

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie
Oddělení vývojové biologie a imunologie

Imunoterapie karcinomu ovaria dendritickými buňkami

Simona Partlová

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Daniela Rožková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím uvedené literatury.

V Praze

.....

Poděkování:

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Daniele Rožkové, Ph.D. za odborné rady a podporu. Poděkování náleží také RNDr. Anně Fialové, Ph.D. za pomoc, konzultace a cenné rady. Dále děkuji kolektivu Ústavu imunologie 2.LF UK a FN Motol za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych ráda poděkovala celé své rodině za trpělivost a podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1 Imunitní systém.....	2
2.2 Buňky prezentující antigen	3
2.3 Biologie dendritických buněk	3
2.3.1 Původ dendritických buněk.....	3
2.3.2 Subpopulace dendritických buněk	4
2.3.2.1 Plasmacytoidní dendritické buňky	4
2.3.2.2 Myeloidní dendritické buňky	5
2.3.3 Maturace dendritických buněk.....	5
2.3.3.1 Maturační signály.....	6
2.3.4 Migrace dendritických buněk	9
2.3.5 Produkce cytokinů	9
2.3.6 Zpracování a prezentace antigenu.....	10
2.3.7 Imunoregulační funkce dendritických buněk.....	11
2.3.7.1 Aktivace pomocných T lymfocytů.....	11
2.3.7.2 Role DC v aktivaci CD8+ T buněk.....	12
2.4 Protinádorová imunita.....	14
2.5 Ovariální karcinom	15
2.6 Protinádorová imunoterapie.....	16
2.6.1 Využití dendritických buněk v imunoterapii malignit	18
2.6.2 Imunoterapie ovariálního karcinomu dendritickými buňkami	18
2.6.3 Vliv maturačního stavu DC na účinnost vakcín	20
2.6.4 Způsoby pulsace a zdroje nádorových antigenů	22
2.6.5 Vliv apoptotických buněk na imunitní odpověď	22
3. MATERIÁL A METODIKA	25
3.1 Vzorky.....	25
3.2 Materiál	25
3.3 Metody	29
3.3.1 Příprava dendritických buněk diferencovaných z monocytů in vitro	29
3.3.2 Stimulace nezralých dendritických buněk	30
3.3.3 Pěstování nádorové linie OV-90.....	30
3.3.4 Pulsace dendritických buněk nádorovými buňkami linie OV-90.....	30
3.3.5 Apoptóza nádorových buněk	31
3.3.5.1 Navození apoptózy nádorových buněk	31
3.3.5.2 Stanovení apoptózy nádorových buněk – značení Annexinem V	31
3.3.5.3 Stanovení apoptózy nádorových buněk – TUNEL assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling)	32
3.3.6 Fagocytóza nádorových buněk dendritickými buňkami	32
3.3.6.1 Barvení dendritických a nádorových buněk pro účely detekce fagocytózy	33

3.3.6.1.1 Značení nádorových a dendritických buněk membránovými barvami Vybrant DiI a DiO pro stanovení fagocytózy	33
3.3.6.1.2 Značení nádorových a dendritických buněk barvou PKH26 a PKH67 pro stanovení fagocytózy	33
3.3.6.1.3 Značení dendritických buněk protilátkou CD11c pro stanovení fagocytózy	33
3.3.6.2 Stanovení fagocytózy nádorových buněk dendritickými buňkami.....	34
3.3.6.3 Pozorování fagocytózy nádorových buněk na konfokálním mikroskopu.....	34
3.3.7 Test stimulace lymfocytů	34
3.3.8 Detekce povrchových markerů – fenotypizace DC	36
3.3.9 Stanovené množství cytokinů produkovaných stimulovanými dendritickými buňkami metodou Luminex	37
3.3.10 Použití statistických metod	38
4. VÝSLEDKY.....	39
4.1 Testování nádorové linie OV-90 pro vývoj protokolu nádorových vakcín	39
4.1.1 Stanovení apoptózy nádorové linie OV-90.....	39
4.1.2 Stanovení apoptózy nádorové linie OV-90 – TUNEL assay	40
4.1.3 Fagocytóza nádorových buněk dendritickými buňkami	41
4.1.4 Pozorování fagocytózy nádorových buněk na konfokálním mikroskopu.....	44
4.1.5 Test stimulace lymfocytů	44
4.2 Imunosupresivní vliv apoptotických buněk na fenotyp DC	46
4.2.1 Stanovení fenotypu DC s použitím různých maturačních agens spolu s apoptotickými buňkami	46
4.2.2 Stanovení produkce cytokinů u DC s použitím různých maturačních agens spolu s apoptotickými buňkami	50
5. DISKUSE	55
6. SOUHRN.....	59
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	60

SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen presenting cell, antigen prezentující buňka
BCR	B-cell receptor, receptor B lymfocytů
CTLs	cytotoxic lymphocytes, cytotoxické lymfocyty
DC	dendritic cell, dendritická buňka
EBV	Epstein-Barr virus, virus Epsteinova a Barrové
ER	endoplasmatické retikulum
FBP	folate binding protein
FBS	fetal bovine serum, fetální bovinní sérum
FR- α	folate receptor α
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GMP	Good Manufacturing Practise, správná výrobní praxe
HLA	human leukocyte antigen
HSP	heat shock protein, protein tepelného šoku
iDC	immature dendritic cell, nestimulovaná dendritická buňka
iDCp	immature pulsed dendritic cell, nestimulovaná pulsovaná dendritická buňka
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IKK	inhibitor NF- κ B kinázy
IL	interleukin
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase, kinázy asociované s receptorem pro IL-1
IRF	interferon regulatory factor, regulační faktor interferonu
LC	Langerhans cell, Langerhansova buňka
LCL	lymfoblastoidní buněčná linie
LPS	lipopolysacharid
LRR	leucine-rich repeat
MAP-K	mitogen-activated protein kinase, mitogenem aktivovaná protein kináza
mDC	myeloid dendritic cell, myeloidní dendritická buňka
mDC	mature dendritic cell, maturovaná dendritická buňka
mDCp	mature pulsed dendritic cell, maturovaná pulsovaná dendritická buňka

MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MIP	macrophage inflammatory protein
MoDC	Monocyte-derived dendritic cell, dendritická buňka derivovaná z monocytů
mRNA	messenger ribonucleic acid, informační ribonukleová kyselina
MyD	myeloid differentiation factor, myeloidní diferenciační faktor
NF- κ B	nuclear factor- κ B, jaderný faktor κ B
NK	natural killer, přirozený zabíječ
OV-90	nádorová linie ovariálního karcinomu
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns, struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PBS	phospho-saline buffer, fosfátový pufr
pDC	plasmacytoid dendritic cell, plasmacytoidní dendritická buňka
PGE ₂	prostaglandin E2
PMA	phorbol myristyl acetate, forbol myristyl acetát
polyI:C	polyriboinosinic polyribocytidylic acid, polyinosinová polycytosinová kyselina
PRRs	pathogen recognition receptors, receptory rozpoznávající patogeny
PS	phosphatidylserine, fosfatidylserin
PSA	prostate specific antigen, prostatický specifický antigen
SLC	secondary lymphoid-tissue chemokine, chemokin sekundárního lymfoidního orgánu
TAA	tumor associated antigen, antigen asociovaný s nádory
TAK	TGF- β -activated kinase 1, TGF- β aktivovaná kináza 1
TCR	T-cell receptor, receptor T lymfocytů
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
Th	helper T cell, pomocný T lymfocyt
TILs	tumor infiltrating lymphocytes, lymfocyty infiltruující nádory
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádory
Treg	regulatory T cell, regulační T lymfocyt
ÚHKKT	ústav hematologie a krevní transfuze

ABSTRAKT

Imunoterapie karcinomu ovaria dendritickými buňkami

Protinádorová imunoterapie je léčebná strategie zaměřená na vyvolání a udržení imunitních odpovědí proti nádorovým buňkám. V naší práci jsme se zaměřili na imunoterapii ovariálního karcinomu, neboť je jedním z nejběžnějších gynekologických nádorových onemocnění u žen, vyznačující se špatnou prognózou a vysokou mortalitou. Principem imunoterapie je příprava dendritických buněk (DC) z monocytů izolovaných z periferní krve pacienta, které jsou následně pulsovány ozářenými buňkami alogenní linie ovariálního karcinomu. Tyto nezralé pulsované DC jsou poté maturovány a následně kokultivovány s autologními T lymfocyty. Cílem práce bylo prokázat, že jsou dendritické buňky po přidání vhodného maturačního agens a v kombinaci s apoptotickými buňkami nádorové linie ovariálního karcinomu schopny vyvolat specifickou lymfocytární odpověď. Z našich výsledků vyplývá, že 24 h je dostatečná doba k navození apoptózy nádorových buněk, a že po 4-hodinové inkubaci DC pohlcují apoptotické buňky. Dále jsme zjistili, že pohlcení apoptotických buněk dendritickými buňkami stimulovanými polyI:C inhibuje maturaci DC a tudíž i produkci cytokinů IL-12p70, IL-6 a TNF- α . Vzhledem k tomu, že stupeň zralosti DC výraznou měrou ovlivňuje indukci specifické lymfocytární odpovědi, v případě pulsovaných DC došlo ke snížení procenta T lymfocytů, které produkují IFN- γ , oproti buňkám nepulsovaným. Souhrnně lze tedy říci, že u DC stimulovaných polyI:C se projevil inhibiční vliv apoptotických buněk, na základě kterého nebyly DC plně aktivovány a důsledkem čehož pak byla inhibována i výsledná odpověď specifických lymfocytů.

Klíčová slova: dendritické buňky, imunoterapie, karcinom ovaria, maturační agens, apoptotické buňky, polyI:C, specifická lymfocytární odpověď

ABSTRAKT V ANGLICKÉM JAZYCE

Immunotherapy of ovarian carcinoma with dendritic cells

Anticancer immunotherapy is a therapeutical strategy aimed at elicitation and maintenance of immune responses against cancer cells. In this study we have focused on immunotherapy of ovarian cancer, because it is one of the most common gynaecological tumors with poor prognosis and high mortality. Our immunotherapy protocol involves preparing dendritic cells (DC) from monocytes isolated from patient's peripheral blood, which are subsequently pulsed with irradiated cells of established ovarian cancer cell line. These immature pulsed DC are matured and subsequently co-cultivated with autologous T lymphocytes. The aim of this study was to demonstrate, that DC are able to elicit specific immune response after addition of suitable mature agents in combination with apoptotic ovarian tumor cells. Our observations indicate that 24 hours are sufficient for induction of tumor cells apoptosis. Additionally, we have shown that DC successfully ingested most of the apoptotic tumor cells after 4 hours of co-incubation. Furthermore, we have found out that ingestion of apoptotic cells by dendritic cells, which are stimulated with polyI:C, inhibits maturation of DC and consequently also production of cytokines IL-12p70, IL-6 and TNF- α . Whereas DC maturation rate markedly affects induction of specific immune responses, in the case of pulsed DC, in comparison with nonpulsed DC, was decreased ratio of IFN- γ + T lymphocytes. We suppose that ingestion of apoptotic cells impaired maturation of DC induced by polyI:C and consequently diminished their capacity to stimulate specific T lymphocytes.

Key words: dendritic cells, immunotherapy, ovarian carcinoma, maturation agents, apoptotic cells, polyI:C, specific lymphocyte response

1. ÚVOD

Vhledem k tomu, že v současnosti je stimulace protinádorové imunity manipulovanými dendritickými buňkami velmi aktuální, rozhodli jsme se zaměřit na toto téma i v této diplomové práci.

Současným standardem léčby karcinomu ovaria je kombinace operace a chemoterapie. Tato léčba však nedokáže eliminovat všechny nádorové buňky, a proto by jedním z efektivních přístupů mohla být imunoterapie v kombinaci se standardní léčbou. Protinádorové vakcíny jsou založeny na stimulaci buněk imunitního systému, která by měla vést k vyšší účinnosti v obraně proti nádorům. Jedním z nejperspektivnějších imunoterapeutických protokolů je v současné době vakcinace autologními dendritickými buňkami (DC) schopnými prezentovat nádorové antigeny. Dendritické buňky jsou derivované z monocytů (MoDC), neboť v podmínkách *in vitro*, ve vhodném cytokinovém prostředí (IL-4 a GM-CSF) lze připravit relativně velké množství těchto buněk.

Naše pracoviště se dlouhodobě orientuje na protinádorovou terapii založenou na dendritických buňkách. Původně se v preklinických studiích využívaly pro pulsaci DC autologní ozářené nádorové buňky pacientek s ovariálním karcinomem. Izolace dostatečného množství čistých nádorových buněk (minimální počet je 2×10^7) z chirurgicky odstraněné tkáně však není u všech pacientek možná. Proto v současné době používáme nádorovou linii OV-90, u které chceme prokázat, že po pohlcení dendritickými buňkami dochází k efektivní stimulaci protinádorové imunitní odpovědi.

Cílem práce bylo ověřit funkční vlastnosti maturovaných DC pulsovaných apoptotickými nádorovými buňkami linie ovariálního karcinomu.

- Prokazovali jsme apoptózu nádorové linie OV-90 vystavené UV záření
- Sledovali jsme schopnost dendritických buněk pohltnout tyto apoptotické nádorové buňky
- Ověřovali jsme, zda apoptotické nádorové buňky inhibují maturaci dendritických buněk
- Stanovovali jsme schopnost MoDC indukovat specifickou lymfocytární odpověď

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Imunitní systém

Imunitní systém lze charakterizovat jako soustavu, která je ve spolupráci s dalšími tělními systémy schopna rozpoznat nežádoucí změny ve vnějším i vnitřním prostředí a reagovat na ně. Cílem fungování imunitního systému je udržení homeostázy vnitřního prostředí (KREJSEK a KOPECKY 2004). Funkce imunitního systému je založena na interakci dvou jejích složek – nespecifické a antigeně specifické.

Nespecifická (přirozená) imunita je fylogeneticky starší. Její mechanismy jsou tvořeny buněčnými a humorálními složkami, přičemž buněčné složky jsou reprezentovány fagocytujícími buňkami a NK buňkami a humorální složku tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Přirozená imunita umožňuje okamžitou odpověď na přítomnost patogenu a na rozdíl od specifických složek nemá tzv. imunologickou paměť. Zásadní roli v obraně proti infekci hraje samozřejmě i neporušený povrch kůže a sliznic a jejich přirozené neimunitní obranné mechanismy (HOREJSI a BARTUNKOVA 2009).

Evolučně mladší, specifické mechanismy, se aktivují až po setkání s příslušným antigenem. K rozvoji imunitní reakce dochází v průběhu několika dní až týdnů a charakteristickým rysem je imunologická paměť. To je schopnost „pamatovat si“ setkání s mikroorganismem a při opakovaném vystavení stejnému typu mikroorganismu zprostředkovat mnohem rychlejší imunitní reakci. Buněčné složky jsou zajištěny T lymfocyty a B lymfocyty, které se diferencují na plazmatické buňky mající schopnost produkovat protilátky. Významným mechanismem buněčné specifické imunity je diverzita receptorů na T a B lymfocytech (TCR a BCR), která poskytuje imunitnímu systému vysokou specifitu v rozpoznávání infekčních agens a je nepostradatelná pro likvidaci patogenů, kterým se jinak daří unikat mechanismům přirozené imunity.

