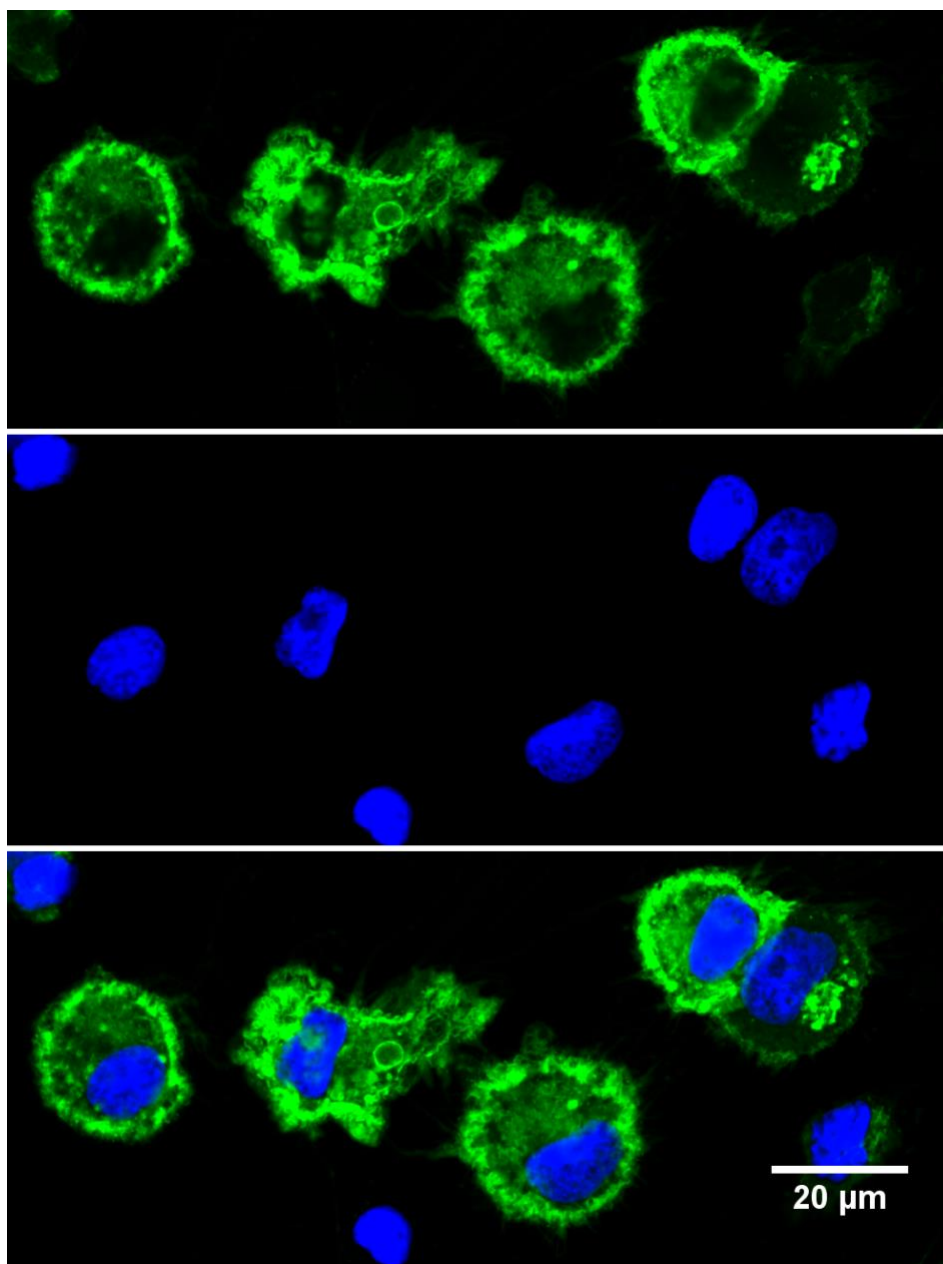
Grafikon 5.7.4. *Potencijal za diferencijaciju fDC loših respondera u prisustvu tocilizumaba.* fDC su diferencirane koristeći monocite loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. Ekspresija CD86, CD83 i HLA-DR je analizirana 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 μ g/ml). A) Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog eksperimenta obojeni specifičnim antitelima (sivi histogrami) ili izotipskom kontrolom (beli histogrami), a B) objedinjeni rezultati od 4 donora sa lošim potencijalnom za

diferencijaciju su prikazani kao srednje vrednosti % ili MFI ekspresije \pm SD. * $p < 0.05$, izotipska kontrola Ab u odnosu na aIL-6R Ab (Wilcoxon-ov parni test).

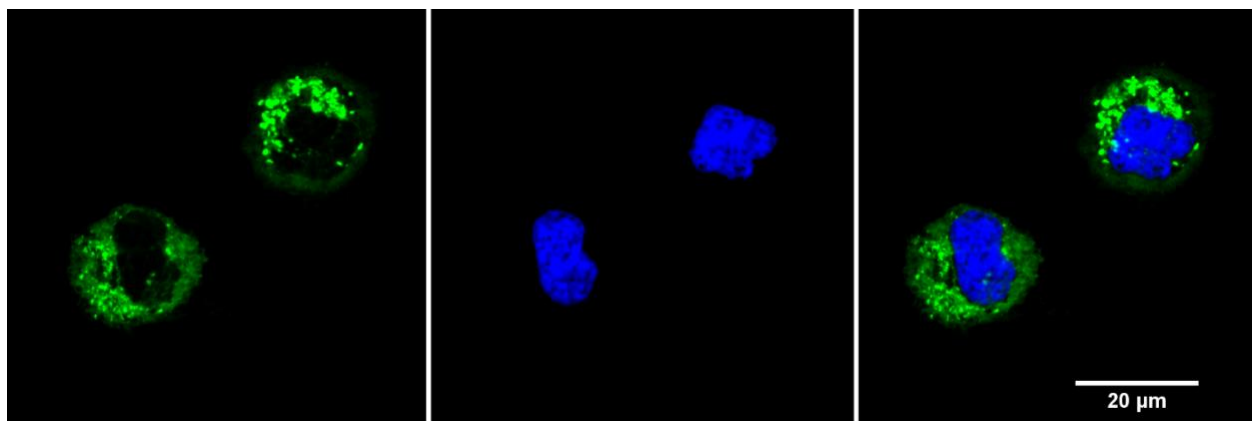
Analiza ćelija pomoću konfokalne mikroskopije je pokazala da fDC diferencirane u prisustvu tocilizumaba (**Slika 5.7.1**) imaju povećanu površinsku ekspresiju HLA-DR molekula, kao i brojne dendritske nastavke, što je uočeno i kod DC diferenciranih po standardnom protokolu (**Slika 5.7.2**). Sa druge strane, kontrolne fDC su ispoljavale HLA-DR pretežno u citoplazmi unutar vezikula, dok je na površini membrane uočena slaba ekspresija ovog molekula (**Slika 5.7.2**). Takođe, fDC su ispoljavale morfologiju sličniju makrofagima, nego DC.



Slika 5.7.1. DC diferencirane po ubrzanom protokolu u prisustvu tocilizumab. Monociti su diferencirani po ubrzanom protokolu pomoću Poly (I:C) 10 μ g/ml, u prisustvu tocilizumaba (5 μ g/ml). 48 časova nakon stimulacije, ćelije su sakupljene i pripremljeni su citospinovi. Preparati su obojeni HLA-DR Alexa488 Ab i Syto59, bojom za jedra, i analizirani pomoću konfokalne mikroskopije.

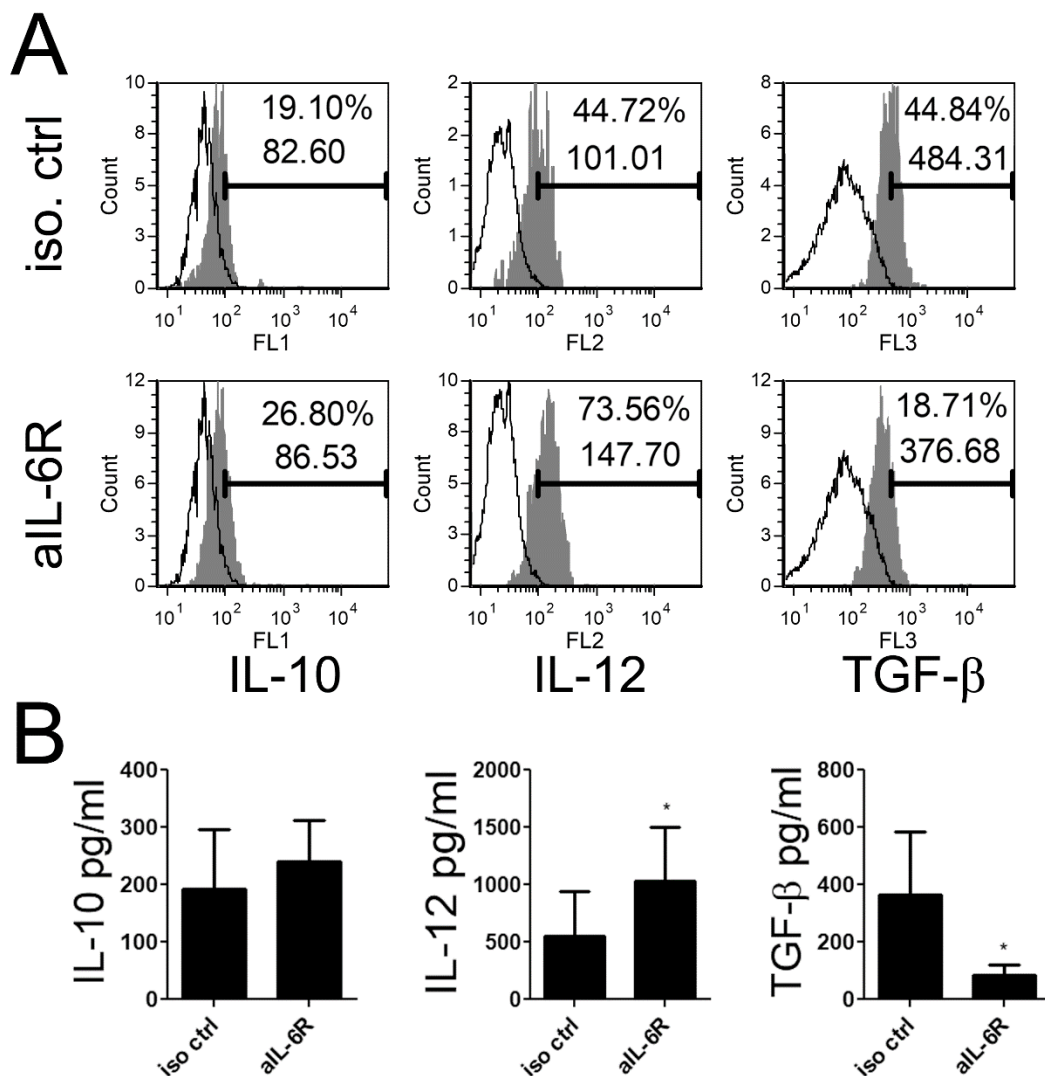


Slika 5.7.2. DC diferencirane po standardnom protokolu. Monociti su diferencirani po standardnom protokolu 5 dana i stimulisani sa Poly (I:C) 10µg/ml 48 časova. Nakon toga su ćelije sakupljene i pripremljeni su citospinovi. Preparati su obojeni HLA-DR Alexa488 Ab i Syto59, bojom za jedra, i analizirani pomoću konfokalne mikroskopije.

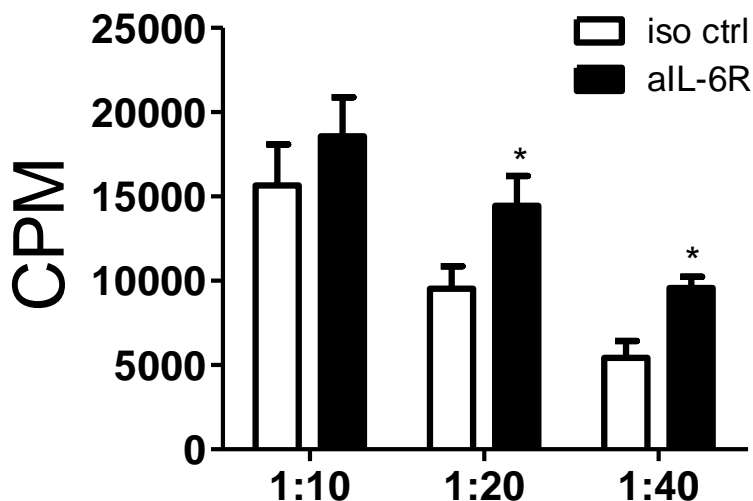


Slika 5.7.3. DC diferencirane po ubrzanom protokolu bez prisustva tocilizumaba. Monociti su diferencirani po ubrzanom protokolu pomoću Poly (I:C) 10 μ g/ml, u izotipskog antitela (5 μ g/ml). 48 časova nakon stimulacije, ćelije su sakupljene i pripremljeni su citospinovi. Preparati su obojeni HLA-DR Alexa488 Ab i Syto59, bojom za jedra, i analizirani pomoću konfokalne mikroskopije.

Osim poboljšanog sazrevanja fDC loših respondera, uočeno je da u prisustvu tocilizumaba, ove ćelije ispoljavaju značajno više IL-12p40, a značajno manje TGF- β , dok stepen ekspresije IL-10 nije zavisio od prisustva blokirajućeg aIL-6R antitela (**Grafikon 5.7.5 A**). Ovi rezultati su korelisali sa koncentracijama solubilnih produkata detektovanih u supernatantima kultura fDC (**Grafikon 5.7.5 B**). U skladu sa fenotipskom analizom i produkcijom citokina, fDC diferencirane u prisustvu tocilizumaba su značajno bolje stimulisale proliferaciju alogernih T ćelija, u poređenju sa fDC diferenciranim u prisustvu izotipskog antitela (**Grafikon 5.7.6**).

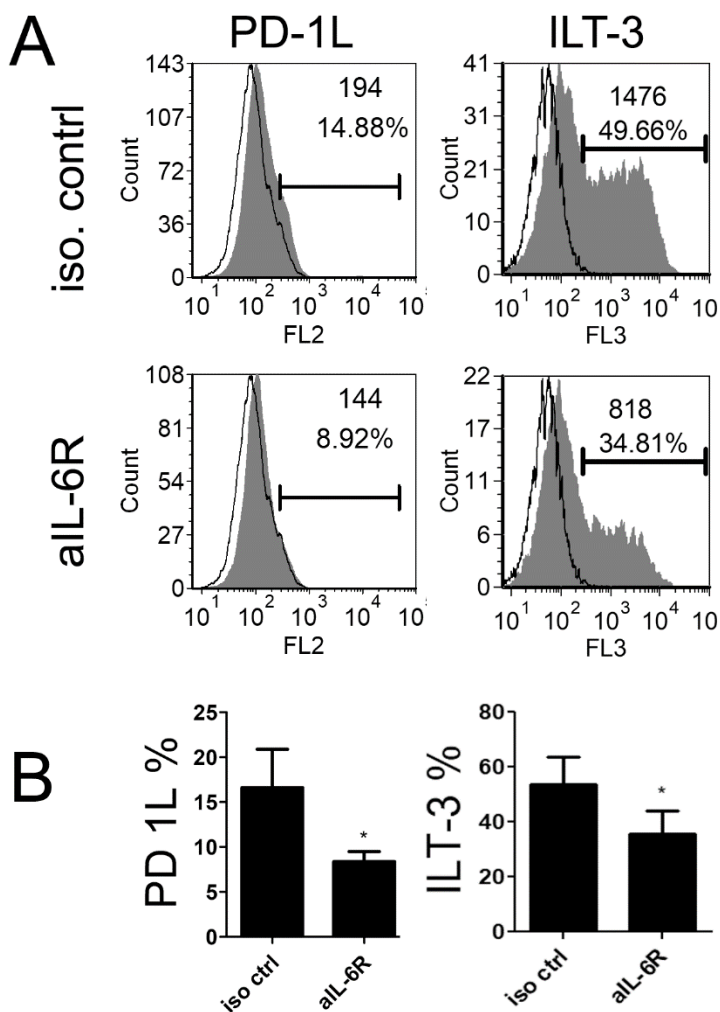


Grafikon 5.7.5. *Produkcija citokina fDC loših respondera u prisustvu tocilizumaba.* fDC su diferencirane koristeći monocite loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. A) Ekspresija IL-12p40, IL-10 i TGF-β je analizirana 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 μg/ml). Prikazana je reprezentativni histogrami iz jednog eksperimenta obojeni specifičnim antitelima (sivi histogrami) ili izotipskom kontrolom (beli histogrami), od 4 sa sličnim vrednostima. B) Koncentracije citokina su određene u supernatantima kultura nakon stimulacije. Prikazani su objedinjeni rezultati od 4 donora sa lošim potencijalom za diferencijaciju, kao srednje vrednosti pg/ml ± SD. *p<0.05, izotipska kontrola Ab u odnosu na aIL-6R Ab (Wilcoxon-ov parni test).