Mezi těmito dvěma složkami imunity existují spojovací články označující se jako antigen prezentující buňky (APC). Postupem času se ukázalo, že jen vzájemná souhra těchto dvou složek může vést k efektivní imunitní reakci.

2.2 Buňky prezentující antigen

Buňky prezentující antigen (APC) mají schopnost pohltit a zpracovat antigen, navázat antigenní fragmenty na svém povrchu na MHC (major histocompatibility complex) gp II. třídy a prezentovat je tak T lymfocytům, které je rozpoznávají díky svým povrchovým TCR receptorům. Tuto schopnost mají makrofágy, B lymfocyty a podle současných poznatků nejvýznamnější APC, dendritické buňky. Tyto jednotlivé typy APC se od sebe odlišují v různých aspektech, především ale v expresi MHC molekul II. třídy, kostimulačních a adhezivních molekul. Ukázalo se však, že pouze DC jsou schopny stimulovat naivní T lymfocyty, zatímco makrofágy a B lymfocyty nikoliv (STEINMAN *et al.* 1983).

2.3 Biologie dendritických buněk

2.3.1 Původ dendritických buněk

Jako první byly v roce 1868 popsány kožní Langerhansovy buňky, ale zásadní význam měl v roce 1973 objev DC ve slezině myši, který uskutečnili Steinman a Cohn (STEINMAN a COHN 1973).

Dendritické buňky se tvoří z CD34+ prekurzorů v kostní dřeni. Za účasti vhodných růstových faktorů, jako je GM-CSF a některých dalších cytokinů (např. TNF alfa, IL-4) se CD34+ progenitorové buňky diferencují do dvou typů myeloidních prekurzorů, ze kterých vznikají dvě nepříbuzné subpopulace dendritických buněk.

První populací jsou Langerhansovy buňky (LC), specializované epiteliální buňky, které jsou charakteristické expresí molekuly CD1a, přítomností Birbeckových granul a expresí Lag antigenu a E-cadherinu.

Druhou vývojovou větví z CD34+ prekurzorů jsou CD14+ dendritické buňky, které exprimují CD1a, CD9, CD68, CD2 a koagulační faktor XIIIa (CAUX *et al.* 1996).

Kromě myeloidní populace dendritických buněk (mDC) vzniká z lymfoidního prekurzoru CD34+ pravděpodobně také fenotypově odlišná populace plasmacytoidních dendritických buněk (pDC). Jako specifické markery pro pDC byly označeny BDCA-2 a BDCA-4 (DZIOŃEK *et al.* 2002). Zatímco v případě mDC hraje ve vývoji zásadní význam růstový faktor GM-CSF, u pDC je to cytokin IL-3 a CD40L. Myeloidní DC, na

rozdíl od plasmacytoidních, také exprimují vysoké hladiny myeloidního markeru CD11c (GROUARD *et al.* 1997).

V nedávné době byly vyvinuty protokoly, které umožňují přípravu DC *in vitro*. Poměrně snadno lze připravit DC z monocytů v periferní krvi a v přítomnosti cytokinů IL-4 a GM-CSF z nich připravit DC. A právě díky tomuto faktu se začaly DC derivované z monocytů užívat v imunoterapii.

2.3.2 Subpopulace dendritických buněk

V současné době jsou u člověka známy dvě hlavní, fenotypově i funkčně se lišící populace: plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) a myeloidní dendritické buňky (mDC).

2.3.2.1 Plasmacytoidní dendritické buňky

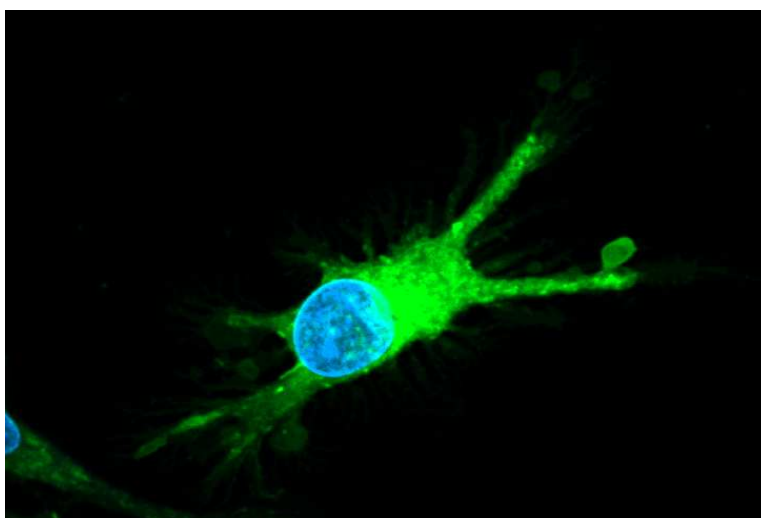
Plasmacytoidní dendritické buňky jsou specializovanou buněčnou populací charakteristickou produkcí velkého množství interferonů typu I v odpovědi na virové podněty. Poprvé byly popsány v roce 1958 Lennertem a Remmelem jako buňky, které jsou podobné plasmatickým buňkám (odtud také jejich název), ale postrádající specifické markery pro B buňky a plasmatické buňky. Lidské pDC jsou charakterizovány jako CD4+CD45RA+IL-3R α (CD123)+ILT3+ILT1-CD11C-lineage- buňky. Dále jsou pro pDC specifické markery BDCA-2 a BDCA-4.

Vzhledem k tomu, že pDC produkují relativně velké množství cytokinů a to převážně interferonů typu I, regulují zánět a propojují přirozenou a adaptivní imunitu. Interferony typu I zvyšují cytolytickou aktivitu NK buněk a současně chrání neinfikované buňky před jejich účinkem. Kromě interferonu produkují pDC také IL-6, který je důležitý při indukci diferenciaci B buněk do plasmatických buněk, které produkují imunoglobuliny. Takto jsou produkovány přednostně IgG dříve než IgM, což znamená, že pDC aktivují převážně paměťové B lymfocyty.

Plasmacytoidní buňky jsou také účinnými producenty chemokinů, které mohou umocnit odpověď přilákáním aktivovaných CD4+ a CD8+ T buněk během imunitní reakce (COLONNA *et al.* 2004).

2.3.2.2 Myeloidní dendritické buňky

Jako myeloidní DC se souhrnně označuje heterogenní populace buněk, která se od pDC liší jak fenotypicky, tak funkčně. Jedním ze základních rozdílů je vysoká exprese CD11c myeloidními buňkami a na rozdíl od pDC myeloidní DC neexprimují molekulu CD123. Do této populace jsou přiřazovány také dendritické buňky, které jsou v *in vitro* podmínkách derivovány z monocytů.



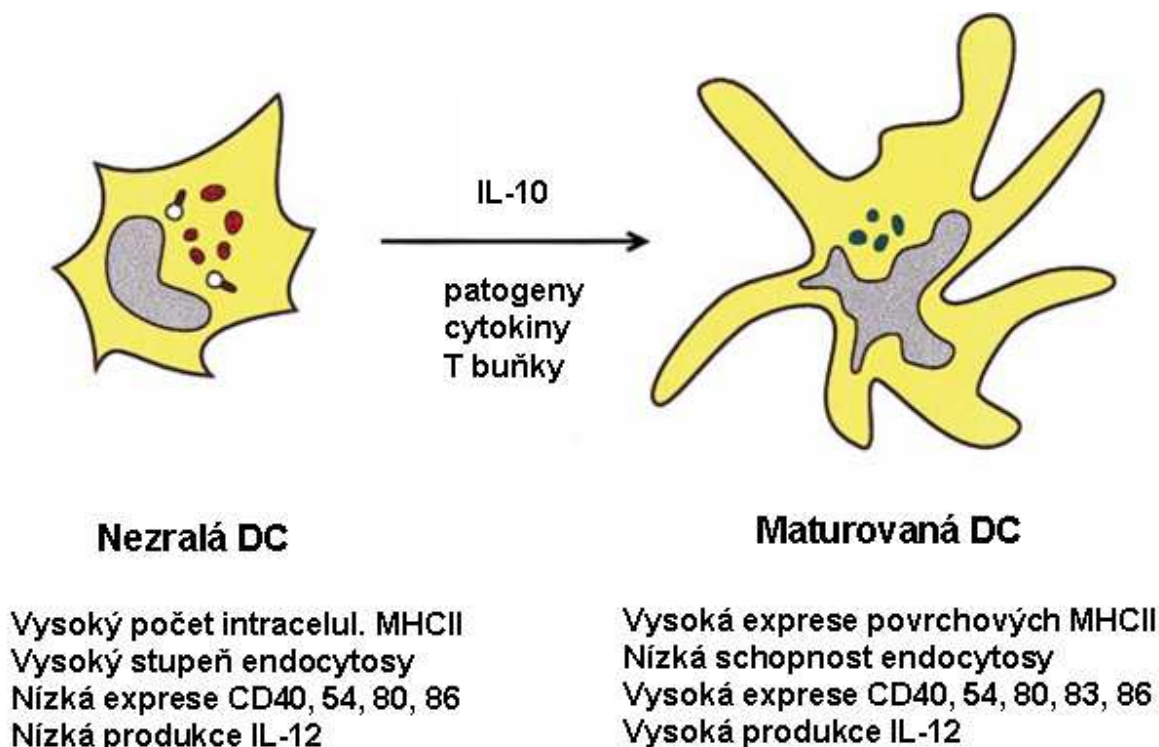
Obr. 2.3: Dendritická buňka (foto z konfokálního mikroskopu Ústav imunologie 2.LF UK FN Motol, nepublikováno)

2.3.3 Maturace dendritických buněk

Dendritické buňky se v organismu vyskytují ve dvou, fenotypově i funkčně odlišných stavech, nezralém a zralém (maturovaném). Nezralé DC se usidlují ve tkáních, kde jsou součástí imunologické bariéry a jsou charakteristické svojí vysokou fagocytární aktivitou. Po setkání s antigenem dochází k fenotypovým a funkčním změnám a z DC se stává antigen prezentující buňka. Proces dozrávání začíná migrací DC z periferní tkáně do sekundárních lymfatických orgánů a končí během interakce DC – T lymfocyt. Proces maturace dendritických buněk je asociován s několika koordinovanými událostmi:

- ◆ Ztráta endocytických-fagocytárních receptorů a diferenciací v buňku prezentující antigen
- ◆ Cytoskeletární reorganizace
- ◆ Zvýšená exprese kostimulačních molekul CD40, CD58, CD80 a CD86
- ◆ Produkce cytokinů

- ◆ Zvýšená exprese MHC glykoproteinů II. třídy (BANCHEREAU *et al.* 2000).



Obr. 2.3.3: Fenotypické změny u nezralých a maturovaných DC (převzato a upraveno z BANCHEREAU a STEINMAN 1998)

2.3.3.1 Maturační signály

Pouze zralé dendritické buňky mají vlastnosti profesionální buňky prezentující antigen a tedy schopnost indukovat specifickou T lymfocytární odpověď. DC jsou na svém povrchu vybaveny širokou škálou receptorů, které umožňují rozpoznat maturační signál a na základě toho, se nezralá DC diferencuje ve zralou DC se schopností prezentovat antigen T lymfocytům.

V současné době je známo relativně velké množství maturačních signálů. Mezi hlavní patří patogenní komponenty rozpoznávané specializovanými receptory, faktory produkované samotným hostitelem (zánětlivé cytokiny, např. TNF) a stresové molekuly, které jsou produkovány při poškození tkáně.

Toll-like receptory

Dendritické buňky exprimují na svém povrchu receptory, které se označují jako PRRs (pathogen recognition receptors), pomocí nichž rozpoznávají specifické struktury patogenů (tzv. PAMPs, pathogen associated molecular patterns). Významnou skupinou PRRs jsou Toll-like receptory (TLR). Nejprve byl popsán protein Toll u octomilky rodu *Drosophila* a teprve později byl identifikován první lidský homolog, který aktivoval podobné signalizační dráhy (MEDZHITOV *et al.* 1997). TLRs jsou transmembránové proteiny, přičemž jejich extracelulární doména obsahuje repetitivní struktury bohaté na aminokyselinu leucin (leucine-rich repeat, LRR), které jsou zodpovědné za rozpoznávání ligandů. Intracelulární část obsahuje Toll/IL-1 receptor (TIR) homologní doménu, která je nepostradatelná pro transdukcí signálu (KAISHO a AKIRA 2006).

Nejvýznamnější TLR receptory a jejich ligandy uvádí tabulka 2.3.3.1.

TLR receptor	Ligand	Druh patogenu
TLR1	triacyl lipopeptidy	bakterie a mykobakterie
TLR2	poriny zymosan peptidoglykan fosfolipomanan	<i>Neisseria</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i> G+ bakterie <i>Candida albicans</i>
TLR3	ds RNA	viry
TLR4	LPS Heat-shock proteiny 60,70 manan	G- bakterie hostitel <i>Candida albicans</i>
TLR5	Flagellin	bičikaté bakterie
TLR6	diacyl lipopeptidy	mykobakterie
TLR7	loxoribin ss RNA	syntetická látka RNA viry
TLR8	ss RNA	RNA viry
TLR9	CpG-DNA	bakterie a mykobakterie
TLR10	neurčeno	

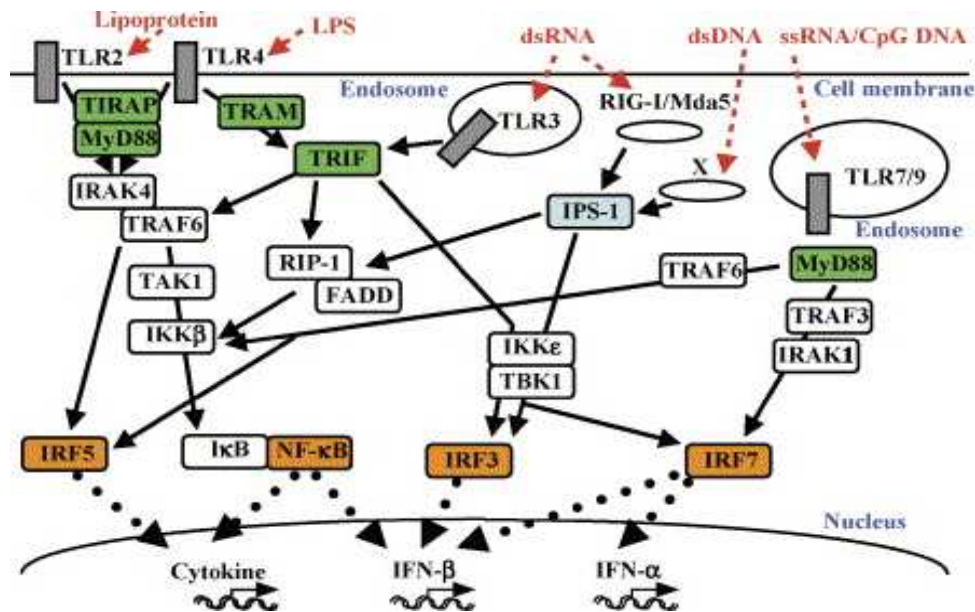
Tabulka 2.3.3.1: Seznam Toll-like receptorů a jejich ligandů (HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ 2009)

TLR signalizace může vést k aktivaci některých transkripčních faktorů, například NF- κ B. Všechny TLR aktivují podobné signalizační dráhy, avšak některé mohou spouštět dráhy přímo pro ně specifické.

Po navázání ligandu na receptor dochází k homo- nebo heterodimerizaci receptorů, ty pak projdou konformačními změnami, které umožní navázání a aktivaci dalších proteinů kaskády, tzv. adaptorových proteinů. Jako první byl identifikován adaptorový protein MyD88. MyD88 se může sdružovat se všemi TLRs kromě TLR3 a je nezbytný k indukci prozánětlivých cytokinů, jako je IL-6 a IL-12. MyD88 obsahuje „mrtvou“ a TIR doménu, která je nezbytná k interakci s TLRs. „Mrtvá“ doména zase přitahuje kinázu asociovanou s receptorem pro IL-1 (IRAK). Jsou známy 4 typy těchto kináz, IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 a IRAK-M. IRAK-4 je nezbytná pro MyD88 dependentní dráhu. Fosforylovaná kináza IRAK váže molekulu TRAF6. Komplex IRAK/TRAF6 je nezbytný v aktivaci TAK1 (TGF- β - activated kinase). Aktivovaný komplex se uvolňuje do cytosolu a kináza TAK1 fosforyluje MAP kinázy (mitogen-activated protein) a IKK komplex. IKK komplex fosforyluje protein I- κ B, což vede k navázání molekuly ubiquitinu a jeho degradaci. Tento řetězec reakcí způsobí, že se uvolní transkripční faktor NF- κ B, který poté v jádru indukuje expresi cílových genů (KAISHO a AKIRA 2006).

Další signalizační cestou je MyD88 independentní dráha. Poprvé byla popsána u myši deficitních v genu pro MyD88, které nebyly schopny produkovat prozánětlivé cytokiny v odpovědi na stimulaci LPS, ale reagovaly aktivací IRF3 (IFN regulatory factor 3), který indukuje expresi interferonů typu I (IFN α a β) (KAWAI *et al.* 2001), jež hrají významnou roli v protivirové imunitě (YAMAMOTO *et al.* 2003).

Jedním z významných rozdílů ve fenotypu pDC a mDC je právě exprese TLRs. Populace mDC exprimuje na svém povrchu TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 a TLR8 a reaguje tak na příslušné mikrobiální ligandy, jako je peptidoglykan nebo LPS. Zatímco pDC exprimují pouze TLR7 a TLR9 a odpovídají na CpG oligonukleotidy (SHORTMAN a LIU 2002).



Obr. 2.3.3.2: Hlavní signalizační dráhy Toll-like receptorů (KAISHO a AKIRA, 2006)

2.3.4 Migrace dendritických buněk

Důležitým atributem dendritických buněk v diferenciaci je jejich mobilita. DC migrují z kostní dřeně do periferních tkání, kde setkání s antigeny následně indukuje jejich migraci do sekundárních lymfatických orgánů. Schopnost migrace DC je řízena pomocí širokého spektra chemokinů a chemokinových receptorů.

Zralé DC exprimují receptor CCR7, čímž získávají citlivost k chemokinům MIP-3 β a SLC (secondary lymphoid-tissue chemokine). Na základě toho mohou přitahovat maturované DC a naivní T lymfocyty a mají tak pravděpodobně vliv na kontakt DC a specifických T buněk (BANCHEREAU *et al.* 2000).

Po setkání s T lymfocyty dostávají DC další maturační signál prostřednictvím molekuly CD40, což vede ke zvýšenému uvolňování chemokinů, jako je IL-8, fraktalkin (CX3CL1) nebo z makrofágů derivovaný chemokin, které přitahují lymfocyty (SALLUSTO a LANZAVECCHIA 1994).

2.3.5 Produkce cytokinů

Dendritické buňky produkují široké spektrum cytokinů, jejichž hladina výrazně narůstá po maturaci DC. Jedná se především o zánětlivé cytokiny IL-1, IL-6 a TNF- α a imunoregulační cytokiny IL-10, IL-12, IL-18 a IFN- α , které ve výsledku určují typ T buněčné odpovědi (DE SAINT-VIS 1998).

Zralé DC mají schopnost produkovat heterodimer IL-12p70, který hraje zásadní roli při diferenciaci Th0 lymfocytů do podtypu Th1 buněk. Ukázalo se, že použití různých maturačních agens má vliv na produkci IL-12p70, čímž je ovlivněn výsledný fenotyp efektorových T lymfocytů.

2.3.6 Zpracování a prezentace antigenu

Zpracování antigenu je proces probíhající uvnitř buňky, při kterém dochází k fragmentaci proteinů na peptidy, které jsou následně asociovány s MHC glykoproteiny I. a II. třídy. Komplex MHC-peptid je následně vystaven na povrchu buňky a předkládán T lymfocytům.

Všechny jaderné buňky jsou vybaveny MHC glykoproteiny I. třídy. Endogenní antigeny jsou degradovány proteasomem a transportovány do endoplasmatického retikula (ER), kde jsou vázány na MHC gp I. třídy a takto jsou na povrchu DC prezentovány CD8+ T lymfocytům.

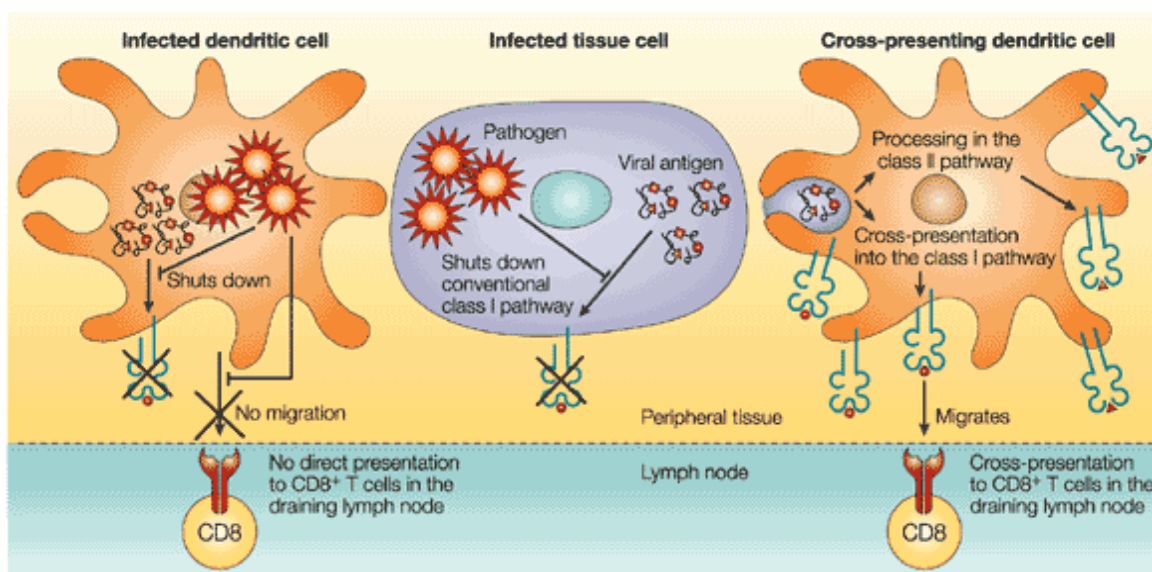
Na rozdíl od MHC gp I. třídy jsou MHC molekuly II. třídy exprimovány pouze na antigen prezentujících buňkách. Endocytózou přijaté exogenní proteiny jsou v endosomech degradovány a následně asociovány s MHC glykoproteiny II. třídy na buněčném povrchu a předkládány CD4+ T lymfocytům.

Dendritické buňky mají ovšem také schopnost tzv. cross-prezentace. To je proces, který umožňuje vazbu exogenních antigenů na MHC glykoproteiny I. třídy a předložení tohoto komplexu CD8+ T lymfocytům, které jsou důležité především v obraně proti virovým a intracelulárním patogenům.

Jsou známy dvě dráhy, kterými je proces cross-prezentace zajišťován. První možností je, že endocytózou pohlcený antigen je transportován z fagosomu do cytosolu, kde je proteasomy hydrolyzován na oligopeptidy, jež jsou poté přeneseny pomocí transportérů do endoplazmatického retikula. V endoplazmatickém retikulu se tyto oligopeptidy váží na MHC gp I. třídy a jsou vystaveny na buněčném povrchu pro CD8+ T buňky.

V druhé dráze je antigen rozštěpán na peptidy endosomálními proteázami, jako je katepsin S. Vzniklé peptidy jsou vázány na MHC molekuly I. třídy přímo v endosomálním kompartmentu (ROCK a SHEN 2005).

V závislosti na povaze antigenu, mohou mít obě tyto dráhy, ať už současně, nebo jednotlivě, podíl na cross-prezentaci *in vivo*.



Nature Reviews | Immunology

Obr. 2.3.6: Cross- prezentace pomocí DC

Některé viry mohou způsobit inhibici prezentace pomocí MHC gp I. třídy nebo třeba blokovat migraci DC. Na tomto obrázku infikování dendritické buňky virem brání stimulaci cytotoxických lymfocytů přímo přes molekulu MHC I. třídy. Nicméně cross-prezentace antigenu derivovaného z infikovaných buněk neinfikovanou DC má za následek vyvolání cytotoxické odpovědi navzdory inhibičním mechanismům. (HEATH a CARBONE 2001)

2.3.7 Imunoregulační funkce dendritických buněk

Dendritické buňky jsou v současnosti považovány za nejvýznamnější buňky regulující imunitní odpověď. Stojí na počátku každé imunitní reakce vedoucí k rozvoji imunitní odpovědi aktivací nespecifické a posléze specifické větve imunity. Jsou také v centru neustále probíhajících imunitních reakcí, které zajišťují toleranci neškodných podnětů a integritu organismu (SEDIVA 2006). Přestože jsou mediátory imunity T a B lymfocyty, jejich funkce je pod kontrolou dendritických buněk (BANCHEREAU a STEINMAN 1998).

2.3.7.1 Aktivace pomocných T lymfocytů

Pouze zralé dendritické buňky jsou schopny indukovat specifickou T buněčnou odpověď. Aby došlo k interakci DC – T lymfocyt, je zapotřebí kontakt mezi TCR receptorem na T buňce a komplexem MHC-peptid na DC. T lymfocyt je však plně aktivován pouze tehdy, dostane-li i druhý signál, zprostředkovaný prostřednictvím

interakce molekuly CD28 na T lymfocytu a kostimulační molekuly na povrchu dendritické buňky, především CD86 (HEATH a CARBONE 2001).

T buňky a jejich výsledná aktivace jsou ovlivněny řadou faktorů jako je například hustota komplexů MHC-peptid na povrchu DC (množství antigenu), exprese kostimulačních molekul, produkce cytokinů dendritickou buňkou, nebo schopnost dendritických buněk odolávat apoptotickým signálům.

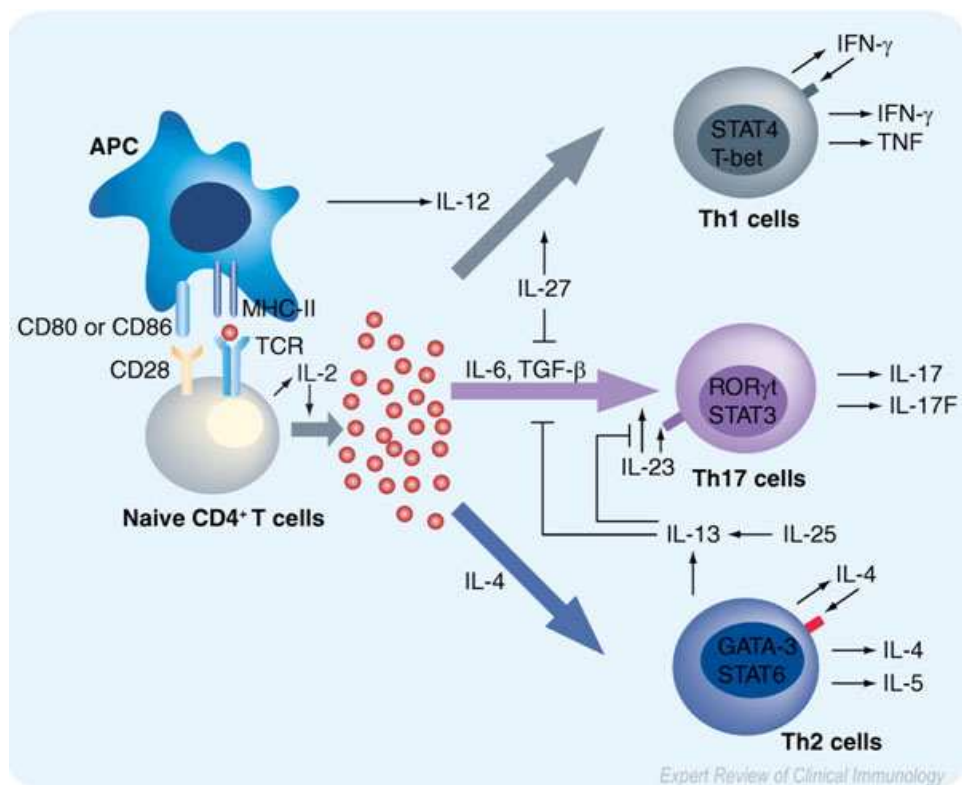
Největší vliv na polarizaci T buněčné odpovědi směrem k Th1, Th2 nebo Th17 má cytokinové prostředí. Pokud dendritické buňky produkují IL-12 a pokud proběhly signály zprostředkované TCR a CD28, dojde k vývoji buněčné odpovědi směrem k Th1. Th1 lymfocyty jsou producenty IFN- γ , který má zásadní vliv na aktivaci makrofágů a dále produkují IL-2, což je pro T buňky důležitý růstový faktor (HOREJSI a BARTUNKOVA 2009).

Jestliže naivní CD4⁺ T lymfocyt obdrží signál od DC přes TCR, CD28 a receptory pro IL-4, diferencuje se v Th2 podtyp. Th2 buňky se na rozdíl od Th1 buněk, které zprostředkovávají buněčnou imunitu, podílejí na humorální imunitě. Th2 lymfocyty interagují s B lymfocyty, jež se diferencují v plasmatické buňky se schopností produkovat velké množství protilátek.