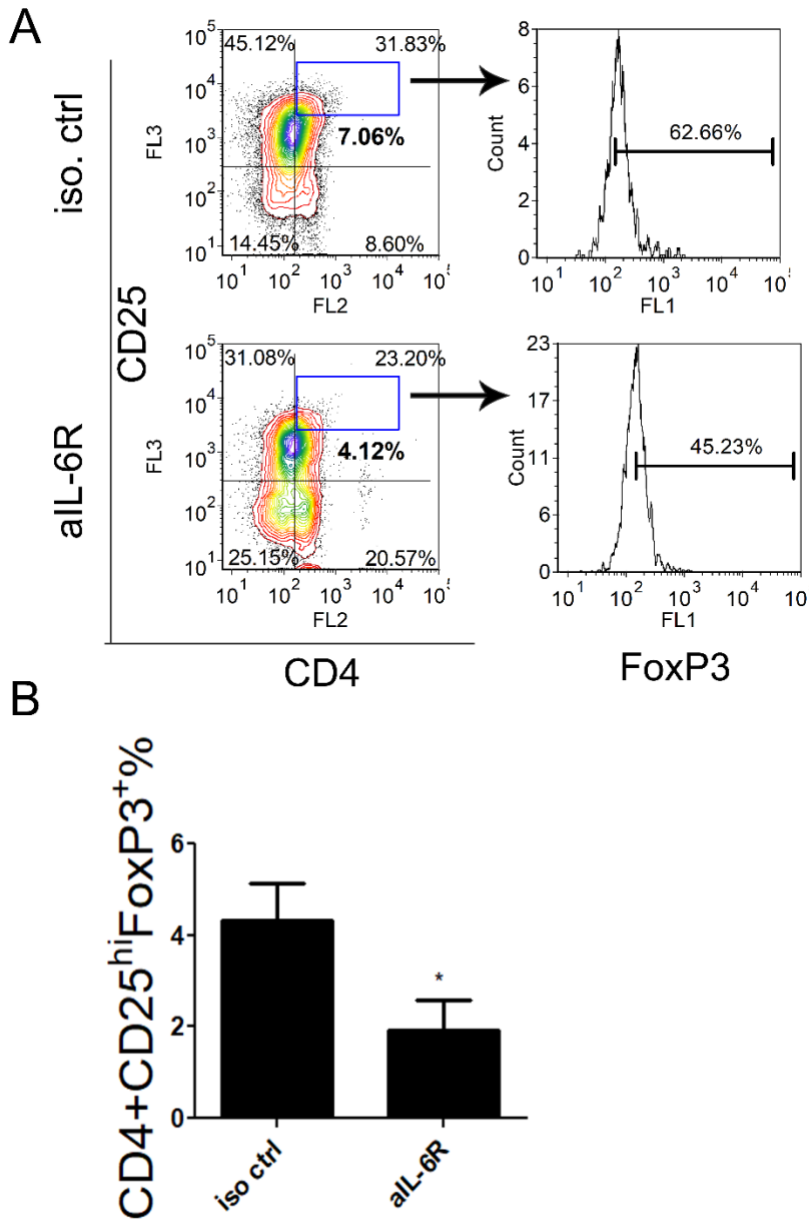


Grafikon 5.7.6. Alostimulatorni kapacitet fDC loših respondera diferenciranih u prisustvu tocilizumaba. fDC su diferencirane od monocita loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. Nakon toga, ćelije su kokultivisane sa alogenim CD3⁺ T ćelijama (1×10^5 /otvoru) u različitim brojnim odnosima tokom 5 dana. Proliferacija T ćelija je detektovana pomoću merenja inkorporisanog 3H timidina, a rezultati reprezentativnog eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost cpm \pm SD šestoplikata, od 4 sa sličnim vrednostima. * $p < 0.05$ aIL-6R Ab vs izotipska kontrola Ab.

Pored opisanih efekata tocilizumaba na povećanje imunogenosti fDC loših respondera, uočeno je da fDC diferencirane u prisustvu tocilizumaba ispoljavaju značajno manje tolerogenih markera PD1L i ILT-3 (Grafikon 5.7.7). Ovi rezultati su korelisali i sa smanjenim kapacitetom fDC diferenciranih u prisustvu tocilizumaba da indukuju CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ T ćelije u kulturi, u odnosu na kontrolne fDC tretirane izotipskim antitelom (Grafikon 5.7.8).



Grafikon 5.7.7. Ekspresija tolerogenih markera fDC loših respondera nakon diferencijacije u prisustvu tocilizumaba. fDC su diferencirane od monocita loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. A) Ekspresija PD-1L i ILT-3 je analizirana 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C) (10 μ g/ml). Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog eksperimenta iz uzoraka obojenih specifičnim antitelima (sivi histogrami) ili izotipskom kontrolom (beli histogrami), od 4 sa sličnim vrednostima. B) Prikazani su objedinjeni rezultati od 4 donora sa lošim potencijalom za diferencijaciju, kao srednje vrednosti % ekspresije \pm SD. * $p < 0.05$, izotipska kontrola Ab u odnosu na aIL-6R Ab (Wilcoxon-ov parni test).



Grafikon 5.7.8. Kapacitet fDC loših respondera diferenciranih u prisustvu tocilizumaba da indukuju Treg. fDC su diferencirane od monocita loših respondera, kako je opisano u materijalu i metodama, u prisustvu blokirajućeg aIL-6R ili izotipskog antitela. A) Ekspresija FoxP3 u okviru CD4+CD25^{hi} populacije T ćelija je analizirana nakon kokultivacije CD3⁺ T ćelija sa fDC, i tretiranih sa IL-2, kao što je opisano u materijalu i metodama. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta, dok su B) objedinjeni rezultati za 4 eksperimenata prikazani kao srednja vrednost % Treg ± SD. *p<0.05 fDC u odnosu na cDC (Wilcoxon-ov parni test).

6 Diskusija

6.1 Fenotipska i funkcionalna svojstva DC dobijenih protokolom ubrzane diferencijacije korišćenjem proinflamacijskog koktela

Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnost primene protokola za ubranu diferencijaciju humanih DC od monocita (fDC), i da se uporede fenotipska i funkcionalna svojstva ovako dobijenih ćelija sa DC dobijenim standardnim protokolom (cDC) (Pietschmann, Stockl, Draxler, Majdic, i Knapp, 2000; Romani i sar., 1996). Najčešće korišćen protokol za diferencijaciju humanih DC od monocita uključuje 5-dnevnu kultivaciju monocita u prisustvu GM-CSF i IL-4, nakon čega se dobijaju nezrele DC. U cilju stimulacije imunogenih osobina DC, koriste se različiti tipovi stimulusa koji indukuju promene u DC nalik onima koji se odigravaju u toku inflamacije. Najčešće primenjivan stimulus za sazrevanje DC je proinflamacijski koktel citokina (IL-6, IL-1 β , TNF- α i PGE-2) koji imitira inflamacijsko okruženje u organizmu, i koji je u kliničkoj primeni još poznat kao „zlatni standard”. Prve publikacije koje su opisale mogućnost primene ubranog protokola za diferencijaciju imunogenih DC iz monocita opisane su od strane Dauer i sar. (Dauer i sar., 2003; Obermaier i sar., 2003). Ovi autori su pokazali da je moguće diferencirati funkcionalno zrele DC nakon 2-3 dana kultivacije, koristeći pri tome iste uslove kultivacije kao kod standardnog protokola. Ramadan i sar. (Ramadan, Konings, Kurup, i Keever-Taylor, 2004) su potvrdili takvu mogućnost u modelu ispitivanja T ćelijskog odgovora na Aspergillus i CMV korišćenjem fDC. Pri tome je istaknuto da, osim što su fDC i cDC slične po kapacitetu za indukciju antigen-specifičnog odgovora T ćelija, protokol za fDC značajno smanjuje utrošak neophodnih sredstava, radne snage i vremena, pri čemu se dobija veći broj DC od monocita u odnosu na standardni protokol. Ovi inicijalni nalazi su bili vrlo atraktivni za primenu *in vitro* generisanih DC u kliničkim studijama imunoterapije tumora. Još i starije publikacije su ukazale na mogućnost značajnog skraćanja protokola za diferencijaciju DC od monocita. Naime Czerniecki i sar (Czerniecki i sar., 1997) i Faries i sar. (Faries i sar., 2001) su pokazali da monociti tretirani sa GM-CSF, a zatim aktivirani sa Ca jonoforom ili CD40L, vrlo brzo ispoljavaju markere zrelih DC. Santini i sar. (Santini i sar., 2000) su pokazali da stimulacija monocita pomoću GM-CSF i IFN- α , omogućava diferencijaciju DC za samo 3 dana, bez potrebe za bilo kakvom drugom stimulacijom. Ovi autori su pokazali da ovako tretirane DC ispoljavaju značajno više kostimulatornih molekula (CD80, CD86 i CD40), ali ne i marker zrelosti, CD83. Suprotno ovim nalazima, Curti i sar. (Curti, Ferri, Pandolfi, Isidori, i

Lemoli, 2004) su pokazali da monociti kultivisani po protokolu ubrzane diferencijacije ispoljavaju morfologiju sličniju monocitima nego DC. Takođe, ove ćelije su slabije stimulisale proliferaciju alogernih T ćelija, a na osnovu ekspresije CD14, CD86, HLA-DR i odsustva ekspresije CD83, autori su zaključili da fDC, najverovatnije nisu zrele DC, već aktivirani monociti. Treba istaći da je CD83 ključan marker imunogenih DC koje bi se mogle primeniti u imunoterapiji. Naime, Tze i sar (Tze i sar., 2011) su pokazali da CD83 deluje na povećanje MHC II klase i CD86 na DC tako što suprimira ubikvitinaciju i degradaciju MARCH-1 transkripcionog faktora. MARCH1 pripada familiji nedavno otkrivenih transmembranskih proteina (postoje virusne i sisarske varijante proteina) koji imaju ulogu ubikvitinaza, i smanjuju ekspresiju MHC i CD86, kao i drugih proteina na membrani (Tze i sar., 2011). IL-10 je jedan od ključnih faktora koji povećava transkripciju iRNK za MARCH1 kod DC aktiviranih sa LPS-om, što finalno prouzrokuje smanjenje ekspresije CD86 i MHC II klase na površini ovih ćelija. Tze i sar. su pokazali da transmembranski domen CD83 direktno oponira efektu MARCH1, a time omogućava povećanje imunogenosti DC, pogotovo u uslovima supresivne mikrosredine u tumoru ili hroničnim infekcijama. Stoga je vrlo važno da DC diferencirane po ubrzanom protokolu ispolje sve ključne markere zrelosti DC, jer se u suprotnom može očekivati niska efikasnost i potencijalno nepoželjni efekti tokom njihove primene u imunoterapiji tumora.

Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na činjenicu da potencijal monocita da se diferencira po ubrzanom protokolu u imunogene fDC zavisi od donora monocita. Naime, u prvom delu ispitivanja u kojima je korišćeno 10 različitih donora, 6 je identifikovano kao dobri responderi, dok je 4 pripalo grupi loših respondera. fDC dobrih respondera se u većini ključnih markera nisu fenotipski značajno razlikovali od cDC dobijenih od istih ćelija. U tom smislu su fDC dobrih respondera ispoljavale su visok stepen HLA-DR, CD86 i CD83 i produkovale IL-12 kao cDC od istih ćelija. Ovo je korelisalo sa dobrim kapacitetom ovakvih fDC za stimulaciju proliferacije aloreaktivnih T ćelija, što je i očekivano obzirom na poznatu ulogu ovih markera u komunikaciji sa T ćelijama (Snijders, Kalinski, Hilkens, i Kapsenberg, 1998). Sa druge strane, monociti loših donora su nakon ubrzane diferencijacije ispoljavale marker monocita CD14 više od 15%, i posedovale su znatno nižu ekspresiju CD1a molekula na površini. Nedavna klinička studija je pokazala da visok stepen ispoljenosti CD14 na DC negativno korelira sa indukcijom efikasnog imunskog odgovora na tumor kod pacijenata sa kancerom prostate (Castiello i sar., 2017). U skladu sa tim, fDC loših respondera su ispoljavale nizak nivo ekspresije CD83, HLA-DR, CD86, i produkovale su niske količine IL-

12, što je sve rezultovalo njihovim slabim kapacitetom da indukuju odgovor alogenih T limfocita. Ekspresija hemokinskih receptora CCR6 i CCR7 na membrani DC reguliše njihovu sposobnost migracije u različitim fazama sazrevanja. CCR6 je uglavnom ispoljen na nezrelim DC, i omogućava njihovu migraciju na mesto inflamacije u odgovoru na CCL20 (MIP-3 α), koga proizvode brojne ćelije, uključujući endotelne ćelije i monociti (Förster, Davalos-Misslitz, i Rot, 2008). U toku sazrevanja DC smanjuju ekspresiju CCR6, a povećavaju ekspresiju CCR7, koji vezuje hemokin CCL19 (MIP-3 β), a koga proizvode ćelije HEV-a (engl. high endothelial venules) limfnih čvorova. Ovakva promena u ekspresiji hemokinskih receptora omogućava zrelim DC migraciju u lokalni limfni čvor gde aktiviraju antigen-specifične T ćelije (Sallusto i sar., 1998). U skladu sa tim bi se moglo zaključiti da fDC dobijene pomoću proinflamacijskog koktela ispoljavaju manji kapacitet za migraciju u limfne čvorove u odnosu na cDC istih donora, pri čemu je ta sposobnost nešto veća kod fDC dobrih respondera.

fDC loših respondera su pored lošijeg fenotipa, indukovale i slabiju produkciju IFN- γ i IL-5 od strane aloreaktivnih T ćelija, ali ne i IL-17 i IL-10. Smanjena produkcija Th2 citokina, kao što je IL-5, od strane fDC se može interpretirati kao potencijalno poželjan efekat u imunoterapiji tumora. Naime, na mišijim modelima je pokazano da IL-5 olakšava formiranje metastaza u plućima iz različitih tumora, kao što su melanom i kolorektalni karcinom. Genetsko uklanjanje IL-5 i njegova blokada, štite pluća od metastaza, dok egzogena aplikacija IL-5, ili adoptivni transfer eozinofila u miševе kojima je genetski uklonjen IL-5, potpomaže formiranje plućnih metastaza (Zaynagetdinov i sar., 2015). Međutim, smanjeni kapacitet fDC da indukuju anti-tumorski IFN- γ nije poželjna osobina za anti-tumorsku terapiju, obzirom na ulogu ovog citokina u odgovoru na tumor (Ikeda, Old, i Schreiber, 2002). Smanjeni kapacitet fDC loših respondera da indukuju IFN- γ se može objasniti činjenicom da ove ćelije imaju slabiji kapacitet da proizvode IL-12. IL-12 je najvažniji faktor stimulacije produkcije IFN- γ od strane T ćelija, i njegova povećana sekrecija korelira sa dobrom prognozom kod pacijenata sa tumorom (R. M. Steinman, Hawiger, i Nussenzweig, 2003). IL-23, iako sâm ne indukuje ekspresiju ROR γ T i diferencijaciju IL-17-provodećih Th17 ćelija, predstavlja ključan citokin za ekspanziju i održavanje Th17 odgovora (Korn, Bettelli, Oukka, i Kuchroo, 2009). Pokazano je da su TGF- β i IL-6 neophodni za indukciju ekspresije ROR γ T transkripcionog faktora i diferencijaciju Th17 ćelija. TGF- β je takođe ključan faktor indukcije Treg, svojstvene po tome što proizvode supresivni IL-10 citokin (Travis i Sheppard, 2014). Iako u eksperimentima sa fDC stimuliranim proinflamacijskim koktelom, nije merena produkcija TGF-

β , ovaj citokin je prisutan u FCS korišćenom u kultivaciji DC (Oida i Weiner, 2010). Pored toga, činjenica da monociti loših respondera proizvode veću količinu IL-6 u ranim fazama kulture, kao i da nemaju smanjenu produkciju IL-23, može objasniti stabilan kapacitet fDC da indukuju produkciju IL-17. Uloga Th17 ćelija u tumoru je još uvek kontradiktorna. Naime, pokazano je da Th17 ćelije stimulišu angiogenezu i aktivnost imunosupresivnih ćelija, a time potenciraju rast tumora. Sa druge strane, ove ćelije stimulišu i nakupljanje efektorskih CD8⁺ T ćelija u tumoru, i same se mogu diferencirati ka Th1 fenotipu, pri čemu proizvode IFN- γ (Asadzadeh i sar., 2017). Uloga IL-17 u imunskom odgovoru na tumor zavisi pre svega od prisustva drugih citokina, kao što je IFN- γ . Na osnovu toga bi se moglo pretpostaviti da je kapacitet fDC loših donora da izazovu efikasan anti-tumorski odgovor nedovoljan.