Diferenciace Th17 buněk se děje prostřednictvím cytokinů TGF- β s IL-6 a transkripčních faktorů STAT3 a ROR γ . Je pro ně typická produkce IL-17, IL-17F, IL-22 a IL-21 a přestože funkce tohoto podtypu není ještě zcela objasněna, současná data přisuzují jejich význam v obraně proti extracelulárním patogenům (BETTELLI et al. 2007).

2.3.7.2 Role DC v aktivaci CD8⁺ T buněk

Dendritické buňky mají jedinečnou schopnost zkřížené prezentace (tzv. cross-prezentace), při které jsou exogenní antigeny prezentovány v asociaci s MHC glykoproteiny I. třídy a tento komplex je rozeznáván CD8⁺ T lymfocyty (ACKERMAN a CRESSWELL 2004). Předpokládá se, že k aktivaci CD8⁺ cytotoxických T lymfocytů (CTLs) je zpravidla vyžadována účast CD4⁺ T lymfocytů. K úspěšné aktivaci CTLs přispívá například interakce molekuly CD40 exprimované na APC a jejího ligandu CD40L na povrchu aktivovaných CD4⁺ T buněk (SCHOENBERGER et al. 1998).



Obr. 2.3.7.1: Diferenciace pomocných T lymfocytů

Naivní CD4+ T buňky jsou aktivovány pomocí APC. Působením cytokinů se T lymfocyty diferencují do tří typů efektorových CD4+ buněk (Th1, Th2 a Th17 buněk). (FORSTHUBER a JI 2007)

2.4 Protinádorová imunita

Nádorové bujení je jednou ze tří nejčastějších příčin úmrtí člověka. Za určitých okolností a v důsledku selhání rozmanitých mechanismů regulace buněčného dělení a regulace „sociálního chování“ buněk, může dojít k maligní transformaci buněk. Tyto poruchy jsou většinou způsobené mutacemi v tzv. onkogenech nebo antioonkogenech. Tyto geny za normálních okolností kódují signalizační proteiny, transkripční faktory nebo proteiny regulující buněčnou adhezivitu či apoptózu. Ve výsledku dochází k neregulovanému, abnormálnímu dělení buněk, při kterém postižené buňky postupně ztrácejí svoji původní morfologii a stále intenzivněji se dělí (KREJSEK a KOPECKY 2004; HOREJSI a BARTUNKOVA 2009)).

Nádorové buňky se od normálních buněk liší, tudíž by je imunitní systém měl rozpoznat a zneškodnit. Nádorové buňky však využívají široké spektrum mechanismů, které jim umožní se imunitnímu dohledu vyhnout. Mezi faktory podílející se na úniku nádorové buňky imunitnímu systému patří:

- Variabilita nádorových buněk
- Nízká exprese nádorových antigenů
- Produkce faktorů inaktivujících T lymfocyty nebo jiné blokuující faktory (např. TGF- β , IL-10)
- Mutace v genech, které kódují bílkoviny důležité pro prezentaci antigenů v APC – tyto mutace vedou ke vzniku rezistence k CD8 T lymfocytům
- Expese FasL na nádorových buňkách, díky němuž dochází u protinádorových T lymfocytů k indukci apoptózy
- Produkce faktorů, jež inhibují funkce nebo životnost dendritických buněk (HOREJSI a BARTUNKOVA 2009; FUCIKOVA *et al.* 2008)

Aby mohla být imunitní odpověď proti nádorům zahájena, je potřeba, aby specifická, buněčně zprostředkovaná imunita, byla podpořena imunitou přirozenou. Nezbytná je přítomnost nádorových antigenů v lymfatických orgánech a jejich účinná prezentace zralými dendritickými buňkami. Antigen musí být prezentován v optimálním množství a po dobu, která je dostatečná k aktivaci lymfocytů. Příliš krátký kontakt mezi dendritickou buňkou a T lymfocylem nebo nedostatečné množství antigenu nevede k zahájení imunitní reakce.

2.5 Ovariální karcinom

Ovariální karcinom je diagnostikován u více než 190 000 nových pacientek každý rok. Patří mezi gynekologické nádory s nejvyšší mortalitou a Česká republika spolu s Baltskými státy patří k zemím s nejvyšší incidencí tohoto onemocnění (International Agency for Research on Cancer). Podle epidemiologických studií je jedním z rizikových faktorů pro rozvoj karcinomu ovaria dědičnost. Mezi genetické dědičné faktory, jimž se přisuzuje největší význam, jsou mutace v genech BRCA1 a BRCA2. Incidence ovariálního karcinomu je převážně u bílých žen a zvyšuje se po menopauze a v pokročilém věku (> 55 let).

Karcinom ovaria je kategorizován na základě buněk, ze kterých vzniká. Asi 5-10 % nádorů pochází z embryonálních buněk. Tyto nádory jsou typické u dívek a mladých žen. 10-15 % pochází ze stromálních buněk, avšak většina (>80 %) ovariálních karcinomů jsou epiteliálního původu (WILLIAMS *et al.* 2007). Epiteliální vrstva ovárií nemá zvláštní rysy nebo významnější funkce, a proto nejsou prvotní buněčné a molekulární změny detekovány (SINGH *et al.* 2008). Špatná prognóza je tedy dána především absencí závažnějších symptomů v raných stádiích onemocnění (WILLIAMS *et al.* 2007). Vzhledem k nedostatku vysoce senzitivních a specifických biomarkerů a faktu, že se onemocnění šíří velice rychle, téměř 70% pacientek s diagnostikovaným karcinomem ovaria trpí již pokročilým stádiem onemocnění (ROSENTHAL a JACOBS 1998). Podle rozsahu metastáz se ovariální nádory dělí do čtyř vývojových stádií (I-IV), přičemž většina ovariálních nádorů je diagnostikována až ve stádiu III nebo dokonce IV, kdy už jsou metastázy v peritoneu a malé pánvi (SINGH *et al.* 2008).

Standardní léčbou pro pacientky s karcinomem ovaria je operace s následnou chemoterapií založenou na kombinaci platiny a taxanu (BOOKMAN 2005), což vede k významné redukci maligních buněk. Často však v těle pacientky zůstane malá část nádorových buněk rezistentních k použité chemoterapii (nazýváno také jako minimální reziduální nemoc) a většina pacientek tak během 2-5 let prodělá relaps onemocnění, který bývá fatální (OZOLS *et al.* 2003; DU BOIS *et al.* 2003). U každé pacientky je progres onemocnění ovlivněn řadou faktorů, jako je věk, celkový zdravotní stav nebo stádium nemoci.

Současné studie ukazují, že nádory s hustou infiltrací CD3+ CD8+ T buněk jsou asociovány s příznivými klinickými výsledky, což naznačuje, že pacientův imunitní

system může hrát důležitou roli v prevenci relapsu nádoru po prodělané standardní léčbě (ZHANG *et al.* 2003, RASPOLINI *et al.* 2005). Nicméně, ne vždy lymfocyty infiltrující nádory (TILs; tumour infiltrating lymphocytes) zlepšují klinický stav. Selhání protinádorové imunity asociované se špatnou prognózou onemocnění může být vyvolána přílišnou supresí lymfocytů reagujících na antigeny asociované s nádory (tumor-associated antigens, TAAs), která je zprostředkována $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulačními T buňkami (Treg). Omezení funkce regulačních T lymfocytů tak může u pacientek přispět k lepší prognóze onemocnění (CURIEL *et al.* 2004).

Antigeny, které jsou rozpoznávány TILs, se nevyskytují výhradně na nádorových buňkách, ale mohou být exprimovány i na normálních buňkách. Nejlépe prostudovaným TAA je onkogen Her-2/neu. Zvýšená exprese Her-2/neu se udává v rozmezí 8 – 66 % případů pacientek s karcinomem ovaria (TUEFFERD *et al.* 2007). Dalším příkladem je FBP (folate-binding protein), jenž je exprimován u více než 90 % ovariálních karcinomů a většiny ostatních epiteliálních nádorů (PEOPLES *et al.* 1995). U velké části pacientek s karcinomem ovaria je také exprimován antigen NY-ESO-1 (QIAN *et al.* 2004) a CA 125 (mucin MUC16), jehož sérová koncentrace je zvýšena u více než 80 % pacientek v pokročilém stádiu epiteliálního ovariálního karcinomu. CA 125 se také běžně stanovuje při diagnostice onemocnění (SINGH *et al.* 2008).

2.6 Protinádorová imunoterapie

Pod pojmem imunoterapie rozumíme léčebné postupy podporující nebo využívající obranné mechanismy imunity k působení proti nádoru. Při pasivní imunoterapii jsou do organismu dodávány již hotové protilátky nebo aktivované leukocyty (efektory imunity), při aktivní imunoterapii jsou podávány různě upravené antigenní produkty nádoru za účelem vyvolat specifickou protinádorovou odpověď.

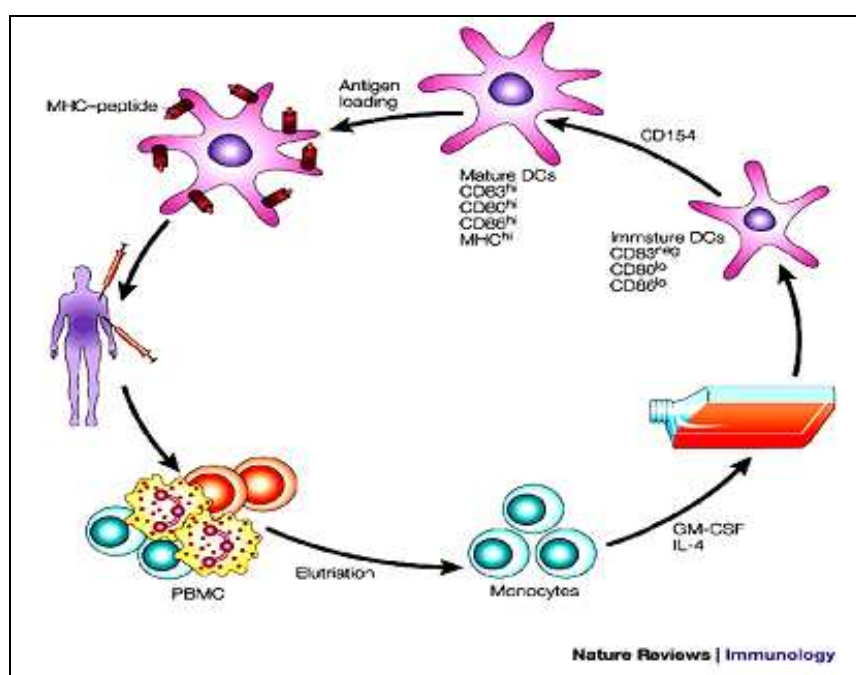
Protinádorová terapie se v posledních letech dostala do centra zájmu díky několika zásadním objevům, které pomohly porozumět mechanismům kontrolujícím aktivaci imunitního systému a také díky pokroku v laboratorních technologiích, jenž umožňuje manipulaci s buňkami imunitního systému *in vitro*.

Pro účinnou aktivaci protinádorové imunity musí být specifickým T lymfocytům antigen předložen v lymfatických uzlinách profesionálními antigen prezentujícími

buňkami. Podle současných poznatků jsou nejúčinnějšími APC dendritické buňky (BREMERS a PARMIANI 2000).

Po objevení jevu, že DC mají jedinečnou schopnost antigenní prezentace a aktivace naivních T lymfocytů, se uskutečnilo velké množství terapeutických vakcinačních experimentů. Pacienti s nádorovým onemocněním se aktivně imunizují vlastními DC, které jsou napulsované nádorovými antigeny. Po přidání vhodného maturačního činidla pak zralé pulsované DC v organismu aktivují naivní lymfocyty, ze kterých se stanou specifické lymfocyty zabíjející nádorové buňky (viz. obr. 2.6).

Jako vhodný zdroj pro přípravu DC *in vitro* se ukázaly být monocyty izolované z periferní krve (ROMANI *et al* 1994). Po pěti dnech v přítomnosti cytokinů GM-CSF a IL-4 se monocyty diferencují v nezralé dendritické buňky. Důležitým aspektem pro přípravu účinných protinádorových vakcín je zdroj nádorových antigenů (podrobněji bude popsáno v kapitole 2.6.4).



Obr. 2.6: Schéma nádorové imunoterapie dendritickými buňkami. *Imunoterapie pomocí dendritických buněk: Z krve pacienta se izolují monocyty, v kultuře se z nich vypěstují nezralé dendritické buňky, ty se „nakrmí“ příslušným „slabým“ antigenem (např. nádorovým nebo virovým), jsou maturovány a vrátí se zpět do pacientova organismu, kde účinně stimulují vznik antigeně specifických efektorových T lymfocytů. (BERZOFSKY et al. 2001)*

2.6.1 Využití dendritických buněk v imunoterapii malignit

Protinádorová imunoterapie využívající DC je slibným terapeutickým přístupem u pacientů v pokročilých stádiích onemocnění, u kterých selhala známá kombinace standardní léčby, chirurgie a chemoterapie. Chemoterapie navíc kvůli nedostatečné selektivitě ničí i zdravé buňky a tkáně a způsobuje tak množství nežádoucích účinků.

Imunoterapie pomocí DC představuje alternativní cestu v protinádorové léčbě u pacientů, u kterých je vysoká pravděpodobnost relapsu a nebo kteří nereagují na klasické léčebné metody. Cílem imunoterapie u pacientů s pokročilým stupněm onemocnění není úplná likvidace nádorových buněk, ale spíše obnova dynamické rovnováhy mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem. Vhodnou kombinací k indukci protinádorové imunitní odpovědi se zdá být operace a/nebo chemoterapie a neutralizace nádory indukované imunosuprese (ROZKOVA *et al.* 2009).

Ve studii, jež publikoval Hsu a kol. byli čtyři pacienti s non-Hodgkinským lymfomem léčeni injekcemi obsahující DC kultivované s idiotypovým proteinem odvozeným z nádoru. U všech čtyřech pacientů došlo k rozvoji protinádorové buněčné imunitní odpovědi (HSU *et al.* 1996). V dalším experimentu byly pacientům s melanomem podávány injekce dendritických buněk pulsovaných koktejlem peptidů (MelanA/MART-1, tyrosinasa, MAGE-1 nebo MAGE-3), přičemž všechny tyto peptidy jsou exprimovány na melanomových buňkách a jsou známy jako antigeny, proti kterým jsou namířeny CTLs. U jedenácti z šestnácti pacientů se rozvinula peptid-specifická reakce oddáleného typu a regrese nádoru byla pozorována u pěti z šestnácti pacientů (NESTLE *et al.* 1998). Kugler a kol. ve svých pokusech u pacientů s metastatickým renálním karcinomem využili k léčbě hybridní DC-renální nádorové vakcíny. Čtyři pacienti vykazovali kompletní remisi metastatických lézí a u dvou pacientů došlo k redukci nádorové masy o alespoň 50% (KUGLER *et al.* 2000).

Tyto a mnohé jiné studie nepopíratelně poskytují důkaz, že díky imunoterapii pomocí DC jsme v současné době schopni dosáhnout kvalitních výsledků v obraně proti různým typům nádorových onemocnění.