Obzirom da se kod loših respondera može očekivati dobijanje fDC sa lošim imunogenim osobinama, postoji veliki rizik za primenu ovakvih ćelija u imunoterapiji tumora. Stoga je jedan od ciljeva bio da se ispita koje fenotipske i funkcionalne osobine monocita mogu da identifikuju njihov potencijal da se diferenciraju u imunogene fDC. Rezultati su pokazali da sposobnost monocita da se diferenciraju u imunogene fDC zavisi od sposobnosti da proizvode IL-6 i IL-1 β nakon 24 časa kultivacije. Chomarat i sar (Chomarat i sar., 2000) su pokazali da IL-6 preusmerava diferencijaciju humanih monocita ka makrofagima, pre svega tako što povećava ekspresiju receptora za M-CSF na monocitima, a time i odgovor ovih ćelija na autokrino proizveden M-CSF. Isti autori (Chomarat i sar., 2003) su pokazali da TNF- α ima suprotan efekat, tako što smanjuje ekspresiju receptora za M-CSF na monocitima, čime potencira njihovu diferencijaciju u DC. Nasuprot razlici koja je uočena između dobrih i loših respondera u produkciji IL-6, monociti dobrih i loših respondera se nisu značajno razlikovali u kapacitetu za produkciju TNF- α . Zbog toga je verovatno visoka produkcija IL-6, i visok odnos produkcije IL-6/TNF- α od strane monocita presudna za njihov slabiji kapacitet diferencijacije u DC. Osim IL-6, pokazano je i da drugi citokini koreliraju sa lošim potencijalom monocita za diferencijaciju u DC, kao što je IL-1 β i M-CSF. IL-1 β ima sličan efekat na povećanje ekspresije receptora za M-CSF kao i IL-6 (Chomarat i sar., 2003). M-CSF je od ranije poznat kao ključan citokin za diferencijaciju monocita u makrofage (Banchereau i sar., 2000; Romani i sar., 1994; Sallusto i Lanzavecchia, 1994), što može objasniti prisustvo morfologije makrofaga kod fDC loših respondera, kao i prisustvo markera makrofaga (CD14, CD33) na ovim ćelijama. Za razliku od IL-6 i IL-1 β , produkcija IL-8 od strane monocita loših respondera je bila manja od produkcije ovog citokina od strane dobrih respondera. Još uvek

nije poznato kako IL-8 modulira diferencijaciju monocita u DC ili makrofage. Poznato je da ovaj hemokin proizvode brojne ćelije, uključujući monocite i DC, kao i to da IL-8 hemotaktički deluje na polimorfonuklearne ćelije, DC, i T ćelije, ali ne i na monocite. Alfaro i sar. (Alfaro i sar., 2011) su pokazali da IL-8, koji tumorske ćelije proizvode u velikoj količini, ne smanjuje sposobnost DC da indukuju aktivaciju i diferencijaciju T ćelija, iako može uticati na migratornu sposobnost DC. Naime, ovi autori su pokazali da prethodni tretman DC sa IL-8 ograničava njihovu migraciju na IL-8 zavisne stimulanse usled desenzitizacije receptora, na osnovu čega se DC zadržavaju u tkivu tumora i ne migriraju u limfni čvor gde mogu aktivirati T ćelije koje takođe migriraju u pravcu gradijenta IL-8. Na osnovu toga se može zaključiti da je niska produkcija IL-8 od strane monocita loših respondera odraz njihovog slabog kapaciteta da privuku i stimulišu T ćelije, o čemu govori i njihov slabiji kapacitet da ispolje kostimulatorne molekule, dok je najverovatnije da ne postoji direktni efekat ovog citokina na potencijal za diferencijaciju monocita u DC.

Monociti loših respondera su ispoljavali više CD16 na membrani, kao i manje CD36 i CD69, u odnosu na monocite dobrih respondera. CD16 je jedan od aktivacionih markera monocita. Sanchez-Torres i sar (Sánchez-Torres, García-Romo, Cornejo-Cortés, Rivas-Carvalho, i Sánchez-Schmitz, 2001) su pokazali da DC poreklom od CD16+ monocita ispoljavaju niži stepen CD1a, u poređenju sa DC poreklom od CD16- monocita. Nakon stimulacije sa LPS-om, DC poreklom od CD16+ monocita su proizvele manje IL-12p70 i više TGF- β od DC poreklom od CD16- monocita, a u kulturi sa T ćelijama su indukovale snažniji Th2 odgovor. Ovi rezultati, iako urađeni na drugačijem modelu DC, govore da stepen ekspresije CD16 na monocitima negativno korelira sa imunogenošću DC, na šta ukazuju i rezultati naših istraživanja. Do sada nije poznato kako ekspresija CD36 i CD69 na monocitima utiče na njihovu sposobnost diferencijacije u DC. CD69 lektinski molekul je uključen u aktivaciju 5-lipooksigenaznog puta za produkciju leukotrijena od strane monocita. Aktivacija CD69 na monocitima izaziva inluks Ca i povećanu produkciju arahidonske kiseline i LTB4 od strane ovih ćelija (De Maria i sar., 1994). Pokazano je da se CD69 ispoljava nakon aktivacije DC i ima značajnu ulogu u njihovoj migraciji iz kože u lokalne limfne čvorove u odgovoru na svingozin-1-fosfat (Lamana i sar., 2011). Sa druge strane, CD36 spada u receptore čistače i uključen je u prepoznavanje oksidovanih LDL partikula i apoptotskih ćelija, a pretpostavljena je i njegova uloga u procesu ukrštene prezentacije od strane DC (Belz i sar., 2002). Uzimajući u obzir ove rezultate, moguće je da je povećana ekspresija CD36 i CD69 na monocitima

dobrih respondera rezultat njihovog većeg potencijala da odgovore na proinflamacijski stimulus povećanjem imunogenosti, a ne uzrok dobrog potencijala za diferencijaciju u DC.

6.2 Vijabilnost i funkcionalne osobine DC nakon stimulacije sa Poly (I:C) i TNF- α

Brojni radovi su pokazali da proinflamacijski koktel (IL-1 β , IL-6, PGE-2 i TNF- α) ne stimuliše značajnu produkciju IL-12 od strane DC, i sledstveno tome Th1 imunski odgovor (Palucka, 2013). Pored toga, pokazano je da IL-1 β , IL-6, (Chomarat i sar., 2000; Chomarat i sar., 2003) i PGE-2 (Sharma i sar., 2003), inhibiraju diferencijaciju monocita u DC i sledstvene funkcije DC kao što su migracija, produkcija IL-12 i indukcija Th1 imunskog odgovora. Ovo je u skladu sa nalazom da visoka produkcija IL-6 i IL-1 β kod pacijenata sa uznapredovalim stadijumima kancera pankreasa korelira sa lošom prognozom za pacijente (Mitsunaga i sar., 2013). Osim toga, PGE-2 je ključan faktor za indukciju supresivnih populacija imunskih ćelija u tumoru iz monocita (Obermajer i Kalinski, 2012; Sinha, Clements, Fulton, i Ostrand-Rosenberg, 2007). Iako inhibiraju diferencijaciju DC, uticaj ovih medijatora da funkcije već diferenciranih DC je stimulatoran, što je i razlog njegovog korišćenja u standardnom protokolu diferencijacije DC. Međutim, u protokolu za fDC, neki od ovih citokina mogu inhibirati odgovor nedovoljno diferenciranih monocita. Stoga je u narednom koraku ispitano, da li dugi stimulusi mogu povećati efikasnost dobijanja imunogenih fDC. Pokazano je da tretman nezrelih DC sa TLR3 agonistom dovodi do snažnog sazrevanja i Th1 polarišućih svojstava ovih ćelija (Dzopalic i sar., 2012; Verdijk i sar., 1999). Međutim, pojedini podaci su pokazali da poly (I:C) ima i pro-apoptotski efekat na DC, i da može izazvati apoptozu DC aktiviranjem kaspaza preko domena smrti (engl. Fas associated death domains, FADD), ili indukcijom TRIF molekula koji ne zavisi od aktivnosti kaspaza (Weber i sar., 2010). U ovom radu je pokazano da Poly (I:C) u dozi od 50 μ g/ml značajno povećava procenat apoptotskih DC. Spisek i sar. (Spisek, Bretaudeau, Barbieux, Meflah, i Gregoire, 2001) su u svojim istraživanjima pokazali sličan efekat Poly (I:C) kao što je dobijeno u ovom radu, dok su Lehner i sar. (Lehner i sar., 2012) demonstrirali da Poly (I:C) primenjen u manjoj dozi (20 μ g/ml) tokom 3 dana kultivacije izaziva još izraženiju apoptozu DC. Pokazano je da Poly (I:C) indukuje apoptozu DC tako što povećava ekspresiju pro-apoptotskih proteina, kao što je BAK (Lehner i sar., 2012). Ovi autori su pokazali da povećanje ekspresije BAK zavisi od indukcije IFN tipa 1 i aktivnosti kaspaze (Yen i Ganea, 2009), što može objasniti molekularnu osnovu efekata visokih doza Poly (I:C) dobijenih u ovoj studiji. Nekoliko sudija je pokazalo da se proapoptotski efekat Poly (I:C)

može prevazići istovremenom ligacijom TNF- α ili CD40L (Lehner i sar., 2012; McIlroy i Gregoire, 2003; Spisek i sar., 2001). Sa druge strane je pronađeno da efekat TNF- α , kao i efekat drugih agonista TNF superfamilije receptora, može biti ili proapoptotski ili anti-apoptotski (Bianchi i Meier, 2009), što najverovatnije zavisi od stepena aktivacije NF- κ B. NF- κ B je ključan TF koji integriše brojne signalne u ćeliji i učestvuje u regulaciji apoptoze i preživljava pod dejstvom ovih signala (Kriehuber i sar., 2005). U skladu sa time je pokazano da i Poly (I:C) i TNF- α izazivaju apoptozu DC, ali kada se koriste u kombinaciji, procenat apoptotskih ćelija je značajno manji nego kada se ovi agonisti koriste pojedinačno. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u skladu sa prethodno objavljenim (Lehner i sar., 2012), a u suprotnosti sa rezultatima objavljenim od strane Spisek i sar. (Spisek i sar., 2001), gde je ukazano da kombinacija Poly (I:C) i TNF- α dodatno potencira apoptozu DC. Veće preživljavanje DC stimulisanih kombinacijom Poly (I:C) i TNF- α bi moglo povećati i produžiti anti-tumorski odgovor nakon primene ovakvih ćelija u imunoterapiji tumora. Međutim, efekat kombinacije Poly (I:C) i TNF- α na imunogene funkcije DC nije bio do sada dovoljno ispitan. Prethodno je efekat kombinacije Poly (I:C) i TNF- α bio upoređivan sa efektima proinflamacijskog koktela kao zlatnog standarda (Pedersen i sar., 2005; Spisek i sar., 2001) ili sa efektima nezrelih DC (Spisek i sar., 2003). Međutim, poređenjem efekta kombinacije, sa efektom pojedinačnih agonista, je pokazano da kombinacija ne dovodi do značajnog poboljšanja Th1 polarizacijskih svojstava DC, već naprotiv, dovodi do smanjenja % IFN- γ + Th1 ćelija u poređenju sa efektom samog Poly (I:C). Indukcija Th1 ćelija od strane DC je ključno za indukciju efikasnog imunskog odgovora na tumor (Palucka i Banchereau, 2013). Zbog toga je detaljnije ispitano kako kombinacija Poly (I:C) i TNF- α , u različitim dozama i dužinama stimulacije, utiče na ključne funkcije DC dobijenih standardnom procedurom, a sa ciljem primene iste kombinacije u protokolu za dobijanje fDC.

Ranije je pokazano da Poly (I:C) izaziva maturaciju DC i povećava ekspresiju kostimulatornih (CD80, CD86 i CD40) (Cella i sar., 1999; Rouas i sar., 2004) i adhezivnih molekula (ICAM-1) (Dubey, Croft, i Swain, 1995), što je u skladu sa rezultatima dobijenim i u ovoj studiji. Osim toga, Poly (I:C) indukuje i ekspresiju CD83 molekula (Cella i sar., 1999; Rouas i sar., 2004), što je ključno za stabilnost maturacije DC (Tze i sar., 2011), pogotovo u mikrosredini nekih tumora koja se odlikuje povećanim prisustvom IL-10. U skladu sa zrelim fenotipom, DC stimulisane sa Poly (I:C) indukuju i snažan proliferativni odgovor aloreaktivnih CD4+T ćelija (Dragičević i sar., 2011), što je potvrđeno i u ovim ispitivanjima. U kokulturi sa alogenim CD4+ T ćelijama, DC stimulisane

sa Poly (I:C) su indukovale snažnu ekspresiju IFN- γ , i delimično povećale ekspresiju IL-17 i IL-10 u T limfocitima. Snažan efekat na povećanje ekspresije IFN- γ u CD4+T ćelijama se može objasniti stimulatornim efektom ovog agonista na produkciju IL-12 od strane DC (Rouas i sar., 2004). Roses i sar. (Roses i sar., 2008) su pokazali da niske doze Poly (I:C) (1,25 $\mu\text{g/ml}$) ne stimulišu produkciju IL-23, odnosno Th17 polarišuću sposobnost DC. Sličan rezultat su pokazali i Carmodye i sar. (Carmody, Ruan, Liou, i Chen, 2007), ali su takođe pokazali da visoke doze Poly (I:C) (50 $\mu\text{g/ml}$), osim indukcije ekspresije IL-12p70 (p40/p35), indukuju i ekspresiju p19, jedne od subjedinica IL-23 (p40/p19). Srednje doze Poly (I:C) (25 $\mu\text{g/ml}$) su u našim prethodnim ispitivanjima potencirale delimičnu Th17 polarišuću sposobnost DC (Dragicevic i sar., 2012), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Osim delimične indukcije IL-17, DC stimulisane sa Poly (I:C) su indukovale ekspresiji IL-10 u Th ćelijama. IL-10 je važan anti-inflamacijski citokin koji ispoljava inhibitorno dejstvo na Th1 ćelije, pogotovo u uslovima kada prevelika stimulacija Th1 imunskog dogovora može dovesti do patoloških stanja. U tom smislu IL-10 ima protektivnu ulogu (Saraiva i sar., 2009). Stoga, snažna stimulacija DC sa poly (I:C) izaziva balansirani odgovor Th1, Th17 i IL-10-produkujućih T limfocita, verovatno istovremenom aktivacijom proinflamacijskih signala zajedno sa mehanizmima negativne povratne sprege. Prethodna istraživanja su pokazala da rast tumora može biti potenciran usled supresije koju indukuje IL-10 (Saraiva i sar., 2009; Trinchieri, 2007), ali su pokazani i drugačiji rezultati. Naime, Tanikawa i sar (Tanikawa i sar., 2012) su uočili da se u tumoru i drenirajućem limfnom čvoru IL-10-/- nokaut miševa nalazi veći broj mijeloidnih supresora (MDSC) i FoxP3+ Treg. Ovi rezultati ukazuju na to da povećana produkcija IL-10, pogotovo zajedno sa indukcijom Th1 i Th17 odgovora, može imati koristan efekat u imunoterapiji tumora, što je, naravno, neophodno nezavisno ispitati.

Za razliku od Poly (I:C), TNF- α je indukovao slabu alostimulatornu sposobnost DC, što se može objasniti činjenicom da ovaj citokin indukuje samo delimičnu maturaciju DC, pre sve ga MHC II klase i kostimulatornih molekula, kao i nisku produkciju pro-inflamacijskih citokina (Lutz i Schuler, 2002). Na osnovu ovih zapažanja, Lutz i sar. (Lutz i Schuler, 2002) su zaključili da je glavni nedostatak TNF- α u protokolu za stimulaciju imunogenih DC, to što predstavlja slab stimulus, kome je neophodno dugo vremena da indukuje homogeno sazrevanje DC. DC stimulisane sa TNF- α su u kulturi sa T limfocitima izazivale samo delimičnu ekspanziju Th1 ćelija, dok je efekat na Th17 ćelije bio izraženiji. DC tretirane kombinacijom Poly (I:C) i TNF- α

su ispoljavale slabiji alostimulacijski kapacitet nego ćelije tretirane pojedinačnim stimulusima. Osim toga, uočeno je da DC tretirane kombinacijom slabije indukuju Th1 i Th17 odgovor aloreaktivnih T limfocita, dok je ekspresija IL-10 bila potencirana. Iako IL-10 može imati korisne efekte u tumoru (Tanikawa i sar., 2012), istovremeno smanjenje Th1 odgovora se ne može uzeti kao povoljan efekat za imunoterapiju tumora. Stoga zaključak prethodnih studija (Pedersen i sar., 2005; Spisek i sar., 2003; Spisek i sar., 2001), da kombinacija Poly (I:C)/TNF- α potencira Th1-polarišuću sposobnost DC, može biti tačna ako se za komparaciju koriste DC tretirane proinflamacijskim koktelom, ali ne ako se za komparaciju koriste DC tretirane samo sa Poly (I:C). Inhibitorni efekat kombinacije na Th1 i Th17 polarizacionu sposobnost DC nije mogao da se oporavi ni posle dodatne stimulacije DC sa CD40L, ključnim signalom koje DC dobijaju od strane T ćelija (Palucka i Banchereau, 2013). U ovom model sistemu je uočen značajno jači efekat DC tretiranih kombinacijom TNF- α i Poly (I:C) na stimulaciju ekspresije IL-10 u T ćelijama. Stoga se može zaključiti da u prisustvu T ćelija, DC tretirane ovom kombinacijom dodatno imaju povećan tolerogeni potencijal. Ovakva pretpostavka je potvrđena i na osnovu merenja ekspresije ILT-3 markera na DC aktiviranim sa CD40L. ILT3 je na DC tretiranim kombinacijom bio ispoljen značajno više u odnosu na DC tretirane pojedinačnim stimulusima. Ovaj molekul spada u koinhibitorne receptore koji sadrže ITAM (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif), i predstavlja ključan marker tolerogenih DC. Pokazano je da je ILT-3 uključen u indukciju anergije aloreaktivnih CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ T ćelija, i njihovu konverziju u Treg (Chang i sar., 2002). Osim toga, pokazano je da blokada ovog molekula značajno smanjuje kapacitet tolerogenih DC da indukuju CD4⁺CD25^{hi}CD39⁺IL-10⁺FoxP3⁺ Treg (Đokić, Tomić, Marković, Milosavljević, i Čolić, 2013). Kim Šulc (Kim-Schulze) i sar. (Kim - Schulze i sar., 2006) su pokazali da jedan od produkata stimulacije sa Poly (I:C), IFN- α (Ngoi, Tovey, i Vella, 2008), zajedno sa IL-10, može indukovati povećanu ekspresiju ILT-3 od strane endotelnih ćelija i DC *in vitro* i *in vivo* (Manavalan i sar., 2004). Međutim, ostalo je nejasno da li su pored ILT-3 aktivirani drugi regulatorni mehanizmi nakon interakcije DC sa IL-10 produkujućim T ćelijama u kulturi, što ostaje da se dodatno istraži.