2.6.2 Imunoterapie ovariálního karcinomu dendritickými buňkami

Karcinom ovaria stále patří mezi onemocnění s nejvyšší mortalitou mezi gynekologickými nádory. U většiny pacientek dojde k návratu onemocnění a přežití více

jak pět let se udává pouze ve 23-30 % případů. Až u tří čtvrtin pacientek je onemocnění diagnostikováno již v pokročilém stádiu, což je jeden z důvodů, proč je úmrtnost pacientek tak vysoká. Je tedy potřeba vyvíjet nové terapeutické postupy, které by vedly k lepší prognóze onemocnění (CANNON a O'BRIEN 2009). Dnes jsou známy terapeutické přístupy pro léčbu ovariálního karcinomu, zahrnující například imunoterapii založenou na protilátkách či cytokinech, jako je IFN- γ nebo IL-2. Jinými variantami jsou vakcinace pomocí peptidů, heat shock proteinů nebo dendritických buněk (LIU *et al.* 2010).

Jeden z možných způsobů imunoterapie karcinomu ovaria pomocí DC popsal Santin a kol., jenž používal DC pulsované peptidy derivované z autologních ovariálních nádorových buněk. Takto pulsované DC poté indukovaly specifické CD8+ cytotoxické T lymfocyty, které zabíjely autologní nádorové buňky pacientek v pokročilém stádiu ovariálního karcinomu (SANTIN *et al.* 2000). V jiném experimentu byly použity autologní T lymfocyty, které byly kultivovány jednak s nádorovými buňkami fúzovanými s alogenními DC a jednak s nádorovými buňkami fúzovanými s autologními DC. Nádorové buňky fúzané s alogenními DC vykazovaly vyšší proliferační aktivitu, nicméně cytolytická aktivita byla v obou případech srovnatelná (GONG *et al.* 2000). Také vakcinace pacientek s pokročilým karcinomem ovaria založená na DC pulsovaných peptidy (HER-2/neu a MUC1) vedla v pěti z deseti případů k indukci peptid-specifické cytolytické aktivity (BROSSART 2002).

V roce 2006 Tobiášová a kol. publikovali studii, která byla zaměřena na vývoj vakcín, jež byly šité na míru pacientkám s karcinomem ovaria. Princip imunoterapie byl založen na DC pulsovaných autologními apoptotickými nádorovými buňkami. Nádorové buňky získávali izolací z ascitu a solidního tumoru pacientek a apoptózu indukovali vystavením buněk UV záření. Dendritické buňky připravovali z monocytů v periferní krvi, které pulsovali mrtvými nádorovými buňkami a následně takto stimulované DC aktivovali maturačním činidlem polyI:C (polyinosinová polycytosinová kyselina). Ve svých pokusech prokázali, že takto připravené a manipulované DC jsou schopny účinně stimulovat autologní lymfocyty a indukovat produkci IFN- γ v *in vitro* podmínkách (TOBIASOVA *et al.* 2006). Téhož roku Chiang a kol. využili k aktivaci nádorově specifických cytotoxických lymfocytů dendritické buňky pulsované nádorovými ovariálními buňkami. U nádorových buněk indukoval pomocí kyseliny chlorné nekrózu,

kteřá po jejich pohlcení vyvolala částečnou maturaci DC. Tyto DC pak byly kokultivovány s autologními T lymfocyty a následně byla prokázána cytolytická aktivita proti nádorovým buňkám (CHIANG *et al.* 2006). O rok později Hernando a kol. provedl experiment u pacientky s metastatickým karcinomem ovaria. Ve čtyřtýdenních intervalech jí bylo podáváno 10 vakcín autologních DC pulsovaných mRNA kódující folate receptor- α (FR- α). Pět měsíců po poslední vakcinaci došlo k částečné imunitní odpovědi a po šestnácti měsících byla zaznamenána remise až 50 % metastáz v lymfatických uzlinách. Mimoto hladina CA-125 byla výrazně snížena již po podání první vakcíny (HERNANDO *et al.* 2007).

Všechny výše uvedené typy vakcín založené na principu podání DC pulsovaných různými typy antigenů byly pacientkami dobře snášeny, bez zjištěných vedlejších účinků.

2.6.3 Vliv maturačního stavu DC na účinnost vakcín

Maturační stav dendritických buněk je rozhodujícím faktorem pro efektivní antigenní prezentaci a iniciaci primární imunitní odpovědi. Ukázalo se, že různé typy maturačních stimulů determinují různý stupeň diferenciaci a tudíž i výslednou imunitní reakci (MUNZ *et al.* 2005). Nezralé dendritické buňky nemají dostatečně vysokou expresi kostimulačních molekul, a proto nejsou schopny poskytnout naivním T lymfocytům druhý signál, který je nutný k aktivaci T buněk. Tento funkční útlum se označuje jako anergie (viz. obr. 2.6.3).

Dříve se k vyvolání maturace DC využívala směs prozánětlivých cytokinů IL-1 β , TNF a IL-6, s přídavkem PGE₂ (JONULEIT *et al.* 1997). Později se však prokázalo, že nejúčinnějšími aktivátory DC jsou některé specifické struktury patogenů. Po jejich rozpoznání Toll-like receptory, dochází velmi rychle k plnohodnotné aktivaci dendritické buňky a k indukci imunitní odpovědi, která vede k eliminaci patogenu. Mnoho z mikrobiálních ligandů TLRs má velmi podobné účinky na buňky prezentující antigen, zpravidla charakterizované indukcí prozánětlivých cytokinů a IL-12 (EDWARDS *et al.* 2002). Maturované DC produkují vysoké hladiny polarizačních cytokinů T buněk, převážně IL-12, který zásadně ovlivňuje vývoj imunitní odpovědi směrem k CD4⁺ Th1 a CD8⁺ CTL (CANNON *et al.* 2002).

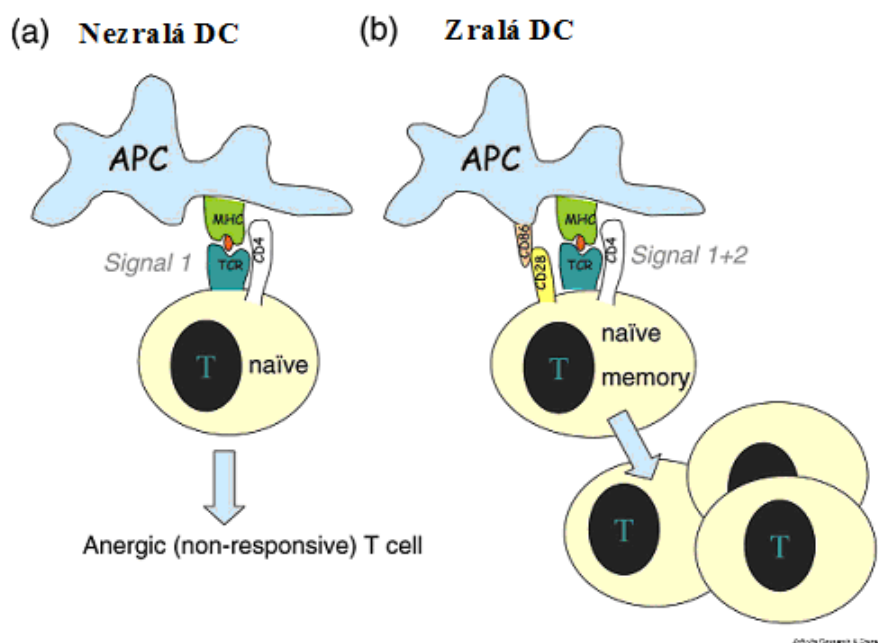
Dendritické buňky po stimulaci silným maturačním signálem produkují jednorázově velké množství cytokinů včetně IL-12p70. Pokud jim je ale po odeznění tohoto signálu podáno další maturační agens, DC již nejsou schopny IL-12p70

produkovat. Dojde-li v tomto stádiu k interakci s T lymfocytom, DC není schopna indukovat účinnou imunitní odpověď (SPISEK *et al.* 2003).

Spisek a kol. ve svých pokusech testovali vliv TNF- α v kombinaci s polyI:C na maturační stav DC a produkci IL-12. Zjistili, že 48 h po stimulaci těmito maturačními stimuly DC vykazovaly nejvyšší expresi kostimulačních molekul a produkce IL-12 dosáhla nejvyšších hodnot již po 24 h (SPISEK *et al.* 2003).

Rouas a kol. roku 2004 zkoušeli různé maturační stimuly a zjišťovali jejich vliv na fenotyp DC a produkci IL-12. Porovnávali solubilní CD40L v kombinaci s IFN- γ , polyI:C, LPS a koktejl cytokinů (IL-1 β , TNF- α a IL-6) s PGE₂. Jejich data ukázala, že pro klinické studie se jako nejvhodnější maturační agens jeví polyI:C (ROUAS *et al.* 2004).

Při vývoji vakcín je třeba dbát na to, aby bylo zvoleno co nejefektivnější maturační agens. Některé ligandy TLRs mají sice vysoké stimulační účinky, avšak právě pro tento fakt, nejsou pro imunitní systém vhodný. Protože některé silné maturační stimuly, například LPS, indukují vysokou, ale pouze dočasnou produkci cytokinu IL-12p70, zralé DC nejsou schopny po odeznění této „jednorázové“ produkce opět produkovat tento cytokin. Z čehož vyplývá, že takto maturované DC nejsou vhodné k indukci Th1 a CTL protinádorové odpovědi (MCILROY a GREGOIRE 2003).



Obr. 2.6.3: Vliv stádia DC na vznik imunitní reakce

a) receptor T buněk (TCR) – peptid – MHC interakce (signál 1) a b) kostimulační signál (signál 2) nutný pro úplnou aktivaci. Pokud není kostimulační signál, dojde k anergii. (MALMSTROM *et al.*, 2005)

2.6.4 Způsoby pulsace a zdroje nádorových antigenů

Způsob pulsace a zdroj nádorových antigenů je jedním z rozhodujících faktorů, které mají vliv na vývoj protinádorových vakcín.

Jednou z možností jsou dendritické buňky pulsované konkrétními peptidy, jež pocházejí z popsaných nádorových antigenů a které se váží na MHC gp I. třídy. Toto řešení je relativně jednoduché, není potřeba získávat nádorové buňky od pacienta a imunitní odpověď je dobře sledovatelná. Na druhou stranu nevýhodou při pulsaci peptidy je, že konkrétní jednotlivé peptidy lze použít jen u pacientů s příslušnou molekulou HLA a protinádorová odpověď je omezená na tento určitý peptid (GROH 2005).

Zdrojem antigenu může být i celý rekombinantní protein. Ve studii, kterou publikovali v roce 2004 Barrou a kol. použili k pulsaci DC lidský rekombinantní prostatický antigen PSA (Dendritophage-rPSA). Imunitní odpověď specifická pro PSA byla detekována jen u některých pacientů (BARROU *et al.* 2004).

Na myších pokusech Fields a kol. prokázali, že také DC pulsované nádorovým lyzátem jsou schopny indukovat proliferaci specifických protinádorových T lymfocytů (FIELDS *et al.* 1998).

Další možností je transfekce RNA, kterou lze přímo izolovat z nádorů, do DC. Schopnost amplifikovat RNA i z velmi malého množství nádorové tkáně umožňuje použití transfekovaných DC k vakcinaci prakticky u všech pacientů s nádorovým onemocněním (GILBOA a VIEWEG 2004).

V neposlední řadě lze jako zdroj nádorových antigenů použít celé apoptotické nádorové buňky. DC tak prezentují lymfocytům širokou škálu nádorových epitopů, čímž zabezpečují polyklonální odpověď imunitního systému (SPISEK *et al.* 2010).

2.6.5 Vliv apoptotických buněk na imunitní odpověď

V živých buňkách je fosfatidylserin (PS) umístěn pouze v buněčné membráně na vnitřní cytoplasmatické straně lipido-proteinové dvojvrstvy. Při apoptóze však dochází záhy k translokaci PS na vnější stranu membrány. Tato membránová modifikace umožňuje rychlé rozpoznání apoptotických buněk a jejich pohlcení fagocytyujícími buňkami (MUNOZ *et al.* 2007).

Dendritické buňky pulsované apoptotickými nádorovými buňkami se dnes běžně používají při vývoji protokolů pro imunoterapii nádorů. Využití mrtvých nádorových buněk však může vyvolat nejen imunitní odpověď, ale také toleranci, což činí účinek vakcinace nepředvídatelným (SHURIN 2009).

Původní studie udávají, že DC, které fagocytují apoptotické buňky jsou schopny účinné zkřížené prezentace antigenu cytotoxickým lymfocytům (ALBERT *et al.* 1998). Jiné studie naopak prezentují, že pohlcení nekrotických buněk umožňuje indukci maturace DC, zatímco pohlcení apoptotických buněk neposkytuje dostatečný impuls k aktivaci DC a tím vyvolání příslušné imunitní odpovědi (SAUTER *et al.* 2000). Podle Basu a kol. se proteiny tepelného šoku (HSPs, heat shock proteins), které hrají roli v indukcii maturace dendritických buněk, uvolňují pouze z nekrotických a nikoliv apoptotických buněk (BASU *et al.* 2000). Feng a kol. v roce 2001 však publikovali, že HSPs exprimují i apoptotické buňky (FENG *et al.* 2001).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.6, dendritické buňky dokáží díky zkřížené prezentaci prezentovat T lymfocytům exogenní antigeny v komplexu s MHC gp I. třídy, což je činí hlavními aktéry v buněčně zprostředkované imunitě. V roce 2000 Ferlazzo a kol. prokázali na pokusech s B buněčnou linií transformovanou virem Epstein-Barr (B-EBV lymfoblastoidní buněčná linie, LCL), že je možné použít apoptotické buňky jako vhodný zdroj antigenů pro dendritickými buňkami zprostředkovanou prezentaci CD8⁺ prekurzorům CTLs. Dále ukázali, že produkce IFN- γ je indukována pouze po restimulaci autologní LCL. Zajímavé je, že použití solubilního antigenu derivovaného ze stejné LCL nevyvolalo indukci CD8⁺ specifické odpovědi. Je možné, že apoptotické buňky mají větší vliv na zkříženou prezentaci, pravděpodobně v důsledku specifických povrchových markerů nebo dosud zatím neobjasněných faktorů, což je činí efektivnějšími v indukcii CD8⁺ specifické odpovědi (FERLAZZO *et al.* 2000).

Fagocytóza apoptotických buněk makrofágy vyvolává účinnou protizánětlivou odpověď skrze produkci TGF- β 1 a dalších protizánětlivých molekul a snižuje následné uvolňování prozánětlivých cytokinů. Vzhledem k vývojové příbuznosti makrofágů a myeloidních DC by se dalo předpokládat, že by pohlcení apoptotických buněk dendritickými buňkami mohlo mít podobné efektorové funkce.