Još uvek nije potpuno jasno kako signalni putevi pokrenuti istovremeno sa poly (I:C) i TNF- α međusobno interaguju u kontroli sazrevanja i funkcija DC, pre i nakon njihove dodatne aktivacije sa CD40L. Sa jedne strane, aktivacija TLR3 pokreće interferon regulatorni faktor 3 (IRF3), NF-

kB i aktivacioni protein (AP1) preko adaptorskog TRIF proteina (Kumar, Kawai, i Akira, 2009). Aktivacija NF-kB je regulisana preko 2 nezavisna signalna puta koji se sumiraju na nivou kompleksa I κ B kinaza (IKK): receptor interagujući protein 1 (RIP-1) i TRAF 6 (engl. TNF-receptor associated factor 6) molekula. Sa druge strane, TNF- α pokreće signalni put preko TNF receptora tipa 1 (TNFR1) koji prenosi signal preko TNFR1-protenina asociranog sa domenom smrti (TRADD) i FADD (29). TRADD aktivira FADD, RIP1 i faktor 2 asociran sa TNF receptorom (TRAF2). TRAF2/3 i RIP1 aktiviraju MAPK kinazni put u daljoj signalizaciji (Balkwill, 2009; Kumar i sar., 2009; T. H. Lee i sar., 2003; Meylan i sar., 2004). CD40 takođe aktivira TRAF2/MAPK signalni put, ali istovremeno aktivira i TRAF-6/STAT3, Akt/PIK3 i NF-kB signalne puteve. Na osnovu toga se može pretpostaviti da RIP1 predstavlja ključnu tačku interakcije između signalnih puteva pokrenutih sa TLR3, CD40 i TNFR, koji regulišu preživljavanje i funkciju DC. Pokazano je da je RIP-1 ključni regulator aktivnosti NF-kB, kako u ranim fazama imunskog odgovora pokrenutim preko TLR3, tako i u kasnim fazama odgovora posredovanim sa TNF- α (Meylan i sar., 2004).

Na osnovu ovih ispitivanja se može zaključiti da TNF- α povećava preživljavanje DC stimuliranih sa Poly (I:C), ali smanjuje kapacitet ovih ćelija da indukuju Th1 i Th17 odgovor, najverovatnije zbog dodatne aktivacije regulatornih imunskih mehanizama koji uključuju ILT-3 zavisnu indukciju regulatornih T ćelija.

6.3 Fenotipske i funkcionalne osobine DC dobijenih ubrzanim protokolom pomoću Poly (I:C)

Uzimajući u obzir prethodne rezultate da proinflamacijski koktel koji sadrži potencijalno inhibitorne faktore za diferencijaciju DC (Chomarat i sar., 2000; Chomarat i sar., 2003; Sharma i sar., 2003) i ne stimuliše dovoljno produkciju IL-12 i Th1 polarizaciju imunskog odgovora od strane DC (Palucka i Banchereau, 2013), u sledećem koraku je ispitano da li Poly (I:C) može povećati imunogenost DC dobijenih ubrzanom diferencijacijom, pre svega kod monocita loših respondera. Pri tome je, na osnovu ispitivanja na cDC odabrana doza Poly (I:C) od 10 ili 25 μ g/ml, koja ne izaziva značajno smanjenje vijabilnosti ovih ćelija, i nije korišćen TNF- α zbog inhibitornog efekta na funkcije DC indukovane sa Poly (I:C).

U ovom delu istraživanja je pokazano da Poly (I:C), kao snažan stimulator Th1 polarizacije imunskog odgovora od strane DC (Verdijk i sar., 1999) i dalje ne može indukovati imunogene

osobine fDC dobijenih od monocita loših respondera. Čak šta više, pokazano je da Poly (I:C) potencira tolerogene osobine kod ovakvih ćelija, što je zaključeno na osnovu povećane ekspresije CD14, slabog kapaciteta za sazrevanje, slabe stimulacije proliferacije aloreaktivnih T limfocita, indukcije Th2 polarizacije i potenciranja ekspresije tolerogenih markera ILT3 i IDO-1, koji nishodno učestvuju u indukciji regulatornih CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ T ćelija. Pri tome slabiji odgovor fDC od loših respondera nije zavisio od postupka krioprezervacije ili primene veće koncentracije Poly (I:C). I u ovom modelu fDC je pokazano da veće doze Poly (I:C) povećavaju apoptozu DC (20-30%), što je u skladu sa prethodnim rezultatima na cDC. Lehner i sar (Lehner i sar., 2012) su pokazali da slične doze Poly (I:C) (20 µg/ml) indukuju oko 50% Aneksin-V⁺ (apoptotnih) ćelija nakon 3 dana kultivacije. Osim duže kultivacije, izraženiji efekat Poly (I:C) na apoptozu DC u studiji Lehner i sar se može objasniti i time da su autori koristili medijum bez seruma, koji inače sadrži faktore preživljavanja DC (L. Wang i sar., 2008). Ranije je pokazano da su monociti relativno osetljivi na postupak krioprezervacije (Silveira, Wowk, Machado, dos Santos, i Bordignon, 2013), što može objasniti njihovo slabije fenotipsko sazrevanje u eksperimentima u kojima su PBMC prethodno bili zamrzavani. Iskustva u okviru naše grupe ukazuju da krioprezervacija PBMC daje bolje rezultate u pogledu kvaliteta dobijenih DC, u odnosu na krioprezervaciju izolovanih monocita. Dakle, i sveže i krioprezervirane PBMC se mogu koristiti za izolaciju monocita kao prekursora DC *in vitro*. Truksova (Truxova) i sar (Truxova i sar., 2014) su prethodno pokazali da DC dobijene trodnevnom i petodnevnom diferencijacijom sa GM-CSF/IL-4 i 24-časovnom stimulacijom sa Poly (I:C), imaju dobar potencijal za terapijsku primenu. Iako su autori pokazali da njihove DC imaju visoku ekspresiju CD14 i slabu produkciju IL-12p70, zaključak je donet na osnovu sličnog kapaciteta ovih ćelija za internalizaciju i prezentaciju virusnih i bakterijskih antigena, kao i na osnovu kapaciteta da indukuju antigen-specifičnu proliferaciju CD8⁺T ćelija. Sličan zaključak, da fDC dobijene nakon 3 ili 4 dana, imaju istu ili bolju sposobnost za prezentaciju antigena u odnosu na cDC, je donesen i na osnovu drugih eksperimenata (Bürdek i sar., 2010; Chiang i sar., 2011). Bürdek i sar (Bürdek i sar., 2010) su uočili veću ekspresiju HLA-DR na fDC u odnosu na cDC istih donora, što je u skladu sa rezultatima ove studije. Međutim, veća ekspresija HLA-DR i prezentacija antigena ne mora neminovno da dovede do boljeg imunskog odgovora na taj antigen, tj. od nivoa samog HLA-DR, ne zavisi imunogenost DC. Ako je dobra prezentacija antigena praćena lošom kostimulacijom, i obrnuto, imunski odgovor se usmerava u pravcu povećane tolerance na antigen (Dudek, Martin, Garg, i Agostinis, 2013). U

skladu sa tim su Truksova i sar (Truxova i sar., 2014) pokazali da 3-dnevne DC stimulisane sa Poly (I:C) ispoljavaju manje CD80 i CD86 u odnosu na iste ćelije dobijene nakon 5-dnevne kultivacije, a što je takođe u skladu sa našim nalazima. Jedna studija je prikazala da fDC dobijene nakon 24-časovne diferencijacije i 24-časovne stimulacije proinflamacijskim koktelom, imaju slabije ispoljen CCR7 u odnosu na cDC (Kvistborg, Bøgh, Pedersen, Claesson, i Zocca, 2009), što ukazuje da ove ćelije imaju slabiji migratorni kapacitet (Förster i sar., 2008). Veoma je važno da prilikom aplikacije DC u imunosupresivnu sredinu tumora u kojoj je povećana koncentracija IL-10, ove ćelije imaju ispoljen visok nivo CD83, obzirom da on štiti ćelije od supresije indukovane sa IL-10 (Tze i sar., 2011). Rezultati koji ukazuju na varijabilnu ekspresiju CD83 na fDC u odnosu na cDC (Bürdek i sar., 2010; Kvistborg i sar., 2009), kao i naši rezultati u kojima ćelije 7 od 12 ispitivanih donora nisu ispoljile visok nivo CD83 nakon stimulacije, govore o tome da ćelije nekih donora nisu prikladne za primenu u imunoterapiji tumora, obzirom da su podložne imunosupresivnom dejstvu tumorske mikrosredine. Rezultati dobijeni sa proinflamacijskim koktelom i Poly (I:C) su pokazali da se loši responderi mogu izdvojiti na osnovu njihove nesposobnosti da smanje ekspresiju CD14. U skladu sa tim Čaing (Chaing) i sar. (Chiang i sar., 2011) su pokazali da DC diferencirane nakon 2 dana imaju značajno više ispoljen CD14 i manje ispoljen CD11c, kao i da imaju smanjen kapacitet za maturaciju nakon stimulacije sa LPS-om i IFN- γ . Na osnovu toga se može zaključiti da je kompletno smanjenje ekspresije CD14 neophodan preduslov za dobijanje DC koje su pogodne za primenu u imunoterapiji tumora.

Kapacitet za stimulaciju aloreaktivnih T ćelija je i u slučaju fDC stimulisanih sa Poly (I:C) bio manji nego kod cDC istih donora, što se može objasniti slabijom fenotipskom maturacijom fDC, a pre svega slabijom ekspresijom kostimulatornih molekula (Romani i sar., 1989). Osim toga, povećan kapacitet fDC da produkuju IL-10, takođe može doprineti njihovom slabom alostimulatornom kapacitetu. Kvinsborg i sar (Kvistborg i sar., 2009) su pokazali da fDC produkuju značajno veću količinu IL-10 nakon stimulacije sa Resiquimod-om (R848) i proinflamacijskim koktelom, u odnosu na cDC istih donora, na osnov čega je zaključeno da treba biti posebno oprezan prilikom primene fDC u kliničkoj praksi. Poznato je da IL-10 snažno inhibira produkciju IL-2 (de Waal Malefyt, Yssel, i de Vries, 1993) i proliferaciju CD4+T ćelija (Fiorentino i sar., 1991), ali i da ispoljava imunostimulatorni efekat na CD8+T ćelije (Schwarz, Hamilton, Tardelli, Narula, i Sullivan, 1994). Ovi podaci mogu objasniti fenomen da fDC indukuju dobru proliferaciju i citotoksičnu aktivnost CD8+T ćelija (Bürdek i sar., 2010; Truxova i sar., 2014), ali

ne i CD4⁺T ćelija (Truxova i sar., 2014). Međutim, treba uzeti u obzir da je za efikasan antitumorski odgovor osim indukcije citotoksičnih CD8⁺T ćelija, neophodna aktivacija Th1 ćelija (Kennedy i Celis, 2008) i Th17 ćelija u specifičnim situacijama (Qi, Huang, i Wang, 2013). U tom smislu je pokazano da IL-10 ispoljava inhibitorno dejstvo na diferencijaciju Th1 (Saraiva i O'garra, 2010) i Th17 ćelija (Gu i sar., 2008), dok stimuliše Th2 imunski odgovor (R. M. Steinman i sar., 2003). Ovo nije poželjno u imunoterapiji tumora, obzirom da Th2 imunski odgovor potencira rast tumora (Ziegler i sar., 2009), za razliku od Th1 i Th17 odgovora. U odnosu na cDC, fDC su proizvodile manje IL-12 i IL-23, što objašnjava slabiji kapacitet fDC da indukuju Th1, odnosno, Th17 citokine (Hunter, 2005). Sa druge strane, upravo mala produkcija IL-12 je verovatno dovela do povećanja produkcije IL-10, i sledstvene polarizacije odgovora u pravcu Th2. U tom smislu je ranije pokazano da fDC dobijene 2-dnevnom diferencijacijom proizvode značajno manje IL-12 i indukuju slabiji Th1 odgovor u odnosu na DC dobijene 4-dnevnom i 7-dnevnom diferencijacijom (Chiang i sar., 2011). Nizak kapacitet fDC da proizvode IL-12p70 se može povezati sa njihovom niskom ekspresijom CD1a. Naime, pokazano je da CD1a⁺ DC, koje su po funkciji slične mišijim CD8 α DC, proizvode veliku količinu IL-12 i indukuju diferencijaciju naivnih CD4⁺ T limfocita u IFN- γ -proizveduće Th1 ćelije. Za razliku od toga CD1a⁻ DC proizvode veću količinu IL-10 i indukuju Th2 odgovor (Cernadas, Lu, Watts, i Brenner, 2009). Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u skladu sa drugim nalazima (Kvistborg i sar., 2009), koji ukazuju na to da skraćivanje perioda diferencijacije DC smanjuje ekspresiju CD1a na DC i njihov kapacitet da proizvode IL-12p70, a povećava njihov kapacitet za produkciju IL-10. Zbog toga se može zaključiti da osim CD14 kao markera loše diferencijacije DC, niska ekspresija CD1a može poslužiti kao dobar indikator funkcijalnih karakteristika DC, pogotovo kada se uzme u obzir njihov kapacitet da indukuju Th1, odnosno IL-10-zavisni imunski odgovor T ćelija. U tom kontekstu fDC koje imaju nisku ekspresiju CD1a, ili ne ispoljavaju ovaj molekul, nisu poželjne za imunoterapiju tumora.

Najzanimljiviji nalaz iz ovih studija je da fDC loših respondera imaju veći potencijal da indukuju CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Treg ćelije. Osim toga, u našem sistemu pokazali smo da povećanje procenta Treg od strane fDC u odnosu na cDC ima i funkcionalne implikacije. Naime, T ćelije aktivirane sa fDC su inhibirale proliferaciju drugih alogernih CD3⁺T ćelija koje su poliklonski stimulirane pomoću CD3/CD28 antitela. Ovakve efekte Treg su najverovatnije indukovale povećanom produkcijom TGF- β i IL-10, koji predstavljaju najvažnije medijatore supresivnog dejstva Treg *in vitro* (de Waal Malefyt i sar., 1993; Fiorentino i sar., 1991; Letterio i Roberts, 1998) i *in vivo*

(Joetham i sar., 2007). Literaturni podaci ukazuju na to da indukcija Treg zavisi od njihovog kontakta sa semi-maturiranim tolerogenim DC (Maldonado i von Andrian, 2010). Niska ekspresija kostimulatornih molekula na fDC loših respondera, kao i veća sposobnost ovih ćelija da produkuju IL-10, upućuje na pretpostavku da su fDC loših respondera zapravo tolerogene DC. U jedinoj studiji u kojoj je ispitivan kapacitet fDC i cDC da indukuju CD25+FoxP3+ ćelije (Truxova i sar., 2014), nije uočena značajna razlika između ovih DC. Mogući razlozi za ovakvo neslaganje sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji su, što su autori koristili duže vreme diferencijacije za fDC i neodgovarajući statistički test, u kom nisu povezivane promene u ćelijama između istih donora unutar svakog eksperimenta, već je samo upoređivana srednja razlika između ispitivanih grupa uzoraka.

Ispitivanja su pokazala da DC indukuju Treg pomoću povećane ekspresije ILT molekula (Brenk i sar., 2009). ILT3, koji je ispitivan i u ovoj studiji, sadrži imunoreceptorski tirozinski inhibicioni motiv (ITIM) (Brenk i sar., 2009). Pored toga je pokazano da je degradacija triptofana pomoću IDO-1 enzima, i sledstveno povećanje koncentracije kinurenina, važan mehanizam pomoću koga humane DC indukuju Treg i perifernu toleranciju (X. Zheng i sar., 2013). Prethodna istraživanja u okviru naše grupe su pokazala da tolerogene ILT-3+IDO-1+ DC, koje se indukuju nakon kontakta sa mezenhimskim matičnim ćelijama, mogu potencirati diferencijaciju funkcionalnih CD4+CD25+FoxP3+IL-10+ Treg (Đokić i sar., 2013). Osim toga, pokazano je da blokada ILT-3 pomoću blokirajućeg antitela, i IDO-1 molekula pomoću 1-metil triptofana, blokira i efekat tolerogenih DC na indukciju Treg (Đokić i sar., 2013). U ovim ispitivanjima smo takođe pokazali da fDC loših respondera ispoljavaju više ILT-3 i IDO-1 od cDC istih donora, kao i to da IDO-1 direktno učestvuje u indukciji Treg od strane tolerogenih fDC. Razlike u ekspresiji IDO-1 iRNK su uočene tek nakon stimulacije ćelija sa Poly (I:C) koji je stimulisao ekspresiju ovog enzima. Ovo je dobro opisan efekat koji Poly (I:C) izaziva kod različitih ćelija, uključujući i DC (Von Bubnoff, Scheler, Wilms, Fimmers, i Bieber, 2011). Iako na izgled nepovoljan, ovakav efekat Poly (I:C) može biti posledica aktivacije negativnih povratnih sprega koji sprečavaju preteranu aktivaciju imunskog sistema. Ono što je ključno je da su fDC nakon stimulacije sa Poly (I:C) ispoljile značajno veći stepen IDO-1 od cDC istih donora. Ostaje da se detaljnije ispita koje su to ključne razlike u signalizaciji unutar fDC i cDC koje dovode do njihovog različitog odgovora u pogledu ekspresije IDO-1.