Ve studii, kterou publikovali v roce 2001 Stuart a kol. se udává, že endotoxinem indukovaná produkce IL-12 je snížena u dendritických buněk, které pohltily apoptotické

buňky. Navíc je u těchto DC inhibována exprese kostimulační molekuly CD86. DC pulsované apoptotickými buňkami mají v důsledku těchto změn sníženou schopnost stimulovat proliferaci T lymfocytů. Autoři uvádějí nepatrný rozdíl v povrchové expresi kostimulačních molekul CD40, CD80 a CD86 u nezralých dendritických buněk, které pohltily apoptotické buňky a DC bez apoptotických buněk, což potvrdilo fakt, že pulsace neaktivuje DC. Oproti tomu, pokud byly dendritické buňky maturovány LPS, byl zaznamenán výrazný rozdíl v povrchové expresi CD86 mezi DC pulsovanými apoptotickými buňkami a nepulsovanými. Je tedy zřejmé, že DC s nízkou expresí kostimulačních molekul nejsou schopny doručit T lymfocytům druhý signál a indukují tak u nich anergii nebo delecii, zatímco zralé DC, které exprimují vysoké hladiny kostimulačních molekul a jež jsou schopné produkovat stimulační cytokin IL-12, vyvolávají adaptivní imunitu. Předpokládá se tedy úzký vztah mezi fenotypickými změnami DC a stimulací T buněk (STUART *et al.* 2002). Data publikovaná v roce 2008 Renem a kol. tyto výsledky potvrzují. Zjistili také, že dendritické buňky pulsované apoptotickými buňkami produkují nižší hladiny prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- α , IL-1 α a IL-12 a zároveň vyšší hodnoty IL-10 oproti samotným DC. Z uvedených výsledků tak vyplývá, že pulsace apoptotickými buňkami výrazně ovlivňuje funkční a fenotypické změny DC. Dále zjišťovali jakou měrou ovlivňují apoptotické buňky *in vitro* T buněčnou odpověď. Překvapivě (v porovnání s pokusy *ex vivo*) nebyly zaznamenány větší rozdíly v účinnosti pulsovaných a samotných DC stimulovat proliferaci T lymfocytů. V produkci IL-2 nebyly vidět signifikantní rozdíly, zatímco produkce IFN- γ byla u pulsovaných DC výrazně nižší než u samotných DC (REN *et al.* 2008).

Jiné publikace jsou však v rozporu s těmito výsledky. Například v roce 2003 Goldszmid a kol. na pokusech s DC pulsovanými apoptotickými melanomovými buňkami ukázali, že pochlčení apoptotických buněk, v porovnání se samotnými DC, neinhibuje expresi kostimulační molekuly CD86 ani MHC gp II. třídy (GOLDSZMID *et al.* 2003).

Není tedy jednoznačně jasné, zda apoptotické buňky pohlcené dendritickými buňkami výrazněji ovlivňují výsledný maturační stav DC. Otázkou tedy zůstává, zda tento efekt nemůže negativně ovlivnit výsledek imunoterapie takto pulsovanými DC a jaké maturační agens současně s pulsací použít tak, aby dostatečně aktivovalo DC pro účinnou prezentaci antigenu naivním T lymfocytům.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Vzorky

Pro náš projekt jsme používali dendritické buňky derivované z monocytů (MoDC), jejichž zdrojem byly tzv. buffy coaty od zdravých anonymních dárců. Buffy coat je frakce nesrážlivé krve po centrifugaci, která obsahuje převážně leukocyty a trombocyty. Tyto buffy coaty nám poskytl Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze (ÚHKKT). Veškeré práce s buňkami byly prováděny ve sterilních rukavicích a v laminárním boxu tak, aby se zabránilo kontaminaci vzorku.

3.2 Materiál

Chemikálie

- DMSO (Fluka)
- Ethanol 96% (MERCK KGaA)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB)

Připravované roztoky

- Barvicí roztok pro průtokovou cytometrii
50 µl/vzorek (PBS pH 7,2 + 2 % FBS + ředěná protilátka)
- Kompletní médium
RPMI 1640, 10 % FBS, 5 % L-glutamin, 5 % streptomycin + penicilin
- Zamrazovací médium
70 % kompletní médium + 20 % FBS + 10 % DMSO

Dodávané roztoky

- Brefeldin (eBioscience)
- DAPI (Invitrogen)
- Diluent C (SIGMA)
- FBS (BIOCHROM AG)

- Fixační pufr (eBioscience)
- Glutamin (Lonza)
- PBS pH 7,2 (Lékárna FN Motol)
- PBS s 2 mmol/l EDTA (Lékárna FN Motol)
- Penicilin (Lonza)
- Permeabilizační pufr (eBioscience)
- RPMI 1640 (Lonza)
- Streptomycin (Lonza)

Enzymy

- Trypsin EDTA (Lonza)

Komerční sady

- Apoptosis Assay Kit – FITC (Exbio)
- *In Situ* Apoptosis Detection Kit (TREVIGEN)
- MILLIPLEX® Map Kit (Millipore)

Použité monoklonální protilátky

- Anti IFN- γ APC (BD)
- CD3 PC7 (eBioscience)
- CD8 FITC (Exbio)
- CD11c APC (Exbio)
- CD14 PE-Dy590 (Exbio)
- CD80 FITC (Immunotech)
- CD83 PE (Immunotech)
- CD86 PE-Cy5 (BD)
- HLA-A2 Alexa 647 (Serotec)
- HLA-DR PC7 (BD)

Použitá maturační činidla

- Ionomycin (Calbiochem)
- LPS (SIGMA)
- PMA (SIGMA)

- Poly I:C 1 (Invivogen)
- Poly I:C 2 (SIGMA)

Cytokiny

- GM-CSF (Gentaur)
- IL-2 (PEPROTECH)
- IL-4 (Gentaur)

Použité barvy

- PKH26 (SIGMA)
- PKH67 (SIGMA)
- Trypan blue Stain (BioWhittaker)
- Vybrant DiI (Invitrogen)
- Vybrant DiO (Invitrogen)

Ostatní materiál

- Kultivační destičky (NUNC)
- Kultivační lahvičky 25 cm² (NUNC)
- Kultivační lahvičky 75 cm² (TPP)

Přístrojové vybavení

- Inkubátor CO₂ (Jouan)
- Konfokální mikroskop FV300 (OLYMPUS)
- Laminární box (Jouan)
- Luminex® 100TM Instrument (Luminex)
- Počítač buněk (Beckman Coulter)
- Průtokový cytometr BD FACS Aria (BD Biosciences)
- Stolní centrifuga (Jouan, Hettich)
- Světelný mikroskop CKX41 (OLYMPUS)
- UV translaminátor (ULTRA-LUM)
- Vakuový odsávač (NOSHOK)
- Vodní lázeň (MEMMERT)

Software

- BD FACSDiva Software (BD)
- FlowJo 8.5.2 (BD)
- GraphPad Prism 4.03 (Trial)
- Luminex 1.7 Software (Luminex)

3.3 Metody

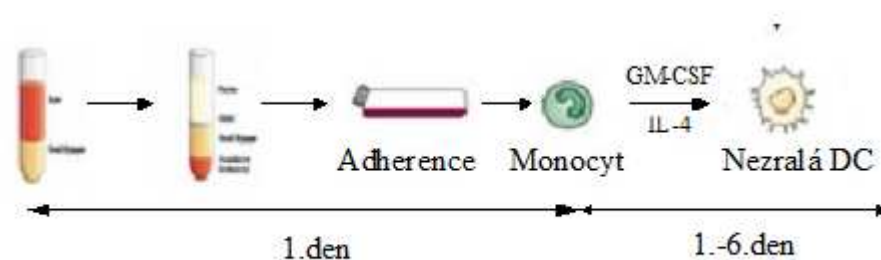
3.3.1 Příprava dendritických buněk diferencovaných z monocytů *in vitro*

V *in vitro* podmínkách lze z periferní krve vyizolovat relativně velké množství monocytů, ze kterých je možné během několika následujících dní vlivem vhodného cytokinového prostředí vypěstovat nezralé dendritické buňky.

Buněčnou suspenzi z buffy coatu jsme přelili do 50 ml zkumavky a naředili v poměru 1:1 v PBS+EDTA. Poté jsme opatrně navrstvili na 15 ml Ficollu Paque a centrifugovali 30 min na 1800 rpm při laboratorní teplotě. Po centrifugaci jsme odebrali prstenec mononukleárních buněk, který je na rozhraní Ficollu Paque a plasmy a přenesli do nové 50 ml zkumavky. Dále jsme buňky resuspendovali v PBS a stočili na 1200 rpm. Promytí se zopakovalo ještě dvakrát, přičemž počet otáček byl snižen na 1000 a následně na 800 rpm při 4°C. Následně jsme buňky spočítali, nasadili do kultivačních lahvíček s povrchem 75cm² do 15 ml kompletního média a uložili na 2 hodiny adherovat do inkubátoru při 37°C v prostředí 5% CO₂.

Oplachováním dna lahvičky PBS jsme odstranili nenaadherované lymfocyty (které jsme zamrazili pro další použití), lahvičku třikrát opláchli PBS, poté k naadherovaným buňkám přidali 20 ml kompletního média s cytokiny IL-4 (20 ng/ml) a GM-CSF (500 U/ml) a lahvičky umístili opět do inkubátoru.

Po pěti dnech jsme získali nezralé dendritické buňky.



Obr. 3.3.1: Příprava dendritických buněk *in vitro*

3.3.2 Stimulace nezralých dendritických buněk

Nezralé dendritické buňky jsme po pěti dnech sebrali z kultivačních lahvíček, promyli v PBS a nasadili do 24 nebo 48 jamkových destiček tak, aby byla zachována koncentrace buněk 1M/ml. Následně jsme k buňkám přidali příslušné maturační agens (viz. tabulka 3.3.2) a buňky kultivovali 24 h v inkubátoru.

Stimulant	Receptor	Výsledná koncentrace
polyI:C výrobce 1	TLR3	25 ng/ml
polyI:C výrobce 2	TLR3	25 ng/ml
LPS	TLR4	1 µg/ml

Tabulka 3.3.2: Použité stimulanty dendritických buněk a jejich výsledné koncentrace

3.3.3 Pěstování nádorové linie OV-90

Buněčnou linii karcinomu ovaria OV-90 jsme pěstovali v kompletním médiu v inkubátoru při 37°C. Každý třetí den jsme prováděli pasáž linie. Staré médium jsme slili a lahvičku opláchli PBS. Vzhledem k tomu, že se jedná o adherentní linii, pomocí 5 ml trypsinu jsme nejprve buňky odlepili ode dna lahvičky (buňky se inkubovaly s trypsinem asi 5 minut) a poté vyměnili staré médium za čerstvé. Provádí se maximálně šest pasáží, aby se předešlo případným mutacím vzniklým dlouhodobým pěstováním nádorových buněk.

3.3.4 Pulsace dendritických buněk nádorovými buňkami linie OV-90

U nádorových buněk, které se přidávají k DC, jsme vždy 24 h předem indukovali apoptózu. Poměr dendritických buněk k nádorovým buňkám byl 5:1 a nasazovali jsme je v kultivačním médiu do 24 nebo 48 jamkových destiček v koncentraci 1M/1ml.

3.3.5 Apoptóza nádorových buněk

3.3.5.1 Navození apoptózy nádorových buněk

Apoptózu nádorových buněk jsme indukovali pomocí UV záření, kterému jsme buňky vystavili po pasáži na dobu 10 minut.

3.3.5.2 Stanovení apoptózy nádorových buněk – značení Annexinem V

Apoptózu nádorových buněk jsme stanovovali na základě vazby Annexinu V na membránu buněk. Analyzovaným materiálem bylo 100 μ l suspenze nádorových buněk v kultivačním médiu v koncentraci 3-5M/ml. Procento apoptotických a mrtvých buněk jsme stanovovali před indukcí apoptózy a 24 h nebo 48 h od indukce apoptózy. Na toto stanovení jsme používali soupravu APOPTOSIS ASSAY KIT – FITC.

100 μ l buněčné suspenze jsme rozdělili do dvou zkumavek a promyli v PBS. Buňky jsme resuspendovali ve vazebném pufru (ten jsme připravili naředěním 10x koncentrovaného vazebného pufru v poměru 1:9 s destilovanou vodou), do jedné ze zkumavek jsme poté přidali 5 μ l konjugátu annexin – FITC. Druhým vzorkem byla neznačená kontrola (viz.tabulka 3.3.5.2).

Analyzovaný vzorek	Označení vzorku	Značení
Před indukcí apoptózy	Den 0 neznačené	DAPI
	Den 0 značené	Annexin FITC+DAPI
Po indukci apoptózy	Den 1 neznačené	DAPI
	Den 1 značené	Annexin FITC+DAPI
Po indukci apoptózy	Den 2 neznačené	DAPI
	Den 2 značené	Annexin FITC+DAPI

Tabulka 3.3.5.2: Kombinace protilátek pro cytometrickou analýzu apoptózy nádorových buněk

Vzorky jsme inkubovali 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Poté je promyli ve vazebném pufru, centrifugovali, resuspendovali opět ve vazebném pufru a nakonec

přidali ke všem vzorkům 3 μ l DAPI. Vzorky jsme měřili na průtokovém cytometru a data následně analyzovali v softwaru Flowjo.

3.3.5.3 Stanovení apoptózy nádorových buněk – TUNEL assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling)

Tato specifická a citlivá metoda je založena na detekci zlomů DNA. Metoda značí buňky na začátku a ve střední fázi apoptózy. Byly použity živé nádorové buňky a buňky 24 h po indukci apoptózy, v koncentraci 1M/ml.

Buňky jsme rozdělili po 1M do šesti mikrozkmavek a stočili 5 min na 2300 rpm, při laboratorní teplotě. Supernatant jsme odstranili, peletku buněk resuspendovali v 1 ml 3,7% paraformaldehydu a inkubovali 10 min při laboratorní teplotě. Po promytí v PBS jsme k peletce buněk přidali 100 μ l cytoninu a nechali přes noc v lednici.

Další den jsme buňky stočili, přidali 1 ml 1x TdT značícího pufru a opět centrifugovali. Vzorky pro pozitivní kontrolu jsme po promytí v destilované vodě resuspendovali v 25 μ l pracovního roztoku TACS-Nukleáza a inkubovali 20 min ve vodní lázni při 37°C. Ostatní vzorky jsme mezitím ponechali v 1x TdT značícím pufru.

Ke všem vzorkům jsme přidali 25 μ l značícího reakčního mixu, přičemž tři vzorky byly značené TdT enzymem a tři byly bez enzymu. Inkubovali jsme 1 h při 37°C. Reakci jsme zastavili přidáním 1 ml 1x stop pufru. Nakonec jsme ke vzorkům přidali 25 μ l Streptavidin – FITC pracovního roztoku a inkubovali 10 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po posledním promytí jsme vzorky resuspendovali v PBS a až do analýzy na průtokovém cytometru uchovávali na ledu a ve tmě.