Još uvek nije poznato zašto monociti nekih donora odgovaraju slabo na protokol ubrzane diferencijacije a dobro na standardni protokol diferencijacije DC. Fenomen da DC nekih donora bolje ili lošije odgovaraju na stimulaciju TLR agonistima, odnosno koncept postojanja dobrih i loših respondera, je opisan i ranije u literaturi (Lombardi, Van Overtvelt, Horiot, i Moingeon, 2009). Ovi autori su ukazali da potencijalnu ulogu polimorfizma u TLR genima, kao osnovni razlog ovakvog fenomena. Međutim, autori nisu analizirali da li drugačija stimulacija DC, nezavisna od TLR, dovodi do segregacije istih donora na dobre i loše respondere. Naši preliminarni rezultati ukazuju na to da DC loših respondera, loše odgovaraju i na druge stimulse, što se ne može objasniti samo polimorfizmom specifičnih receptora, jer je verovatnoća za to izuzetno mala. Osim genotipske varijabilnosti, sredinska varijabilnost značajno utiče na fenotipske i funkcionalne osobine individua. Stoga je u cilju pronalaženja sredinskih faktora, neophodno identifikovati ključne razlike u životnim istorijama između dobrih i loših respondera, a za ovakvu analizu je neophodno uzeti značajno veći broj ispitanika. Uzimajući u obzir nedavna istraživanja o ulozi mikrobioma creva na kapacitet PBMC različitih donora da odgovore na različite stimulse (Schirmer i sar., 2016), moguće je da se dobri i loši responderi zbog razlika u životnim istorijama razlikuju i po sastavu mikrobioma. Stoga je neophodno ispitati koje su ključne razlike u sastavu mikrobioma creva između dobrih i loših respondera, i da li se može njime manipulirati primenom antibiotika i probiotika (Lankelma i sar., 2016), u cilju modulisanja responsivnosti različitih donora.

Kao što je već pomenuto, monociti loših respondera su se odlikovali većim kapacitetom za produkciju IL-6 i IL-1 β u supernatantima (Pavlović i sar., 2005). fDC loših respondera su produkovali značajno više IL-1 β 24 časa i 48 časova nakon stimulacije sa Poly (I:C), dok je produkcija TNF- α ovim eksperimentima bila slična između fDC i cDC loših respondera. Od ranije je poznato da visoka koncentracija IL-1 β tokom diferencijacije DC, inhibira sledstveno sazrevanje i funkcije DC (Makino i sar., 2006), što je u skladu sa našim rezultatima. Takođe, povećana produkcija IL-1 β se može povezati sa većim ispoljavanjemIDO-1 molekula kod fDC loših respondera. U tom smislu je pokazano daIDO-1+ DC produkuju značajno više IL-1 β u odnosu naIDO-1-DC (Von Bubnoff i sar., 2011). Nasuprot IL-1 β , TNF- α potencira diferencijaciju DC od monocita (Chomarat i sar., 2003), što je u skladu sa rezultatima ove studije koji pokazuju da DC dobrih respondera produkuju nešto veću količinu ovog citokina od DC loših respondera.

U eksperimentima sa blokirajućim antitelom na receptor za IL-6 (tocilizumab) je pokazano da ovaj citokin značajno utiče na kapacitet fDC loših respondera da se diferencijaciju u imunogene DC. Naime, u prisustvu tocilizumaba, fDC su kompletno smanjile ekspresiju CD14 i povećale ekspresiju CD1a. Ovo je korelisalo sa većom ekspresijom markera DC (CD209) i manjom ekspresijom monocitnog markera CD33. fDC loših respondera kojima je bio blokiran IL-6R su ispoljavali više CD83, CD86 i CD54 molekula. Ono što je interesantno, ovakve ćelije su ispoljile manje CD80 u odnosu na fDC loših respondera kojima nije bio blokiran IL-6R. Standardni model pretpostavlja CD80 i CD86 kao ekvivalente kostimulatore koji interaguju sa CD28 na T limfocitima i indukuju njihovu aktivaciju. Međutim, kasnije je pokazano da osim CD28, oba molekula vezuju i inhibitorni receptor na T limfocitima CTLA-4 (L. Chen i sar., 1992; Linsley i sar., 1991; Linsley, Clark, i Ledbetter, 1990) preko koga DC mogu indukovati anergiju T ćelija i njihovu diferencijaciju u Treg (Walker, 2013). Linsley i sar (Linsley i sar., 1994) su otkrili da iako imaju isti aviditet za vezivanje za CTLA-4, CD86 i CD80 se razlikuju u kinetici vezivanja za ovaj molekul. U njihovim istraživanjima je pokazano da se CD80 vezuje za CTLA-4 200 puta više i 5-8 puta snažnije nego CD86. Na osnovu toga je zaključeno da CD80 i CD86 koriste različite determinante za vezivanje za CD28 i CTLA-4, i da je drugačija kinetika vezivanja. Ovi rezultati ukazuju da veća ekspresija CD80 na fDC može biti odlika njihovog većeg tolerogenog potencijala. Ovakvu pretpostavku potvrđuju nalazi da fDC sa smanjenom ekspresijom CD80, indukuju manji procenat Treg u kokulturi. Takođe, fDC sa manjom ekspresijom CD80 nakon blokade IL-6R, su produkovale više IL-12 a manje TGF- β , i ispoljavale su manje drugih tolerogenih markera (PD1L i ILT3). Ovi rezultati otvaraju mogućnost da se primenom tocilizumaba unaprede imunogene osobine DC za primenu u imunoterapiji tumora, a posebno dokazuju ključnu ulogu IL-6 u procesima diferencijacije i sledstvenog sazrevanja DC.

Osim IL-6 i IL-1 β , PGE-2 je definisan kao važan faktor koji inhibira diferencijaciju monocita u DC, smanjuje ekspresiju CD1a i potencira njihovu sposobnost da indukuju Th2 odgovor (Kaliński, Hilkens, Snijders, Snijdewint, i Kapsenberg, 1997). Međutim, nakon što ispolje CD1a na površini, DC postaju rezistentne na faktore koji suprimiraju njihovu diferencijaciju (Nauta, Kruisselbrink, Lurvink, Willemze, i Fibbe, 2006). Na osnovu toga se može pretpostaviti da vreme koje je neophodno da povećaju ekspresiju protektivnog CD1a i smanjenje ekspresije CD14, zavisi od specifičnog polimorfizma gena koji regulišu signalizaciju i produkciju IL-6, IL-1 β i PGE-2. Zbog toga bi razvoj skrining metode koja može razdvojiti dobre i loše respondere bila bolja od analize

CD1a i CD14 na DC u toku diferencijacije, za identifikaciju potencijala određenih donora za diferencijaciju u imunogene DC. Identifikacija polimorfizama, kao što je polimorfizmom *cox2* gena (Makar i sar., 2013), može biti dobar prediktor responsivnosti monocita za protokol ubrzane diferencijacije. Osim toga, ovakva identifikacija bi omogućila bolje razumevanje uloge polimorfizama u efikasnosti imunskog odgovora na tumor, a time i njihovu ulogu u inicijaciji i progresiji tumora.

U zaključku se može naglasiti da ubrzani protokol diferencijacije može da se primeni za dobijanje imunogenih fDC kod nekih donora. Međutim, većina ovakvih donora će imati lošiji potencijal za diferencijaciju po ubrzanom protokolu. Za razliku od DC dobijenih konvencionalnim protokolom, fDC ovakvih donora ispoljavaju slab kapacitet za diferencijaciju i sazrevanje, i sledstveno tome, indukuju Th2 imunski odgovor i regulatorne T ćelije. Zbog toga je preporučljivo, u slučajevima u kojima monociti ne odgovaraju dobro na ubrzani protokol, primeniti konvencionalni protokol za dobijanje DC pogodnih za pravljenje vakcina protiv tumora.

7 Zaključci

1. DC diferencirane po protokolu ubrzane diferencijacije su po fenotipskim i funkcionalnim svojstvima slične DC diferenciranim po konvencionalnom protokolu, ali samo kod dela ispitivanih donora (dobri responderi).
2. Monociti jednog broja donora loše odgovaraju na protokol ubrzane diferencijacije (loši responderi), iako se iste ćelije dobro diferenciraju po konvencionalnom protokolu.
3. Monociti loših respondera ispoljavaju više CD14 i CD16, a manje CD1a, CD36 i CD69 u odnosu na monocite dobrih respondera, i proizvode više IL-1 β i IL-6 u ranim fazama diferencijacije.
4. Visoke doze Poly (I:C) indukuju apoptozu cDC i fDC, a ovakav efekat se može blokirati dodavanjem TNF- α . Međutim, TNF- α istovremeno inhibira i Th1 polarišuću sposobnost DC, a povećava njihov kapacitet za indukciju IL-10-produkujućih T ćelija, pa ova kombinacija nije preporučljiva za protokol diferencijacije DC.
5. Primena niskih, netoksičnih doza Poly (I:C), stimuliše produkciju IL-12 i Th1 polarišuća svojstva kod cDC i fDC dobrih respondera, bolje nego proinflamacijski koktel. Međutim, diferencijacija monocita loših respondera u fDC se ne može poboljšati primenom Poly (I:C) umesto proinflamacijskog koktela.
6. fDC loših respondera dobijenih u protokolu sa Poly (I:C) stiču veći tolerogeni kapacitet u pogledu ekspresije ILT3, IDO-1 i kapaciteta da indukuju Treg, što su nepoželjne osobine DC za primenu u imunoterapiji tumora.
7. Primena blokirajućeg antitela za IL-6 receptor, u protokolu za ubranu diferencijaciju sa Poly (I:C) kod loših respondera, značajno poboljšava imunogene osobine fDC u pogledu kapaciteta za diferencijaciju, sazrevanje, indukciju Th1 imunskog odgovora i smanjenog kapaciteta za indukciju Treg.

Protokol ubrzane diferencijacije omogućava dobijanje imunogenih DC pogodnih za primenu u imunoterapiji tumora, slično kao i konvencionalni protokol. Međutim, činjenica da određen broj

donora slabo odgovara na protokol ubrzane diferencijacije, i da ovakve DC poseduju izražene tolerogene osobine, predstavlja rizik za njihovu primenu u imunoterapiji tumora. Analizom markera monocita tokom rane kultivacije moguće je identifikovati loše respondere, za koje je bolje primeniti konvencionalni protokol, ili blokirati dejstvo endogenog IL-6 u protokolu ubrzane diferencijacije, što omogućava dobijanje imunogenih DC.

8 Literatura -

- Adotevi, O., Vingert, B., Freyburger, L., Shrikant, P., Lone, Y.-C., Quintin-Colonna, F., . . . Langlade-Demoyen, P. (2007). B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with α -galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity. *The Journal of Immunology*, *179*(5), 3371-3379.
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., . . . Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology*, *3*(6), 549.
- Agarwal, S., Avni, O., & Rao, A. (2000). Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity*, *12*(6), 643-652.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F. J., & Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(3), 1910-1914.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, *114*(8), 1537-1544.
- Albert, M. L., Pearce, S. F. A., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., & Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta 5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(7), 1359-1368.
- Albert, M. L., Sauter, B., & Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, *392*(6671), 86.
- Alfaro, C., Suárez, N., Martínez-Forero, I., Palazón, A., Rouzaut, A., Solano, S., . . . Erro, L. (2011). Carcinoma-derived interleukin-8 disorients dendritic cell migration without impairing T-cell stimulation. *PLoS one*, *6*(3), e17922.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.-R., Liu, X., Mahdi, R. M., Clarke, G. L., Nussenblatt, R. B., . . . Egwuagu, C. E. (2007). T H 17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature medicine*, *13*(6), 711.
- Anderson, A. C. (2012). Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*, *24*(2), 213-216.
- Asadzadeh, Z., Mohammadi, H., Safarzadeh, E., Hemmatzadeh, M., Mahdian-shakib, A., Jadidi-Niaragh, F., . . . Baradaran, B. (2017). The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular immunology*.
- Ayyoub, M., Pignon, P., Classe, J.-M., Odunsi, K., & Valmori, D. (2013). CD4+ T effectors specific for the tumor antigen NY-ESO-1 are highly enriched at ovarian cancer sites and coexist with, but are distinct from, tumor-associated Treg. *Cancer immunology research*, *1*(5), 303-308.

- Baeuerle, P. A., & Reinhardt, C. (2009). Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer research*, *69*(12), 4941-4944.
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *9*(5), 361.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., . . . Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, *18*(1), 767-811.
- Barnaba, V., Franco, A., Paroli, M., Benvenuto, R., De Petrillo, G., Burgio, V. L., . . . Cappelli, G. (1994). Selective expansion of cytotoxic T lymphocytes with a CD4+ CD56+ surface phenotype and a T helper type 1 profile of cytokine secretion in the liver of patients chronically infected with Hepatitis B virus. *The Journal of Immunology*, *152*(6), 3074-3087.
- Belz, G. T., Vremec, D., Febbraio, M., Corcoran, L., Shortman, K., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2002). CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo. *The Journal of Immunology*, *168*(12), 6066-6070.
- Bercovici, N., Haicheur, N., Massicard, S., Vernel-Pauillac, F., Adotevi, O., Landais, D., . . . Grob, J.-J. (2008). Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *Journal of immunotherapy*, *31*(1), 101-112.
- Berraondo, P., Nouzé, C., Préville, X., Ladant, D., & Leclerc, C. (2007). Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer research*, *67*(18), 8847-8855.
- Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., . . . Laplanche, A. (2016). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncolmmunology*, *5*(4), e1071008.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., . . . Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T H 17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090), 235.
- Bianchi, K., & Meier, P. (2009). A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Molecular cell*, *36*(5), 736-742.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Nam, J.-H., Lyerly, H. K., & Gilboa, E. (2000). Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer research*, *60*(4), 1028-1034.
- Bol, K. F., Figdor, C. G., Aarntzen, E. H., Welzen, M. E., van Rossum, M. M., Blokx, W. A., . . . Pots, J. M. (2015). Intranodal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients. *Oncolmmunology*, *4*(8), e1019197.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., & Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, *196*(12), 1627-1638.

- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S.-I., Soares, H., . . . Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(6), 815-824.
- Bowers, W. E., & Berkowitz, M. R. (1986). Differentiation of dendritic cells in cultures of rat bone marrow cells. *Journal of Experimental Medicine*, *163*(4), 872-883.
- Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Häcker, G., . . . von Bubnoff, D. (2009). Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, *183*(1), 145-154.
- Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G., Kanz, L., & Brugger, W. (1998). Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer research*, *58*(4), 732-736.
- Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R., & Farrar, M. A. (2007). IL-2 receptor β -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, *178*(1), 280-290.
- Bürdek, M., Spranger, S., Wilde, S., Frankenberger, B., Schendel, D. J., & Geiger, C. (2010). Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation. *Journal of translational medicine*, *8*(1), 90.
- Campi, G., Crosti, M., Consogno, G., Facchinetti, V., Conti-Fine, B. M., Longhi, R., . . . Protti, M. P. (2003). CD4⁺ T cells from healthy subjects and colon cancer patients recognize a carcinoembryonic antigen-specific immunodominant epitope. *Cancer research*, *63*(23), 8481-8486.
- Carmody, R. J., Ruan, Q., Liou, H.-C., & Chen, Y. H. (2007). Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *The Journal of Immunology*, *178*(1), 186-191.
- Castiello, L., Sabatino, M., Ren, J., Terabe, M., Khuu, H., Wood, L. V., . . . Stroncek, D. F. (2017). Expression of CD14, IL10, and tolerogenic signature in dendritic cells inversely correlate with clinical and immunologic response to TARP vaccination in prostate cancer patients. *Clinical Cancer Research*, *23*(13), 3352-3364.
- Cathelin, D., Nicolas, A., Bouchot, A., Fraszczak, J., Labbé, J., & Bonnotte, B. (2011). Dendritic cell–tumor cell hybrids and immunotherapy: what's next? *Cytotherapy*, *13*(7), 774-785.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., & Lanzavecchia, A. (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(5), 821-829.
- Celluzzi, C. M., & Falo, L. D. (1998). Cutting edge: physical interaction between dendritic cells and tumor cells results in an immunogen that induces protective and therapeutic tumor rejection. *The Journal of Immunology*, *160*(7), 3081-3085.

- Cernadas, M., Lu, J., Watts, G., & Brenner, M. (2009). CD1a expression defines an interleukin - 12 producing population of human dendritic cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 155(3), 523-533.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., . . . Kusumoto, S. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, 4(7), 702.
- Chang, C.-C., Ciubotariu, R., Manavalan, J., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., . . . Dalla-Favera, R. (2002). Tolerization of dendritic cells by T S cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature immunology*, 3(3), 237.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., & Gluckman, J. C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *European journal of immunology*, 27(2), 431-441.
- Charrel-Dennis, M., Latz, E., Halmen, K. A., Trieu-Cuot, P., Fitzgerald, K. A., Kasper, D. L., & Golenbock, D. T. (2008). TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell host & microbe*, 4(6), 543-554.
- Chen, L., Ashe, S., Brady, W. A., Hellström, I., Hellström, K. E., Ledbetter, J. A., . . . Linsley, P. S. (1992). Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 71(7), 1093-1102.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-j., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875-1886.
- Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H., & Blazar, B. R. (2008). The indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *The Journal of Immunology*, 181(8), 5396-5404.
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.-M., Tato, C., . . . O'Shea, J. J. (2006). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8137-8142.
- Chen, Z., Moyana, T., Saxena, A., Warrington, R., Jia, Z., & Xiang, J. (2001). Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *International journal of cancer*, 93(4), 539-548.
- Chiang, C. L.-L., Hagemann, A. R., Leskowitz, R., Mick, R., Garrabrant, T., Czerniecki, B. J., . . . Coukos, G. (2011). Day-4 myeloid dendritic cells pulsed with whole tumor lysate are highly immunogenic and elicit potent anti-tumor responses. *PloS one*, 6(12), e28732.
- Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., . . . Colgan, J. D. (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nature immunology*, 13(9), 832.

- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., & Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology*, 1(6), 510.
- Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J., & Palucka, A. K. (2003). TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 171(5), 2262-2269.
- Conrad, C., Gregorio, J., Wang, Y.-H., Ito, T., Meller, S., Hanabuchi, S., . . . Liu, Y.-J. (2012). Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3+ T-regulatory cells. *Cancer research*, 72(20), 5240-5249.
- Cook, P. C., Jones, L. H., Jenkins, S. J., Wynn, T. A., Allen, J. E., & MacDonald, A. S. (2012). Alternatively activated dendritic cells regulate CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 9977-9982.
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of B220- CD11b+ LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *The Journal of Immunology*, 178(8), 5182-5191.
- Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Røsjø, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., . . . Bogen, B. (2005). Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*, 22(3), 371-383.
- Cosenza, H., Leserman, L. D., & Rowley, D. A. (1971). The third cell type required for the immune response of spleen cells in vitro. *The Journal of Immunology*, 107(2), 414-421.
- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., . . . Paul, W. E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(11), 3880-3885.
- Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., . . . Liu, L. (1998). Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*, 9(1), 25-34.
- Cruz, L. J., Tacke, P. J., Pots, J. M., Torensma, R., Buschow, S. I., & Figdor, C. G. (2012). Comparison of antibodies and carbohydrates to target vaccines to human dendritic cells via DC-SIGN. *Biomaterials*, 33(16), 4229-4239.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., . . . Churakova, T. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421(6924), 744.
- Curti, A., Ferri, E., Pandolfi, S., Isidori, A., & Lemoli, R. M. (2004). Dendritic cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 172(1), 3-4.
- Czerniecki, B. J., Carter, C., Rivoltini, L., Koski, G. K., Kim, H. I., Weng, D. E., . . . Rosenberg, S. A. (1997). Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 159(8), 3823-3837.

- Dauer, M., Obermaier, B., Hertzen, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, 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.
- Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J., & Shevach, E. M. (2007). Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, *178*(7), 4022-4026.
- De Maria, R., Cifone, M. G., Trotta, R., Rippo, M. R., Festuccia, C., Santoni, A., & Testi, R. (1994). Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *Journal of Experimental Medicine*, *180*(5), 1999-2004.
- De Matos, P., Abdel - Wahab, Z., Vervaert, C., Hester, D., & Seigler, H. (1998). Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA - 106 fibrosarcoma yields equally effective vaccines against B16 tumors in mice. *Journal of surgical oncology*, *68*(2), 79-91.
- De Trez, C., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., & Muraille, E. (2009). iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS pathogens*, *5*(6), e1000494.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., & de Vries, J. E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *The Journal of Immunology*, *150*(11), 4754-4765.
- DeMatos, P., Abdel-Wahab, Z., Vervaert, C., & Seigler, H. F. (1998). Vaccination with dendritic cells inhibits the growth of hepatic metastases in B6 mice. *Cellular immunology*, *185*(1), 65-74.
- Dieu, M.-C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.-M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., . . . Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(2), 373-386.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*, *1*(6), 447-456.
- Dragicevic, A., Dzopalic, T., Vasilijic, S., Vucevic, D., Tomic, S., Bozic, B., & Colic, M. (2012). Signaling through Toll-like receptor 3 and Dectin-1 potentiates the capability of human monocyte-derived dendritic cells to promote T-helper 1 and T-helper 17 immune responses. *Cytotherapy*, *14*(5), 598-607.
- Dragičević, A., Džopalić, T., Vasilijić, S., Vučević, D., Božić, B., Majstorović, I., . . . Čolić, M. (2011). The influence of CD40 ligation and interferon- γ on functional properties of human monocyte-derived dendritic cells activated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Vojnosanitetski pregled*, *68*(4), 301-308.
- Dubey, C., Croft, M., & Swain, S. L. (1995). Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *The Journal of Immunology*, *155*(1), 45-57.

- Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Frontiers in immunology*, 4, 438.
- Dzitonek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., . . . Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, 165(11), 6037-6046.
- Dzopalic, T., Rajkovic, I., Dragicevic, A., & Colic, M. (2012). The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunologic research*, 52(1-2), 20-33.
- Đokić, J., Tomić, S., Marković, M., Milosavljević, P., & Čolić, M. (2013). Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte - derived dendritic cells. *European journal of immunology*, 43(7), 1862-1872.
- Else, K., Finkelman, F., Maliszewski, C., & Grencis, R. (1994). Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *Journal of Experimental Medicine*, 179(1), 347-351.
- Errington, F., Jones, J., Merrick, A., Bateman, A., Harrington, K., Gough, M., . . . Melcher, A. (2006). Fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumour cell fusion activates human dendritic cells for enhanced IL-12 production and T-cell priming. *Gene therapy*, 13(2), 138.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., & Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺ CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5149-5153.
- Faries, M. B., Bedrosian, I., Xu, S., Koski, G., Roros, J. G., Moise, M. A., . . . Czerniecki, B. J. (2001). Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83⁺ dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood*, 98(8), 2489-2497.
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., . . . Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature medicine*, 5(4), 405.
- Fields, R., Shimizu, K., & Mule, J. (1998). Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9482-9487.
- Filaci, G., Fravega, M., Setti, M., Traverso, P., Millo, E., Fenoglio, D., . . . Basso, M. (2006). Frequency of telomerase-specific CD8⁺ T lymphocytes in patients with cancer. *Blood*, 107(4), 1505-1512.
- Florentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., & O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *The Journal of Immunology*, 146(10), 3444-3451.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(4), 330.

- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., & Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor *foxp3*. *Immunity*, *22*(3), 329-341.
- Förster, R., Davalos-Miszlitz, A. C., & Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, *8*(5), 362.
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., & Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, *99*(1), 23-33.
- Fransen, L., Van der Heyden, J., Ruyschaert, R., & Fiers, W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, *22*(4), 419-426.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., . . . Bromberg, J. S. (2004). TGF - β Induces Foxp3+ T - Regulatory Cells from CD4+ CD25- Precursors. *American Journal of Transplantation*, *4*(10), 1614-1627.
- Fucikova, J., Kralikova, P., Fialova, A., Brtnicky, T., Rob, L., Bartunkova, J., & Špišek, R. (2011). Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer research*, *71*(14), 4821-4833.
- Fučíková, J., Rožková, D., Ulčová, H., Budinský, V., Sochorová, K., Pokorná, K., . . . Špišek, R. (2011). Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *Journal of translational medicine*, *9*(1), 223.
- Fujiwara, H., Fukuzawa, M., Yoshioka, T., Nakajima, H., & Hamaoka, T. (1984). The role of tumor-specific Lyt-1+ 2-T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+ 2-T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. *The Journal of Immunology*, *133*(3), 1671-1676.
- Fukaya, T., Takagi, H., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Taya, H., . . . Azuma, M. (2010). Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood*, *116*(13), 2266-2276.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., . . . Wind, P. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, *313*(5795), 1960-1964.
- Garg, A. D., Vara Perez, M., Schaaf, M., Agostinis, P., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2017). Trial watch: dendritic cell-based anticancer immunotherapy. *Oncot Immunology*, *6*(7), e1328341.
- Garg, N. K., Dwivedi, P., Prabha, P., & Tyagi, R. K. (2013). RNA pulsed dendritic cells: an approach for cancer immunotherapy. *Vaccine*, *31*(8), 1141-1156.
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, *19*(1), 71-82.

- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., . . . Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8869-8872.
- Greenberg, P. D. (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells *Advances in immunology* (Vol. 49, pp. 281-355): Elsevier.
- Greenberg, P. D., Cheever, M. A., & Fefer, A. (1981). Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+ 2-lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 154(3), 952-963.
- Gu, Y., Yang, J., Ouyang, X., Liu, W., Li, H., Yang, J., . . . Unkeless, J. C. (2008). Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *European journal of immunology*, 38(7), 1807-1813.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., & Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *Journal of Experimental Medicine*, 189(3), 451-460.
- Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W. J., Zhao, K., & Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13463-13468.
- Haabeth, O. A. W., Lørvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B., & Corthay, A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature communications*, 2, 240.
- Hammerich, L., Bhardwaj, N., Kohrt, H. E., & Brody, J. D. (2016). In situ vaccination for the treatment of cancer. *Immunotherapy*, 8(3), 315-330.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*, 6(11), 1123.
- Hartmann, K.-U. (1970). Induction of a hemolysin response in vitro: interaction of cells of bone marrow origin and thymic origin. *Journal of Experimental Medicine*, 132(6), 1267-1278.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., . . . Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 194(6), 769-780.
- Hock, H., Dorsch, M., Diamantstein, T., & Blankenstein, T. (1991). Interleukin 7 induces CD4+ T cell-dependent tumor rejection. *Journal of Experimental Medicine*, 174(6), 1291-1298.
- Hombach, A., Köhler, H., Rappl, G., & Abken, H. (2006). Human CD4+ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *The Journal of Immunology*, 177(8), 5668-5675.

- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., . . . Fitzgerald, K. A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458(7237), 514.
- Hsieh, C.-S., Heimberger, A. B., Gold, J. S., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), 6065-6069.
- Hsieh, C.-S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107), 547-549.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., & Levitsky, H. (1998). The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12), 2357-2368.
- Hunter, C. A. (2005). New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology*, 5(7), 521.
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(2), 95-109.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., . . . Steinman, R. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*, 176(6), 1693-1702.
- Insug, O., Ku, G., Ertl, H., & Blaszczyk-Thurin, M. (2002). A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer research*, 22(2A), 613-621.
- Irvine, A. S., Trinder, P. K., Laughton, D. L., Ketteringham, H., McDermott, R. H., Reid, S. C., . . . Doshi, R. (2000). Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nature biotechnology*, 18(12), 1273.
- Ishida, T., Chada, S., Stipanov, M., Nadaf, S., Ciernik, F., Gabrilovich, D., & Carbone, D. (1999). Dendritic cells transduced with wild-type p53 gene elicit potent anti-tumour immune responses. *Clinical and experimental immunology*, 117(2), 244.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., . . . Fukuhara, S. (2002). Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, 195(11), 1507-1512.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., . . . Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-1133.

- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), 987.
- Jachimowicz, R. D., Borchmann, S., & Rothe, A. (2014). Multi-specific antibodies for cancer immunotherapy. *BioDrugs*, 28(4), 331-343.
- Janco, J. M. T., Lamichhane, P., Karyampudi, L., & Knutson, K. L. (2015). Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 194(7), 2985-2991.
- Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., . . . Gelfand, E. W. (2007). Naturally occurring lung CD4+ CD25+ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF- β . *The Journal of Immunology*, 178(3), 1433-1442.
- Jung, C. W., Kwon, J. H., Seol, J. G., Park, W. H., Hyun, J. M., Kim, E. S., . . . Lee, Y. Y. (2004). Induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with murine leukemic cell RNA. *American journal of hematology*, 75(3), 121-127.
- Kabel, P. J., De Haan-Meulman, M., Voorbij, H. A., Kleingeld, M., Knol, E. F., & Drexhage, H. A. (1989). Accessory cells with a morphology and marker pattern of dendritic cells can be obtained from elutriator-purified blood monocyte fractions. An enhancing effect of metrizamide in this differentiation. *Immunobiology*, 179(4-5), 395-411.
- Kagami, S.-i., Nakajima, H., Suto, A., Hirose, K., Suzuki, K., Morita, S., . . . Iwamoto, I. (2001). Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood*, 97(8), 2358-2365.
- Kaliński, P., Hilkens, C. M., Snijders, A., Snijdewint, F. G., & Kapsenberg, M. L. (1997). Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE 2, promote Th2 responses *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology* (pp. 363-367): Springer.
- Kanneganti, T.-D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Whitfield, J., Franchi, L., . . . Inohara, N. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36560-36568.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., & Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 27(4), 549-559.
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity*, 4(3), 313-319.
- Kaplan, M. H., Sun, Y.-L., Hoey, T., & Grusby, M. J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382(6587), 174.
- Karyampudi, L., Lamichhane, P., Scheid, A. D., Kalli, K. R., Shreeder, B., Krempsi, J. W., . . . Knutson, K. L. (2014). Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody. *Cancer research*, 74(11), 2974-2985.
- Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti - tumor immune responses. *Immunological reviews*, 222(1), 129-144.

- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., & Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells. *Nature immunology*, 4(4), 337.
- Kim - Schulze, S., Seki, T., Vlad, G., Scotto, L., Fan, J., Colombo, P., . . . Suciú - Foca, N. (2006). Regulation of ILT3 gene expression by processing of precursor transcripts in human endothelial cells. *American Journal of Transplantation*, 6(1), 76-82.
- Kim, H.-P., & Leonard, W. J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor–induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1543-1551.
- Kishikawa, H., Sun, J., Choi, A., Miaw, S.-C., & Ho, I.-C. (2001). The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4414-4420.
- Kjaergaard, J., Shimizu, K., & Shu, S. (2003). Electrofusion of syngeneic dendritic cells and tumor generates potent therapeutic vaccine. *Cellular immunology*, 225(2), 65-74.
- Klebanoff, C. A., Acquavella, N., Yu, Z., & Restifo, N. P. (2011). Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunological reviews*, 239(1), 27-44.
- Klechevsky, E., Flamar, A.-L., Cao, Y., Blanck, J.-P., Liu, M., O'Bar, A., . . . Zurawski, S. (2010). Cross-priming CD8⁺ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood*, 116(10), 1685-1697.
- Klein, C., Bueler, H., & Mulligan, R. C. (2000). Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *Journal of Experimental Medicine*, 191(10), 1699-1708.
- Koido, S., Kashiwaba, M., Chen, D., Gendler, S., Kufe, D., & Gong, J. (2000). Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *The Journal of Immunology*, 165(10), 5713-5719.
- Kokhaei, P., Choudhury, A., Mahdian, R., Lundin, J., Moshfegh, A., Österborg, A., & Mellstedt, H. (2004). Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia*, 18(11), 1810.
- Kokhaei, P., Rezvany, M., Virving, L., Choudhury, A., Rabbani, H., Österborg, A., & Mellstedt, H. (2003). Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell–tumour hybrids in B-CLL. *Leukemia*, 17(5), 894.
- Kongsted, P., Borch, T. H., Ellebaek, E., Iversen, T. Z., Andersen, R., Met, Ö., . . . Svane, I. M. (2017). Dendritic cell vaccination in combination with docetaxel for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized phase II study. *Cytotherapy*, 19(4), 500-513.
- Koretz, K., Moldenhauer, G., Majdic, O., & Möller, P. (1989). Correlation of HLA - D/li antigen expression in breast carcinoma with local lymphohistiocytic infiltration reveals considerable dysregulation in a subset of tumors. *International journal of cancer*, 44(5), 816-822.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., . . . Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H 17 cells. *Nature*, 448(7152), 484.

- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27, 485-517.
- Krempski, J., Karyampudi, L., Behrens, M. D., Erskine, C. L., Hartmann, L., Dong, H., . . . Knutson, K. L. (2011). Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *The Journal of Immunology*, 186(12), 6905-6913.
- Kriehuber, E., Bauer, W., Charbonnier, A.-S., Winter, D., Amatschek, S., Tamandl, D., . . . Maurer, D. (2005). Balance between NF- κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood*, 106(1), 175-183.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., . . . Welling, T. H. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 114(6), 1141-1149.
- Kudela, P., Sun, Z., Fourcade, J., Janjic, B., Kirkwood, J. M., Maillere, B., & Zarour, H. M. (2011). Epitope hierarchy of spontaneous CD4+ T cell responses to LAGE-1. *The Journal of Immunology*, 186(1), 312-322.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621-625.
- Kurata, H., Lee, H. J., O'Garra, A., & Arai, N. (1999). Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity*, 11(6), 677-688.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 186(10), 1757-1762.
- Kushwah, R., & Hu, J. (2011). Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell & bioscience*, 1(1), 20.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *The Journal of Immunology*, 172(2), 989-999.
- Kvistborg, P., Bøgh, M., Pedersen, A., Claesson, M., & Zocca, M. (2009). Fast generation of dendritic cells. *Cellular immunology*, 260(1), 56-62.
- Kyte, J. A., Aamdal, S., Dueland, S., Sæbøe-Larsen, S., Inderberg, E. M., Madsbu, U. E., . . . Kvalheim, G. (2016). Immune response and long-term clinical outcome in advanced melanoma patients vaccinated with tumor-mRNA-transfected dendritic cells. *OncolImmunology*, 5(11), e1232237.
- Lamana, A., Martin, P., De La Fuente, H., Martinez-Muñoz, L., Cruz-Adalia, A., Ramirez-Huesca, M., . . . Stein, J. V. (2011). CD69 modulates sphingosine-1-phosphate-induced migration of skin dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(7), 1503-1512.

- Lankelma, J. M., Belzer, C., Hoogendijk, A. J., De Vos, A. F., De Vos, W. M., Van Der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2016). Antibiotic-induced gut microbiota disruption decreases TNF- α release by mononuclear cells in healthy adults. *Clinical and translational gastroenterology*, 7(8), e186.
- Lauritzsen, G. F., Weiss, S., Dembic, Z., & Bogen, B. (1994). Naive idiotype-specific CD4⁺ T cells and immunosurveillance of B-cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5700-5704.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F., & Paul, W. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *Journal of Experimental Medicine*, 172(3), 921-929.
- Leber, J. H., Crimmins, G. T., Raghavan, S., Meyer-Morse, N. P., Cox, J. S., & Portnoy, D. A. (2008). Distinct TLR-and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS pathogens*, 4(1), e6.
- Lee, D. U., & Rao, A. (2004). Molecular analysis of a locus control region in the T helper 2 cytokine gene cluster: a target for STAT6 but not GATA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 16010-16015.
- Lee, J., Boczkowski, D., & Nair, S. (2013). Programming human dendritic cells with mRNA *Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation* (pp. 111-125): Springer.
- Lee, T. H., Huang, Q., Oikemus, S., Shank, J., Ventura, J.-J., Cusson, N., . . . Kelliher, M. A. (2003). The death domain kinase RIP1 is essential for tumor necrosis factor alpha signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 23(22), 8377-8385.
- Lehner, M., Kellert, B., Proff, J., Schmid, M. A., Diessenbacher, P., Ensser, A., . . . Kämpgen, E. (2012). Autocrine TNF is critical for the survival of human dendritic cells by regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *The Journal of Immunology*, 188(10), 4810-4818.
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF- β . *Annual review of immunology*, 16(1), 137-161.
- Li, M., You, S., Ge, W., Ma, S., Ma, N., & Zhao, C. (2003). Induction of T-cell immunity against leukemia by dendritic cells pulsed with total RNA isolated from leukemia cells. *Chinese medical journal*, 116(11), 1655-1661.
- Lighvani, A. A., Frucht, D. M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B. D., . . . Paul, W. E. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15137-15142.
- Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., & Ledbetter, J. A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *Journal of Experimental Medicine*, 174(3), 561-569.
- Linsley, P. S., Clark, E. A., & Ledbetter, J. A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5031-5035.

- Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., & Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, *1*(9), 793-801.
- Liu, B.-Y., Chen, X.-H., Gu, Q.-L., Li, J.-F., Yin, H.-R., Zhu, Z.-G., & Lin, Y.-Z. (2004). Antitumor effects of vaccine consisting of dendritic cells pulsed with tumor RNA from gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, *10*(5), 630.
- Liu, Q., Zhang, C., Sun, A., Zheng, Y., Wang, L., & Cao, X. (2009). Tumor-educated CD11b^{high}IL12 regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *The Journal of Immunology*, *182*(10), 6207-6216.
- Liu, Y., Gu, Y., & Cao, X. The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology* 2015; 4: e1027472; PMID: 26405598.
- Lombardi, V., Van Overtvelt, L., Horiot, S., & Moingeon, P. (2009). Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN- γ , and IL-17A by naive CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology*, *182*(6), 3372-3379.
- Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., & de Sauvage, F. J. (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(25), 15047-15052.
- Lutz, M. B., & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology*, *23*(9), 445-449.
- Ma, Y., Shurin, G. V., Gutkin, D. W., & Shurin, M. R. (2012). *Tumor associated regulatory dendritic cells*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Mackey, M. F., Gunn, J. R., Maliszewski, C., Kikutani, H., Noelle, R. J., & Barth, R. J. (1998). Cutting edge: dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *The Journal of Immunology*, *161*(5), 2094-2098.
- Makar, K. W., Poole, E. M., Resler, A. J., Seufert, B., Curtin, K., Kleinstein, S. E., . . . Whitton, J. (2013). COX-1 (PTGS1) and COX-2 (PTGS2) polymorphisms, NSAID interactions, and risk of colon and rectal cancers in two independent populations. *Cancer Causes & Control*, *24*(12), 2059-2075.
- Makino, M., Maeda, Y., Mukai, T., & Kaufmann, S. H. (2006). Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL - 1 β . *European journal of immunology*, *36*(6), 1443-1452.
- Maldonado, R. A., & von Andrian, U. H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells *Advances in immunology* (Vol. 108, pp. 111-165): Elsevier.
- Manavalan, J. S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A. J., Vlad, G., Colombo, P. C., . . . Suci-Foca, N. (2004). Alloantigen specific CD8⁺ CD28⁻ FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *International immunology*, *16*(8), 1055-1068.

- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., . . . Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- β induces development of the T H 17 lineage. *Nature*, *441*(7090), 231.
- Manici, S., Sturniolo, T., Imro, M. A., Hammer, J., Sinigaglia, F., Noppen, C., . . . Dellabona, P. (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4+ cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(5), 871-876.
- Manickan, E., Kanangat, S., Rouse, R. J., Yu, Z., & Rouse, B. T. (1997). Enhancement of immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, *61*(2), 125-132.
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'rourke, K., Roose-Girma, M., . . . Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, *440*(7081), 228.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., & Ferrone, S. (1999). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance *Advances in immunology* (Vol. 74, pp. 181-273): Elsevier.
- Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T H 1 priming. *Nature immunology*, *5*(12), 1260.
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular cell*, *10*(2), 417-426.
- Mayordomo, J., Zorina, T., Storkus, W., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L., . . . Deleo, A. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature medicine*, *1*(12), 1297.
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Garcia - Prats, M. D., DeLeo, A. B., & Lotze, M. T. (1997). Bone marrow - derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide - based antitumor vaccines. *Stem cells*, *15*(2), 94-103.
- McAllister, C. S., & Samuel, C. E. (2009). The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon- β and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(3), 1644-1651.
- McArthur, J. G., & Mulligan, R. C. (1998). Induction of protective anti-tumor immunity by gene-modified dendritic cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *21*(1), 41-47.
- McIlroy, D., & Gregoire, M. (2003). Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *52*(10), 583-591.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., & Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nature immunology*, *5*(5), 503.

- Michielsen, A. J., Hogan, A. E., Marry, J., Tosetto, M., Cox, F., Hyland, J. M., . . . Ryan, E. J. (2011). Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS one*, *6*(11), e27944.
- Minami, T., Nakanishi, Y., Izumi, M., Harada, T., & Hara, N. (2003). Enhancement of antigen-presenting capacity and antitumor immunity of dendritic cells pulsed with autologous tumor-derived RNA in mice. *Journal of immunotherapy*, *26*(5), 420-431.
- Mitsunaga, S., Ikeda, M., Shimizu, S., Ohno, I., Furuse, J., Inagaki, M., . . . Ochiai, A. (2013). Serum levels of IL-6 and IL-1 β can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer*, *108*(10), 2063.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, *22*(2), 240-273.
- Moldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E., & Davis, M. M. (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nature medicine*, *6*(9), 1018.
- Möller, P., Mattfeldt, T., Gross, C., Schlosshauer, P., Koch, A., Koretz, K., . . . Otto, H. (1989). Expression of HLA-A,-B,-C,-DR,-DP,-DQ, and of HLA-D-associated invariant chain (Ii) in non-neoplastic mammary epithelium, fibroadenoma, adenoma, and carcinoma of the breast. *The American journal of pathology*, *135*(1), 73.
- Moreno, A., Clavijo, P., Edelman, R., Davis, J., Szteln, M., Herrington, D., & Nardin, E. (1991). Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein. *International immunology*, *3*(10), 997-1003.
- Mouillot, G., Marcou, C., Zidi, I., Guillard, C., Sangrouber, D., Carosella, E. D., & Moreau, P. (2007). Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells. *Human immunology*, *68*(4), 277-285.
- Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., Van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., . . . Docherty, M. (2013). Transcriptional reprogramming of mature CD4+ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nature immunology*, *14*(3), 281.
- Mumberg, D., Monach, P. A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A. Y., Schreiber, R. D., & Schreiber, H. (1999). CD4+ T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN- γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(15), 8633-8638.
- Munir, S., Larsen, S. K., Iversen, T. Z., Donia, M., Klausen, T. W., Svane, I. M., . . . Andersen, M. H. (2012). Natural CD4+ T-cell responses against indoleamine 2, 3-dioxygenase. *PLoS one*, *7*(4), e34568.
- Nair, S. K., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, J. S., . . . Gilboa, E. (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nature medicine*, *6*(9), 1011.
- Nair, S. K., Snyder, D., Rouse, B. T., & Gilboa, E. (1997). Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen - presenting cells pulsed with tumor extracts. *International journal of cancer*, *70*(6), 706-718.

- Najar, H. M., Bru-Capdeville, A., Gieseler, R., & Peters, J. (1990). Differentiation of human monocytes into accessory cells at serum-free conditions. *European journal of cell biology*, *51*(2), 339-346.
- Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*, *177*(4), 2080-2087.
- Ngoi, S. M., Tovey, M. G., & Vella, A. T. (2008). Targeting poly (I: C) to the TLR3-independent pathway boosts effector CD8 T cell differentiation through IFN- α/β . *The Journal of Immunology*, *181*(11), 7670-7680.
- Nisini, R., Paroli, M., Accapezzato, D., Bonino, F., Rosina, F., Santantonio, T., . . . Barnaba, V. (1997). Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *Journal of virology*, *71*(3), 2241-2251.
- Nociari, M., Ocheretina, O., Schoggins, J. W., & Falck-Pedersen, E. (2007). Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. *Journal of virology*, *81*(8), 4145-4157.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., . . . Jetten, A. M. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, *448*(7152), 480.
- Obermaier, B., Dauer, M., Herten, J., Schad, K., Endres, S., & Eigler, A. (2003). Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biological procedures online*, *5*(1), 197.
- Obermayer, N., & Kalinski, P. (2012). Generation of myeloid-derived suppressor cells using prostaglandin E 2. *Transplantation research*, *1*(1), 15.
- Offringa, R., van der Burg, S. H., Ossendorp, F., Toes, R. E., & Melief, C. J. (2000). Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. *Current opinion in immunology*, *12*(5), 576-582.
- Ohue, Y., Eikawa, S., Okazaki, N., Mizote, Y., Isobe, M., Uenaka, A., . . . Nakayama, E. (2012). Spontaneous antibody, and CD4 and CD8 T - cell responses against XAGE - 1b (GAGED2a) in non - small cell lung cancer patients. *International journal of cancer*, *131*(5).
- Oida, T., & Weiner, H. L. (2010). Depletion of TGF- β from fetal bovine serum. *Journal of immunological methods*, *362*(1-2), 195-198.
- Okada, N., Saito, T., Masunaga, Y., Tsukada, Y., Nakagawa, S., Mizuguchi, H., . . . Hayakawa, T. (2001). Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate antitumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer research*, *61*(21), 7913-7919.
- Oosting, M., Cheng, S.-C., Bolscher, J. M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T. S., Verschueren, I. C., . . . Sturm, P. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(42), E4478-E4484.

- Orentas, R. J., Schauer, D., Bin, Q., & Johnson, B. D. (2001). Electrofusion of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine. *Cellular immunology*, 213(1), 4-13.
- Ossevoort, M. A., Feltkamp, M., Melief, C., & Kast, W. (1995). Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy*, 18(2), 86-94.
- Paczesny, S., Beranger, S., Salzmann, J.-L., Klatzmann, D., & Colombo, B. M. (2001). Protection of mice against leukemia after vaccination with bone marrow-derived dendritic cells loaded with apoptotic leukemia cells. *Cancer research*, 61(6), 2386-2389.
- Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M., & Colombo, M. P. (1996). Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 183(1), 317-322.
- Pai, S.-Y., Truitt, M. L., & Ho, I.-C. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1993-1998.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2013). Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 39(1), 38-48.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., . . . Tian, Q. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*, 6(11), 1133.
- Pavlović, B., Mojsilović, S., Majstorović, I., Vasilijic, S., Bufan, B., & Janković, S. (2005). The potential of human monocytes to differentiate into fast-dendritic cells correlates with early production of IL-6 in culture. *Clinical Application in Immunology*, 4, 447-453.
- Pedersen, A. E., Thorn, M., Gad, M., Walter, M., Johnsen, H., Gaarsdal, E., . . . Svane, I. (2005). Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination. *Scandinavian journal of immunology*, 61(2), 147-156.
- Peters, J., Ruppert, J., Gieseler, R., Najjar, H., & Xu, H. (1991). Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology*, 59(3), 122-126.
- Peters, J. H., Gieseler, R., Thiele, B., & Steinbach, F. (1996). Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunology today*, 17(6), 273-278.
- Peters, J. H., Ruhl, S., & Friedrichs, D. (1987). Veiled accessory cells deduced from monocytes. *Immunobiology*, 176(1-2), 154-166.
- Peters, J. H., Xu, H., Ostermeier, D., Friedrichs, D., Gieseler, R. K., & Ruppert, J. (1993). Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro *Dendritic cells in fundamental and clinical immunology* (pp. 275-280): Springer.

- Pietschmann, P., Stockl, J., Draxler, S., Majdic, O., & Knapp, W. (2000). Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium. *Scandinavian journal of immunology*, *51*(4), 377-383.
- Pillay, V., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2011). Antibodies in oncology. *New biotechnology*, *28*(5), 518-529.
- Pol, J., Bloy, N., Buqué, A., Eggermont, A., Cremer, I., Sautes-Fridman, C., . . . Kroemer, G. (2015). Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. *OncImmunity*, *4*(4), e974411.
- Qi, W., Huang, X., & Wang, J. (2013). Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cellular immunology*, *285*(1-2), 18-22.
- Qin, Z., & Blankenstein, T. (2000). CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN γ receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*, *12*(6), 677-686.
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., . . . Antony, P. A. (2010). Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(3), 637-650.
- Ramadan, G., Konings, S., Kurup, V., & Keever-Taylor, C. (2004). Generation of Aspergillus-and CMV-specific T-cell responses using autologous fast DC. *Cytotherapy*, *6*(3), 223-234.
- Ramos, R. N., Moraes, C. J. d., Zelante, B., & Barbuto, J. A. M. (2013). What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*.
- Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M., & Muller, W. A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, *282*(5388), 480-483.
- Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M., & Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*, *11*(6), 753-761.
- Rasmussen, S. B., Sørensen, L. N., Malmgaard, L., Ank, N., Baines, J. D., Chen, Z. J., & Paludan, S. R. (2007). Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *Journal of virology*, *81*(24), 13315-13324.
- Ribas, A., Butterfield, L. H., Hu, B., Dissette, V. B., Chen, A. Y., Koh, A., . . . Economou, J. S. (2000). Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells. *Journal of immunotherapy*, *23*(1), 59-66.
- Ristich, V., Liang, S., Zhang, W., Wu, J., & Horuzsko, A. (2005). Tolerization of dendritic cells by HLA - G. *European journal of immunology*, *35*(4), 1133-1142.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., . . . Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*, *180*(1), 83-93.

- Romani, N., Inaba, K., Puré, E., Crowley, M., Witmer-Pack, M., & Steinman, R. M. (1989). A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulate DNA synthesis in mouse T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *169*(3), 1153-1168.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kämpgen, E., Eibl, B., . . . Schuler, G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood An improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of immunological methods*, *196*(2), 137-151.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature medicine*, *10*(9), 909.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., . . . Spiess, P. J. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature medicine*, *4*(3), 321-327.
- Roses, R. E., Xu, S., Xu, M., Koldovsky, U., Koski, G., & Czerniecki, B. J. (2008). Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *The Journal of Immunology*, *181*(7), 5120-5127.
- Rossi, G., Heveker, N., Thiele, B., Gelderblom, H., & Steinbach, F. (1992). Development of a Langerhans cell phenotype from peripheral blood monocytes. *Immunology letters*, *31*(2), 189-197.
- Rouas, R., Lewalle, P., El Ouriaghli, F., Nowak, B., Duveillier, H., & Martiat, P. (2004). Poly (I: C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL - 12. *International immunology*, *16*(5), 767-773.
- Ruppert, J., Friedrichs, D., Xu, H., & Peters, J. H. (1991). IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiology*, *182*(5), 449-464.
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(4), 1109-1118.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., . . . Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology*, *28*(9), 2760-2769.
- Sánchez-Torres, C., García-Romo, G. S., Cornejo-Cortés, M. A., Rivas-Carvalho, A., & Sánchez-Schmitz, G. (2001). CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *International immunology*, *13*(12), 1571-1581.
- Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., & Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(10), 1777-1788.

- Saraiva, M., Christensen, J. R., Veldhoen, M., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & O'garra, A. (2009). Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity*, *31*(2), 209-219.
- Saraiva, M., & O'garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, *10*(3), 170.
- Schirmer, M., Smeekens, S. P., Vlamakis, H., Jaeger, M., Oosting, M., Franzosa, E. A., . . . Bonder, M. J. (2016). Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell*, *167*(4), 1125-1136. e1128.
- Schmidt, T., Ziske, C., Märten, A., Endres, S., Tiemann, K., Schmitz, V., . . . Schmidt-Wolf, I. G. (2003). Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model. *Cancer research*, *63*(24), 8962-8967.
- Schreibelt, G., Klinkenberg, L. J., Cruz, L. J., Tacke, P. J., Tel, J., Kreutz, M., . . . de Vries, I. J. M. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-) presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood*, *119*(10), 2284-2292.
- Schwarz, M. A., Hamilton, L. D., Tardelli, L., Narula, S. K., & Sullivan, L. M. (1994). Stimulation of cytolytic activity by interleukin-10. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy*, *16*(2), 95-104.
- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., & de St Groth, B. F. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *Journal of Experimental Medicine*, *176*(4), 1091-1098.
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., & Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, *19*(1), 59-70.
- Sharma, S., Stolina, M., Yang, S.-C., Baratelli, F., Lin, J. F., Atianzar, K., . . . Huang, M. (2003). Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clinical Cancer Research*, *9*(3), 961-968.
- Shi, M., Lin, T. H., Appell, K. C., & Berg, L. J. (2008). Janus-kinase-3-dependent signals induce chromatin remodeling at the *Ifng* locus during T helper 1 cell differentiation. *Immunity*, *28*(6), 763-773.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., . . . Vignali, D. A. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted *State6* gene. *Nature*, *380*(6575), 630.
- Siegel, M. D., Zhang, D.-H., Ray, P., & Ray, A. (1995). Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(41), 24548-24555.
- Silveira, G. F., Wowk, P. F., Machado, A. M. B., dos Santos, C. N. D., & Bordignon, J. (2013). Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PloS one*, *8*(7), e71291.