3.3.6 Fagocytóza nádorových buněk dendritickými buňkami

Principem testu bylo prokázat fagocytickou aktivitu nezralých dendritických buněk pulsovaných apoptotickými buňkami. Zkoušeli jsme kombinace různých barev a stejně tak pulsaci na ledu a při 37°C v inkubátoru. Měřili jsme na průtokovém cytometru a výsledky doplnili analýzou na konfokálním mikroskopu.

3.3.6.1 Barvení dendritických a nádorových buněk pro účely detekce fagocytózy

3.3.6.1.1 Značení nádorových a dendritických buněk membránovými barvami Vybrant DiI a DiO pro stanovení fagocytózy

U nádorových buněk jsme indukovali UV zářením apoptózu a takto je uchovávali v inkubátoru při 37°C. Následující den jsme buňky třikrát promyli v PBS+EDTA a nakonec resuspendovali v 1 ml RPMI (s antibiotiky). Přidali jsme 5 µl červené barvy Vybrant DiI, pipetou dobře promíchali a inkubovali 15 min při 37°C. Poté jsme buňky centrifugovali v nechlazené centrifuze 5 min na 1500 rpm. Ještě dvakrát jsme promytí zopakovali v RPMI (s antibiotiky). Nakonec jsme buňky resuspendovali v kompletním médiu a stanovili koncentraci.

Při barvení dendritických buněk jsme postupovali stejným způsobem, ale s použitím zelené barvy Vybrant DiO.

3.3.6.1.2 Značení nádorových a dendritických buněk barvou PKH26 a PKH67 pro stanovení fagocytózy

Po pasáži jsme nádorové buňky dvakrát promyli v RPMI (s antibiotiky). Důkladně odstranili supernatant (zbylo max. 25 µl média), přidali 1 ml diluentu C a špičkou důkladně resuspendovali. Bezprostředně před barvením jsme připravili roztok PKH26 v diluentu C (3 µl PKH26 do 1 ml diluentu C), který jsme poté přidali k 1 ml buněčné suspenze a obsah ihned promíchali protahováním špičkou. Inkubovalo se 5 min, s občasným promícháním jemným překlápěním. Reakci jsme zastavili přidáním stejného objemu FBS. K obsahu zkumavky jsme po 1 min přidali stejný objem kompletního média. Následovaly tři promytí v kompletním médiu. Nakonec jsme nádorové buňky spočítali a umístili na 10 min pod UV lampu.

Při barvení dendritických buněk jsme postupovali stejným způsobem, ale s použitím barvy PKH67.

3.3.6.1.3 Značení dendritických buněk protilátkou CD11c pro stanovení fagocytózy

Po čtyřhodinové pulsaci dendritických buněk nádorovými buňkami jsme k DC přidali 5 µl protilátky CD11c a inkubovali 20 min v lednici. Poté jsme objem doplnili 200 µl PBS a centrifugovali 5 min při 1500 rpm. Buňky jsme resuspendovali ve 200 µl PBS.

3.3.6.2 Stanovení fagocytózy nádorových buněk dendritickými buňkami

Principem testu je ověření fagocytické aktivity nezralých DC, které jsou pulsovány apoptotickými nádorovými buňkami.

Dendritické buňky i linie OV-90 značené příslušnými barvami jsme napipetovali na 96 jamkovou U destičku v poměrech 1:1 a umístili na 4 h pulsovat do inkubátoru (případně na led). Poté jsme vzorky přepipetovali na 96 jamkovou V destičku, centrifugovali 5 min při 1500 rpm a resuspendovali ve 100 μ l PBS + 2 % FBS. Měřili jsme na průtokovém cytometru a analyzovali v programu Flowjo.

3.3.6.3 Pozorování fagocytózy nádorových buněk na konfokálním mikroskopu

U nádorových buněk jsme den předem indukovali apoptózu. Následující den jsme dendritické buňky nabarvili barvou Vybrant DiO a nádorové buňky barvou Vybrant DiI. Buňky jsme nasadili do 96 jamkové U destičky, přičemž jsme použili 200 tisíc DC, v poměru 5:1 k nim přidali apoptotické buňky a destičku uložili do inkubátoru při 37°C.

Krycí sklíčka obarvená alcian blue jsme vložili na parafilm do Petriho misek a na každé sklíčko nakápli příslušný vzorek. Přikryli jsme a ponechali půl hodiny v inkubátoru. Poté jsme na parafilm nanесли kapku 2% paraformaldehydu a na to položili sklíčka se vzorkem. Následovalo 2x promytí v PBS a nakonec jsme sklíčka se vzorky přemístili na podložní skla s naneseným montovacím médiem.

Vzorky jsme uchovávali ve tmě a analyzovali na konfokálním mikroskopu. V pěti zorných polích jsme spočítali množství samotných DC, samotných nádorových buněk a pohlcených nádorových buněk dendritickými buňkami. Z toho jsme pak určili procento pohlcených apoptotických nádorových buněk.

3.3.7 Test stimulace lymfocytů

Cílem tohoto testu bylo prokázat stimulaci nádorově specifických lymfocytů dendritickými buňkami pulsovanými apoptotickou nádorovou linií OV-90.

Principem testu je v *in vitro* podmínkách vypěstovat nezralé DC, které jsou schopny pohltit apoptotické buňky. V dalších krocích se k takto manipulovaným DC přidá maturační agens a takto stimulované buňky se poté kultivují a následně kokultivují s autologními T lymfocyty. Aktivace specifických lymfocytů se zjišťuje měřením IFN- γ pomocí průtokové cytometrie.

Z buffy coatu jsme připravili nezralé dendritické buňky a lymfocyty zamrazili pro další použití. Šestý den jsme z kultivačních lahvíček sebrali nezralé DC, promyli v PBS a část nezralých DC zamrazili (pro pozdější restimulaci). Zbylé DC jsme nasadili do 24 jamkových destiček v koncentraci 1M/ml a v poměru 5:1 k nim přidali apoptotické nádorové buňky. Na závěr jsme stimulovali buňky přidáním 10 µl maturačního činidla polyI:C (výrobce 1) a nechali do druhého dne maturovat v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO₂. Vždy jsme měli 4 jamky, nezralé/maturované DC a nezralé/maturované DC pulsované apoptotickými nádorovými buňkami.

Následující den jsme prováděli stimulaci lymfocytů. Lymfocyty jsme rozmrazili, spočítali a nasadili do kultivačního média v koncentraci 1M/ml do 24 jamkových destiček. Poté jsme k nim v poměru 10:1 přidávali stimulované dendritické buňky připravené předchozí den.

Zároveň jsme odebrali 100 tisíc DC u každé jamky a značili protilátkami na detekci povrchových markerů (viz. kapitola 3.3.8).

Třináctý den jsme rozmrazili nezralé DC a opakovali postup z šestého dne.

Následovala restimulace lymfocytů. Lymfocyty kultivované s DC z minulého týdne jsme centrifugovali 5 min při 1500 rpm, resuspendovali v kompletním médiu a každou jamku rozpipetovali po 200 tis. buněk na 96 jamkovou U destičku. Dále jsme aplikovali vzorky a reagentie dle obr. 3.3.7.

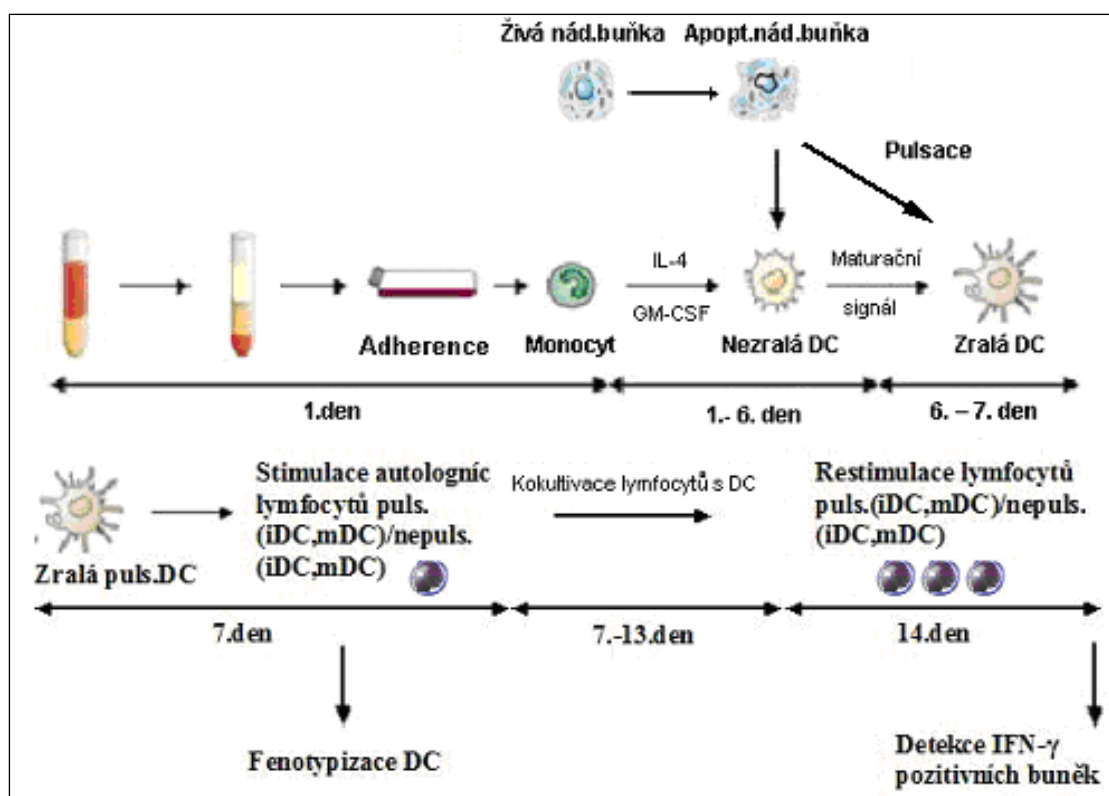
	restimul	nerestimul.	PMA/ ion.	FMO kontrola
lymfo + iDC	○	○	○	○
lymfo + mDC	○	○	○	○
lymfo + iDCp	○	○	○	○
lymfo + mDCp	○	○	○	○

Obr. 3.3.7: Schéma restimulace lymfocytů na 96 jamkové destičce. Do jednotlivých sloupců jsme aplikovali: 1. sloupec – příslušné DC (restimulace), 2. sloupec – pouze kompletní médium (nerestimulované), 3. sloupec – PMA/ionomycin (pozitivní kontrola), 4. sloupec – příslušné DC (negativní kontrola)

Takto připravenou destičku jsme uložili na 2 h do inkubátoru. Po 2 h jsme do všech jamek přidali 50 µl brefeldinu (ředili jsme 1000x v kompletním médiu) a znovu uložili do inkubátoru, tentokrát na 4 h.

Po inkubaci jsme vzorky přepipetovali na 96 jamkovou V destičku a stočili 5 min při 1500 rpm. Supernatant jsme odstranili a buňky fixovali 20 min v 50 μ l fixačního pufru. Následovalo promývání v permeabilizačním pufru a značení buněk na přítomnost IFN- γ .

Připravili jsme 2 značící roztoky, přičemž jeden obsahoval protilátky CD3, CD8 a IFN- γ a ve druhém IFN- γ chyběl (pro správné nastavení byly jako kontrola použity buňky bez značení IFN- γ). Do prvních tří sloupců jsme napipetovali značící roztok s IFN- γ a do čtvrtého sloupce značící roztok bez interferonu. Destičku jsme uložili na 30 min do lednice a poté vzorky promyli v permeabilizačním pufru. Nakonec jsme je resuspendovali ve 200 μ l 1% paraformaldehydu v PBS, přenesli do zkumavek pro FACS a měřili na průtokovém cytometru.



Obr. 3.3.7.1: Schématické znázornění testu na stimulaci lymfocytů

3.3.8 Detekce povrchových markerů – fenotypizace DC

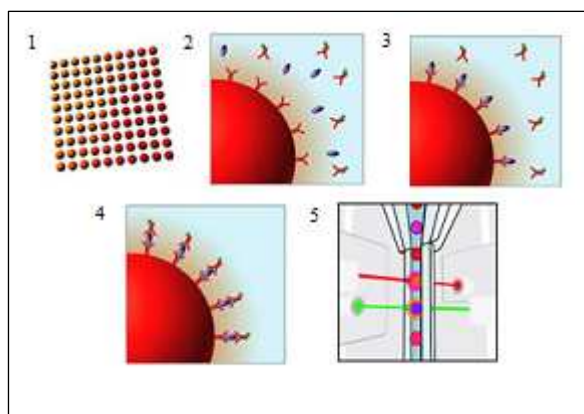
Peletku stimulovaných dendritických buněk jsme resuspendovali v 50 μ l značícího roztoku, který obsahoval mAb proti zvoleným markerům (HLA-DR PC7, CD80 FITC, CD83 PE, CD86 PC5, CD14 PE-Dy 590 a CD11c APC v PBS s 2 % FBS). Nechali jsme inkubovat 20 min v lednici, poté přidali 1 ml PBS a stočili 5 min při 1500 rpm.

Promytí jsme opakovali ještě jednou, nakonec jsme buněčnou peletku resuspendovali ve 300 μ l PBS.

Měřili jsme na průtokovém cytometru BD FACS Aria v softwaru BD FACSDiva a výsledky analyzovali v softwaru FlowJo 8.5.2.

3.3.9 Stanovené množství cytokinů produkovaných stimulovanými dendritickými buňkami metodou Luminex

Systém luminex nám umožňuje v jednom vzorku stanovit více cytokinů najednou. Tato metoda je založena na principu průtokové cytometrie, dokáže stanovit až 100 analytů na jamku a její výhodou je, že k jejímu provedení stačí malý objem vzorku. Využívá mikrokuličky o velikosti 5,6 μ m s navázanými primárními protilátkami proti stanovovaným analytům. K těmto mikrokuličkám je přidán vzorek a je-li v něm přítomen daný analyt, naváže se na primární protilátku. Následně je přidána fluorescenčně značená sekundární protilátka, která je detekována laserem. Výsledná data jsou vyhodnocena softwarem, jenž je součástí celého systému.



Obr.3.3.9: Schéma principu metody luminex

Pomocí mikrokuliček je možné detekovat až 100 různých barev (1). Navázání primární protilátky na mikrokuličku (2), k mikrokuličkám se přidá vzorek a dojde k navázání analytu na primární protilátku (3), k systému se aplikuje detekční protilátka značená fluorochromem (4). Laserový paprsek excituje fluorochrom a následně se detekuje emisní spektrum (5).