- Sinha, P., Clements, V. K., Fulton, A. M., & Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, 67(9), 4507-4513.
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C., & Kapsenberg, M. L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *International immunology*, 10(11), 1593-1598.
- Soghoian, D. Z., Jessen, H., Flanders, M., Sierra-Davidson, K., Cutler, S., Pertel, T., . . . Lane, K. (2012). HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Science translational medicine*, 4(123), 123ra125-123ra125.
- Sojka, D. K., & Fowell, D. J. (2011). Regulatory T cells inhibit acute IFN- γ synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18336-18341.
- Song, W., Kong, H.-L., Carpenter, H., Torii, H., Granstein, R., Rafii, S., . . . Crystal, R. G. (1997). Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 186(8), 1247-1256.
- Spann, K. M., Tran, K. C., & Collins, P. L. (2005). Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines. *Journal of virology*, 79(9), 5353-5362.
- Spisek, R., Bougras, G., Ebstein, F., Masse, D., Meflah, K., McIlroy, D., & Gregoire, M. (2003). Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52(7), 445-454.
- Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Meflah, K., & Gregoire, M. (2001). Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 50(8), 417-427.
- Steinman, R., Kaplan, G., Witmer, M., & Cohn, Z. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 149(1), 1-16.
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142-1162.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*, 21(1), 685-711.
- Steinman, R. M., & Nussenzweig, M. C. (1980). Dendritic cells: features and functions. *Immunological reviews*, 53(1), 127-147.
- Steinman, R. M., & Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 5132-5136.

- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity*, *24*(1), 93-103.
- Sukhorukov, V. L., Reuss, R., Endter, J. M., Fehrmann, S., Katsen-Globa, A., Geßner, P., . . . Zimmermann, U. (2006). A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *346*(3), 829-839.
- Swain, S., Weinberg, A., English, M., & Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *The Journal of Immunology*, *145*(11), 3796-3806.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, *100*(6), 655-669.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, *295*(5553), 338-342.
- Tacken, P. J., de Vries, I. J. M., Gijzen, K., Joosten, B., Wu, D., Rother, R. P., . . . Adema, G. J. (2005). Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood*, *106*(4), 1278-1285.
- Tacken, P. J., Ginter, W., Berod, L., Cruz, L. J., Joosten, B., Sparwasser, T., . . . Cambi, A. (2011). Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood*, *118*(15), 4111-4119.
- Tacken, P. J., ter Huurne, M., Torensma, R., & Figdor, C. G. (2012). Antibodies and carbohydrate ligands binding to DC - SIGN differentially modulate receptor trafficking. *European journal of immunology*, *42*(8), 1989-1998.
- Tacken, P. J., Zeelenberg, I. S., Cruz, L. J., van Hout-Kuijper, M. A., van de Glind, G., Fokkink, R. G., . . . Figdor, C. G. (2011). Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood*, *118*(26), 6836-6844.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S.-i., . . . Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, *380*(6575), 627.
- Tanaka, H., Shimizu, K., Hayashi, T., & Shu, S. (2002). Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells. *Cellular immunology*, *220*(1), 1-12.
- Tanikawa, T., Wilke, C. M., Kryczek, I., Chen, G. Y., Kao, J., Núñez, G., & Zou, W. (2012). Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis. *Cancer research*, *72*(2), 420-429.
- Tempero, R. M., VanLith, M. L., Morikane, K., Rowse, G. J., Gendler, S. J., & Hollingsworth, M. A. (1998). CD4+ lymphocytes provide MUC1-specific tumor immunity in vivo that is undetectable in vitro and is absent in MUC1 transgenic mice. *The Journal of Immunology*, *161*(10), 5500-5506.
- Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., . . . Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology*, *147*(3), 599-610.

- Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., . . . Grosveld, G. C. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, *382*(6587), 171.
- Thomas, W. D., & Hersey, P. (1998). CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95). *International journal of cancer*, *75*(3), 384-390.
- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annual review of immunology*, *32*, 51-82.
- Trinchieri, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(2), 239-243.
- Truxova, I., Pokorna, K., Kloudova, K., Partlova, S., Spisek, R., & Fucikova, J. (2014). Day 3 Poly (I: C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs. *Immunology letters*, *160*(1), 39-49.
- Tscharke, D. C., Croft, N. P., Doherty, P. C., & La Gruta, N. L. (2015). Sizing up the key determinants of the CD8+ T cell response. *Nature Reviews Immunology*, *15*(11), 705.
- Tsuji, T., Matsuzaki, J., Ritter, E., Miliotto, A., Ritter, G., Odunsi, K., . . . Gnjatic, S. (2011). Split T cell tolerance against a self/tumor antigen: spontaneous CD4+ but not CD8+ T cell responses against p53 in cancer patients and healthy donors. *PloS one*, *6*(8), e23651.
- Tütting, T., Deleo, A. B., Lotze, M. T., & Storkus, W. J. (1997). Genetically modified bone marrow - derived dendritic cells expressing tumor - associated viral or “ self ” antigens induce antitumor immunity in vivo. *European journal of immunology*, *27*(10), 2702-2707.
- Tütting, T., Steitz, J., Brück, J., Gambotto, A., Steinbrink, K., DeLeo, A. B., . . . Enk, A. H. (1999). Dendritic cell - based genetic immunization in mice with a recombinant adenovirus encoding murine TRP2 induces effective anti - melanoma immunity. *The journal of gene medicine*, *1*(6), 400-406.
- Tze, L. E., Horikawa, K., Domaschenz, H., Howard, D. R., Roots, C. M., Rigby, R. J., . . . Andoniou, C. E. (2011). CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10–driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(1), 149-165.
- Van der Jeught, K., Van Lint, S., Thielemans, K., & Breckpot, K. (2015). Intratumoral delivery of mRNA: overcoming obstacles for effective immunotherapy. *Oncolimmunology*, *4*(5), e1005504.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., . . . Bertier, L. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature methods*, *14*(3), 228.
- Van Meirvenne, S., Straetman, L., Heirman, C., Dullaers, M., De Greef, C., Van Tendeloo, V., & Thielemans, K. (2002). Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer gene therapy*, *9*(9), 787.

- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189.
- Verdijk, R. M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C. J., Brand, A., & Goulmy, E. (1999). Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly (I: C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 163(1), 57-61.
- Viaud, S., Théry, C., Ploix, S., Tursz, T., Lapierre, V., Lantz, O., . . . Chaput, N. (2010). Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer research*, 70(4), 1281-1285.
- Voehringer, D., Shinkai, K., & Locksley, R. M. (2004). Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*, 20(3), 267-277.
- Von Bubnoff, D., Scheler, M., Wilms, H., Fimmers, R., & Bieber, T. (2011). Identification of IDO-positive and IDO-negative human dendritic cells after activation by various proinflammatory stimuli. *The Journal of Immunology*, 186(12), 6701-6709.
- Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nature medicine*, 9(3), 269.
- Walker, L. S. (2013). Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of autoimmunity*, 45, 49-57.
- Walsh, K. P., & Mills, K. H. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in immunology*, 34(11), 521-530.
- Wan, Y., Bramson, J., Carter, R., Graham, F., & Gauldie, J. (1997). Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Human gene therapy*, 8(11), 1355-1363.
- Wan, Y., Emtage, P., Zhu, Q., Foley, R., Pilon, A., Roberts, B., & Gauldie, J. (1999). Enhanced immune response to the melanoma antigen gp100 using recombinant adenovirus-transduced dendritic cells. *Cellular immunology*, 198(2), 131-138.
- Wang, J., Saffold, S., Cao, X., Krauss, J., & Chen, W. (1998). Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *The Journal of Immunology*, 161(10), 5516-5524.
- Wang, L., Pino-Lagos, K., de Vries, V. C., Guleria, I., Sayegh, M. H., & Noelle, R. J. (2008). Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9331-9336.
- Weber, A., Kirejczyk, Z., Besch, R., Potthoff, S., Leverkus, M., & Häcker, G. (2010). Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell death and differentiation*, 17(6), 942.
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M., & O'Shea, J. J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34605-34610.

- Wilczynski, J. R. (2006). Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. *Chemotherapy*, 52(3), 107-110.
- Williamson, B. D., Carswell, E. A., Rubin, B. Y., Prendergast, J. S., & Old, L. J. (1983). Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(17), 5397-5401.
- Xie, Y., Akpinarli, A., Maris, C., Hipkiss, E. L., Lane, M., Kwon, E.-K. M., . . . Antony, P. A. (2010). Naive tumor-specific CD4⁺ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, 207(3), 651-667.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., & Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . *The Journal of Immunology*, 178(11), 6725-6729.
- Yamanaka, R., Zullo, S. A., Tanaka, R., Blaese, M., & Xanthopoulos, K. G. (2001). Enhancement of antitumor immune response in glioma models in mice by genetically modified dendritic cells pulsed with Semliki Forest virus—mediated complementary DNA. *Journal of neurosurgery*, 94(3), 474-481.
- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Omori, M., Inami, M., Taniguchi, M., & Nakayama, T. (2002). Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42399-42408.
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., . . . Watowich, S. S. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29(1), 44-56.
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., & Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9358-9363.
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., . . . Schluns, K. S. (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity*, 28(1), 29-39.
- Yang, Y., Ochando, J. C., Bromberg, J. S., & Ding, Y. (2007). Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN γ /Stat1 signals. *Blood*, 110(7), 2494-2500.
- Yen, J.-H., & Ganea, D. (2009). Interferon β induces mature dendritic cell apoptosis through caspase-11/caspase-3 activation. *Blood*, 114(7), 1344-1354.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., . . . Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*, 5(7), 730.
- Yoshida, N., Abe, H., Ohkuri, T., Wakita, D., Sato, M., Noguchi, D., . . . Ikeda, H. (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *International journal of oncology*, 28(5), 1089-1098.

- Zanetti, M. (2015). Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. *The Journal of Immunology*, 194(5), 2049-2056.
- Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Gleaves, L. A., McLoed, A. G., Saxon, J. A., Habermann, A. C., . . . Fingleton, B. (2015). Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. *Cancer research*, 75(8), 1624-1634.
- Zeis, M., Siegel, S., Wagner, A., Schmitz, M., Marget, M., Kühl-Burmeister, R., . . . Schmitz, N. (2003). Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5391-5397.
- Zeng, G., Touloukian, C. E., Wang, X., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., & Wang, R.-F. (2000). Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *The Journal of Immunology*, 165(2), 1153-1159.
- Zeng, G., Wang, X., Robbins, P. F., Rosenberg, S. A., & Wang, R.-F. (2001). CD4+ T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3964-3969.
- Zhang, D.-H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., & Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21597-21603.
- Zhang, D.-H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., & Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity*, 11(4), 473-482.
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161-168.
- Zheng, S. G., Wang, J. H., Gray, J. D., Soucier, H., & Horwitz, D. A. (2004). Natural and induced CD4+ CD25+ cells educate CD4+ CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5213-5221.
- Zheng, X., Koropatnick, J., Chen, D., Velenosi, T., Ling, H., Zhang, X., . . . Urquhart, B. (2013). Silencing IDO in dendritic cells: a novel approach to enhance cancer immunotherapy in a murine breast cancer model. *International journal of cancer*, 132(4), 967-977.
- Zheng, Y., Manzotti, C. N., Liu, M., Burke, F., Mead, K. I., & Sansom, D. M. (2004). CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2778-2784.
- Zhou, L., Chong, M. M., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 30(5), 646-655.

- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., . . . Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T H-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology*, *8*(9), 967.
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., . . . Rudensky, A. Y. (2008). TGF- β -induced Foxp3 inhibits T H 17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*, *453*(7192), 236.
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, *19*(5), 739-748.
- Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J., & Paul, W. E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *The Journal of Immunology*, *166*(12), 7276-7281.
- Zhu, J., Jankovic, D., Oler, A. J., Wei, G., Sharma, S., Hu, G., . . . Punkosdy, G. (2012). The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity*, *37*(4), 660-673.
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C. J., Grinberg, A., Wang, Q., . . . Paul, W. E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T H 1-T H 2 responses. *Nature immunology*, *5*(11), 1157.
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2009). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*, *28*, 445-489.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., . . . Randolph, G. J. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, *116*(16), e74-e80.
- Ziegler, A., Heidenreich, R., Braumüller, H., Wolburg, H., Weidemann, S., Mocikat, R., & Röcken, M. (2009). EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. *Blood*, *113*(15), 3494-3502.
- Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A. B., Clarke, M. R., Lotze, M. T., & Storkus, W. J. (1996). Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, *183*(1), 87-97.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., . . . Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature medicine*, *4*(5), 594.

9 BIOGRAFIJA AUTORA

Bojan Pavlović je rođen 29. 06. 1978. godine u Aleksincu. Nakon završene gimnazije „Drakče Milovanović“ u Aleksincu, školske 1997/98. godine upisao je Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, koji je završio 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,10. Od 2005. do 2010. godine bio je zaposlen u Galenici a.d., a od 2015. godine radi kao Direktor u Phytonet d.o.o. Školske 2006/07. godine upisao je poslediplomske doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul farmakologija-imunofarmakologija. S obzirom da mu je istekao zakonom predviđen rok za završetak istih ponovo je 2015/16. godine upisao doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu uz priznavanje svih položenih ispita. Uključen je u naučno-istraživački rad na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Objavljeni naučni radovi i saopštenja

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Pavlović B, Tomić S, Đokić J, Vasilijić S, Vučević D, Lukić J, Gruden-Movsesijan A, Ilić N, Marković M, Čolić M. Fast dendritic cells matured with Poly (I:C) may acquire tolerogenic properties. *Cytotherapy* doi: 10.1016/j.jcyt.2015.08.001.

2. Thorne A, Tomić S, Pavlović B, Mihajlović D, Džopalić T, Čolić M. Tumor necrosis factor- α promotes survival and phenotypic maturation of poly(I:C)-treated dendritic cells but impairs their Th1 and Th17 polarizing capability. *Cytotherapy* 2015 May;17(5):633-46. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.11.006.

Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. Čolić M, Stojić-Vukanić Z, Pavlović B, Jandrić D, Stefanoska I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2003; 134(1):63-69.

Rad objavljen u međunarodnom časopisu (M23)

1. Majstorović I, Vučević D, Pavlović B, Vasilijić S, Čolić M. An anti-DEC-205 monoclonal antibody stimulates binding of thymocytes to rat thymic dendritic cells and promotes apoptosis of thymocytes. *Cent Eur J Immunol.* 2014; 39(4):411-418. doi:

10.5114/ceji.2014.47722.

Rad objavljen u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M24)

1. Čolić M, Mojsilović S, Pavlović B, Vučićević D, Majstorović I, Bufan B, Stojić Vukanić Z, Vasilijić S, Vučević D, Gašić S, Balint B. Comparasion of two different protocols for the induction of maturation of human dendritic cells in vitro. *Vojnosanit Pregl* 2004; 61 (5): 471-478.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)

1. Mojsilović S, Bufan B, Pavlović B, Vasilijić S, Majstorović I, Vučićević D, Čolić M. Generation of maturationally and functionally different populations of human dendritic cells from monocytes in vitro for potential targeting with biocompatible microspheres. *Chemical Industry* 2004. Supplement Vol 58 (6a): 85-87.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. Radeta M, Novaković J, Popadić D, Vico-Stevanović M, Čolić M, Pavlović B. Thymus gland - chemical and biological determination of its peptides components. 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finland, 31.8.-5.9. 2008.

2. Mojsilović S, Bufan B, Majstorović I, Pavlović B, Vučević D, Vučićević D, Vasilijić S, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Čolić M. In vitro effect of IL-17 on differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. The First Congress of Physiological Sciences of Serbia and Montenegro with International participation. November 9-12, 2005. Belgrade, Serbia and Montenegro. Abstract book: pp 148.

3. Pavlović B, Mojsilović S, Majstorović I, Vasilijić S, Bufan B, Janković S, Čolić M. The potential of human monocytes to differentiate into fast-dendritic cells correlates with early production of IL-6 in culture. The First Congress of Physiological Sciences of Serbia and Montenegro with International participation. November 9-12, 2005. Belgrade, Serbia and Montenegro. Abstract book: pp 154.

4. Mojsilović S, Bufan B, Majstorović I, Pavlović B, Vučević D, Vučićević D, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P and Čolić M. IL-17 modulates differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. 4th Balkan Congress of Immunology. September 5-8, 2004. Istanbul, Turkey. Turkish Journal of Immunology 2004. Supplement 9(2): pp 116.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. Mojsilović S, Bufan B, Majstorović I, Pavlović B, Vasilijić S, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Čolić M. Efekat IL-17 na humane dendritične ćelije monocitnog porekla in vitro. XII Hematološki dani. Oktobar, 2004. Niška Banja. Bilten za hematologiju 2004. Vol. 32 (1/2): pp 34, PP74

Ostale publikacije

1. Pavlović B, Mojsilović S, Majstorović I, Vasilijić S, Bufan B, Janković S, Čolić M. The potential of human monocytes to differentiate into fast-dendritic cells correlates with early production of IL-6 in culture. Clin Appl Immunol 2005; 4: 447-453.

2. Čolić M, Popović R, Mrdaković D, Radeta M, Novaković J, Pavlović B, Vučević D. Evaluation of the Immunomodulatory Properties of a Calf Lipid Thymus Extract and Standardization of a Method for Quantification of its Biological Activity, American Journal of Immunology, 2008; 3(2):35-44.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: Bojan Pavlović

Broj upisa:

Izjavljujem:

Da je doktorska disertacija pod naslovom:

Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih od monocita skraćenjem vremena diferencijacije

- Rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- Da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- Da su rezultati korektno navedeni i
- Da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica

U Beogradu, _____

Potpis doktoranta

Prilog 2

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i preyime autora: Bojan Pavlović

Broj upisa:

Studijski program: Doktorske akademske studije, modul: farmakologija

Naslov rada: **Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih od monocita skraćenjem vremena diferencijacije**

Mentor: Prof. dr Zorica Stojić-Vukanić, Dr sci. Biol. Sergej Tomić

Potpisani Bojan Pavlović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, _____

Potpis doktoranta

Prilog 3

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Sazrevanje i funkcija humanih dendritskih ćelija dobijenih od monocita skraćanjem vremena diferencijacije

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, _____

Potpis doktoranta