Na 96 jamkovou destičku Luminex jsme do každé jamky napipetovali 200 μ l pufru a nechali 10 min na třepačce při laboratorní teplotě. Po provlhčení dna jsme pufr pomocí vakuové odsávačky odstranili. Do příslušných jamek jsme napipetovali 25 μ l standardů (ze kterých si měřící přístroj poté spočítá kalibrační křivku) / kontrol. Do jamek pro vzorky jsme aplikovali 25 μ l pufru a 25 μ l vzorku. Ke standardům a kontrolám jsme

přidali 25 μ l kompletního média. Na závěr jsme do všech jamek připipetovali 25 μ l Antibody-Immobilized Beads a destičku umístili na 2 h na třepačku. Po ukončení inkubace jsme roztok odstranili pomocí vakuové odsávačky a jamky 2x promyli 200 μ l promývacího pufru. Poté jsme do každé jamky přidali 25 μ l detekční protilátky, destičku přikryli a nechali 1 h na třepačce. Do každé jamky obsahující protilátku jsme po skončení inkubace připipetovali 25 μ l roztoku Streptavidin- Phycoerythrinu. Přikrytou destičku jsme inkubovali na třepačce při laboratorní teplotě 30 min. Roztok jsme odstranili vakuovou odsávačkou a destičku 2x promyli 200 μ l promývacího pufru. Na závěr jsme přidali 150 μ l Sheath Fluid na každou jamku. Následovalo měření na Luminex® 100™ Instrument.

V této práci byl použit kit na luminex, který obsahuje protilátky proti IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α a IFN- α .

3.3.10 Použití statistických metod

Statistickou analýzu jsme prováděli pomocí softwaru GraphPad 4.03. Při vyhodnocování exprese kostimulačních molekul a produkce cytokinů jsme k porovnání pulsovaných a nepulsovaných DC použili parametrický párový statistický test a pro zjištění rozdílů mezi jednotlivými maturačními činidly parametrický nepárový statistický test. Hodnoty do 0,05 byly považovány za signifikantní.

4. VÝSLEDKY

Imunoterapie založená na dendritických buňkách, jež využívá jako zdroj nádorových antigenů apoptotické buňky, je v posledních letech předmětem zájmu mnoha výzkumných laboratoří po celém světě. Vzhledem k tomu, že se v naší laboratoři připravuje klinická studie založená na tomto principu, rozhodli jsme se v *in vitro* testech ověřit jednotlivé kroky plánovaného protokolu studie.

Hlavním rysem studie bude použití apoptotických buněk z alogenní nádorové linie karcinomu ovaria jako nádorového antigenu a dále použití agonisty Toll-like receptoru 3, polyI:C pro indukci maturace DC. Zaměřili jsme se tedy na nádorovou linii ovariálního karcinomu OV-90, u níž jsme sledovali, zda je u ní v důsledku vystavení UV záření navozena apoptóza, dále úspěšnost nezralých DC při pohlcování mrtvých nádorových buněk a v neposlední řadě schopnost pulsovaných DC stimulovat nádorově specifické lymfocyty.

Mnohé publikace se rozcházejí v názorech, mají-li apoptotické buňky imunosupresivní účinky na DC nebo jaký je výsledný aktivační stav DC pulsovaných apoptotickými tělisky po setkání s maturačním agens. Proto jsme se rozhodli otestovat inhibiční vliv apoptotických buněk na DC, jenž by mohl ovlivnit výslednou imunitní odpověď. Pro maturaci dendritických buněk jsme testovali maturační agens polyI:C od dvou výrobců a jako kontrolní maturační agens byl použit lipopolysacharid (LPS).

4.1 Testování nádorové linie OV-90 pro vývoj protokolu nádorových vakcín

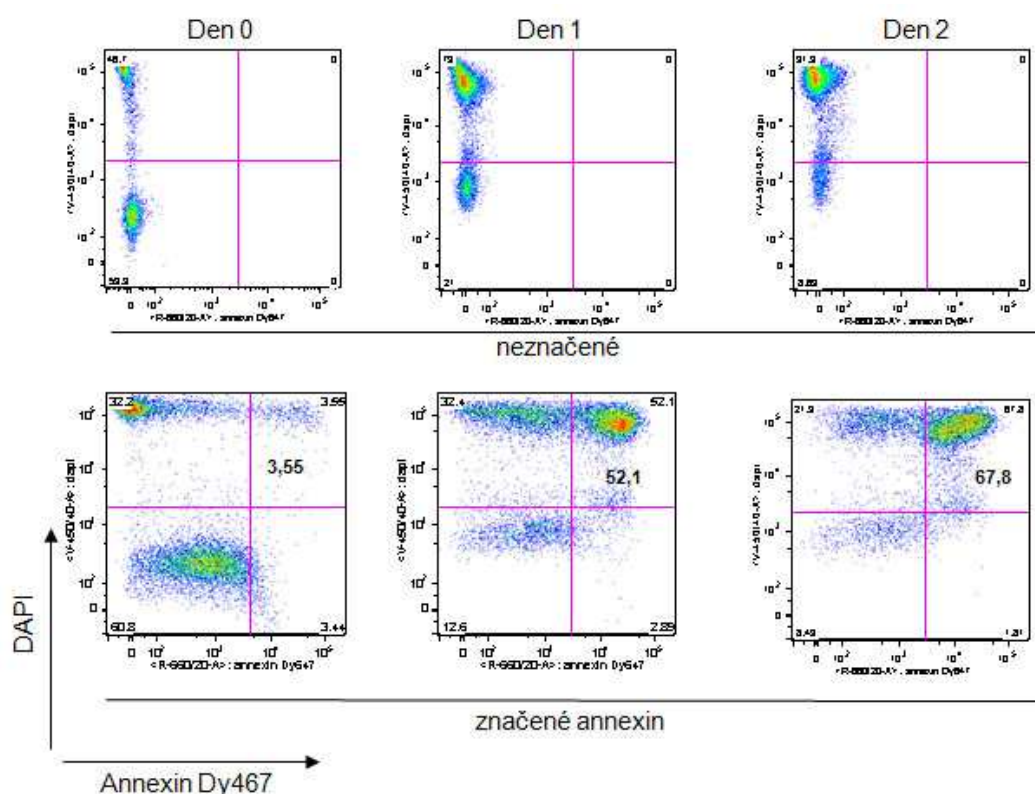
4.1.1 Stanovení apoptózy nádorové linie OV-90

Cílem testu bylo prokázat, že u nádorových buněk vystavených UV záření dochází k indukci apoptózy. Apoptotické nádorové buňky poté byly použity pro další pokusy.

Nádorovou linii OV-90 jsme vystavili UV záření po dobu 10 min. Jeden vzorek jsme ponechali v inkubátoru 24 h a druhý 48 h. Posledním vzorkem byly živé buňky jako kontrola.

Analýza byla prováděna v softwaru FlowJo, kde byly dotplotem zobrazeny parametry annexin FITC a DAPI.

24 h po indukci apoptózy bylo detekováno 12,6 % živých buněk, 32,4 % časně apoptotických buněk, 52,1 % pozdně apoptotických buněk a 2,89 % mrtvých rozpadlých buněk. 48 h po indukci apoptózy odpovídalo 8,49 % živým buňkám, 21,9 % časně apoptotickým buňkám, 67,8 % pozdně apoptotickým buňkám a 1,81% buňkám nekrotickým.

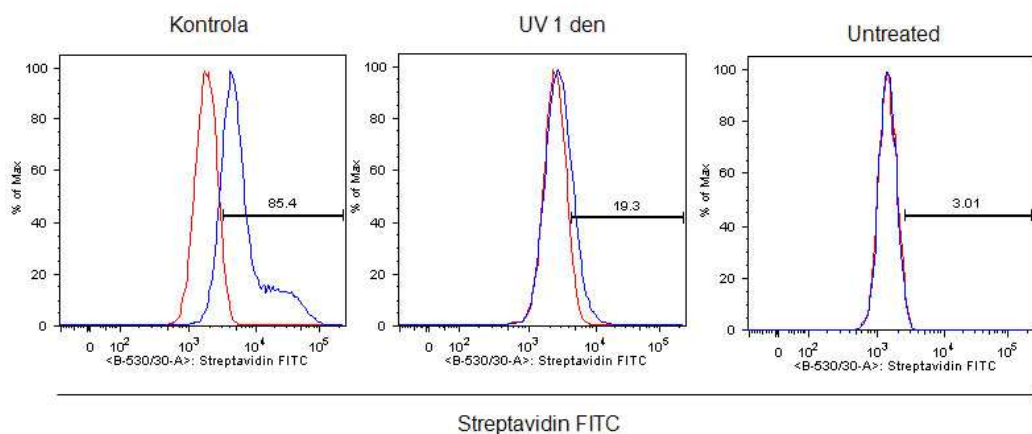


Obr. 4.1.1: Stanovení apoptózy nádorové linie OV-90. Buňky byly značené annexinem V a DAPI, 24 h a 48 h po indukci apoptózy. 3,55 %, 52,1 % a 67,8 % představují populace pozdně apoptotických buněk.

4.1.2 Stanovení apoptózy nádorové linie OV-90 – TUNEL assay

TUNEL assay je alternativní metodou pro detekci apoptózy u nádorových buněk, jež detekuje zlomy DNA. Pro analýzu jsme použili nádorové buňky 24 h po indukci apoptózy a živé buňky pro pozitivní a negativní kontrolu. Vzorky byly značeny protilátkou streptavidin FITC a posléze měřeny na průtokovém cytometru.

Pomocí TUNEL assay jsme prokázali, že po vystavení UV záření dochází u nádorové linie OV-90 k apoptóze u zhruba 20 % buněk.

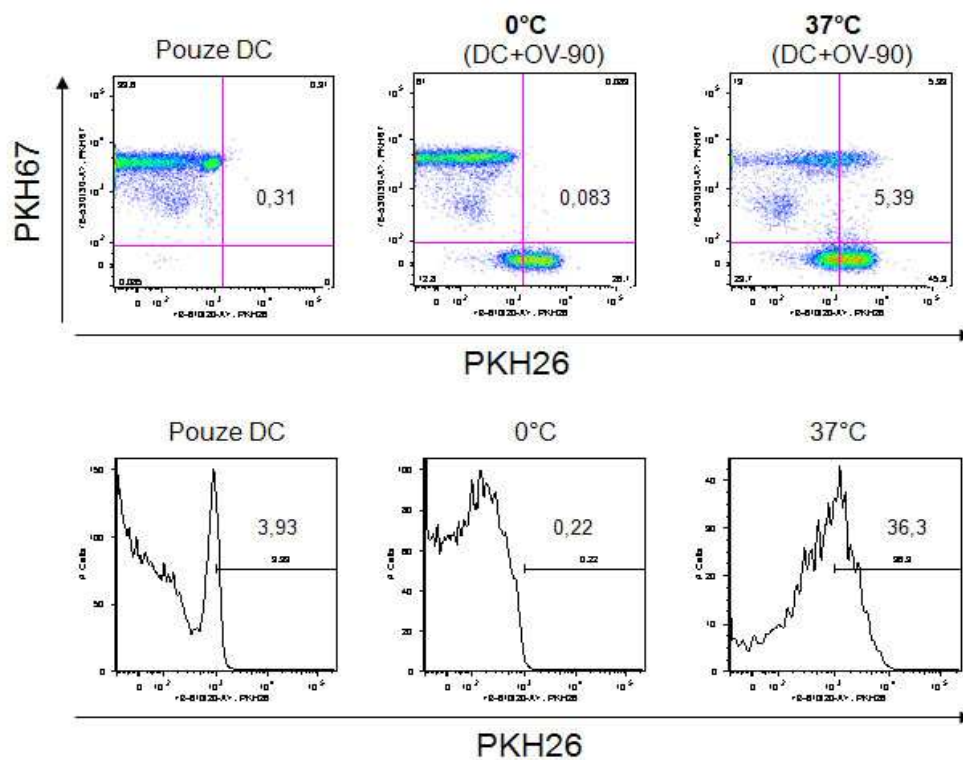


Obr. 4.1.2: Detekce apoptózy linie OV-90 24 h po indukci apoptózy – TUNEL assay. Červený histogram představuje enzymem neznačené buňky, modrý histogram označuje buňky značené enzymem. Jako pozitivní kontrola nám sloužily živé nádorové buňky značené nukleázou, negativní kontrolou byly živé buňky bez značení nukleázou.

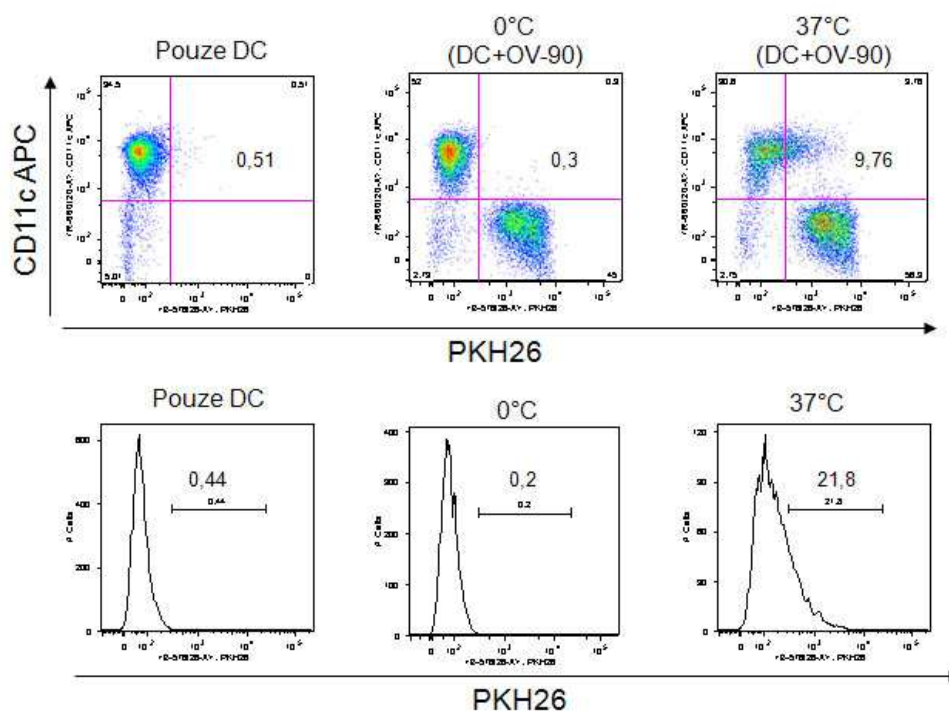
4.1.3 Fagocytóza nádorových buněk dendritickými buňkami

Nezralé dendritické buňky mají vyjímečnou schopnost fagocytózy. V naší studii jsme ověřovali, zda jsou pohlcovány rovněž apoptotické buňky linie OV-90. Sledovali jsme schopnost nestimulovaných dendritických buněk fagocytovat apoptotické nádorové buňky, a to jak v inkubátoru, tak na ledu. Použili jsme 200 tisíc DC a k nim přidali stejný počet nádorových buněk. Pro značení dendritických buněk jsme zvolili barvu PKH67 a protilátku CD11c APC. Nádorové buňky jsme naznačili barvou PKH26 a Vybrant DiI. Hledali jsme vhodnou kombinaci barvení, která nejlépe znázorní populaci DC pohlcujících apoptotická tělíška. Buňky jsme společně inkubovali 4 h a poté měřili na průtokovém cytometru. Jako paralelní negativní kontrola sloužily DC inkubované s apoptotickými buňkami na ledu (fagocytóza při této teplotě neprobíhá).

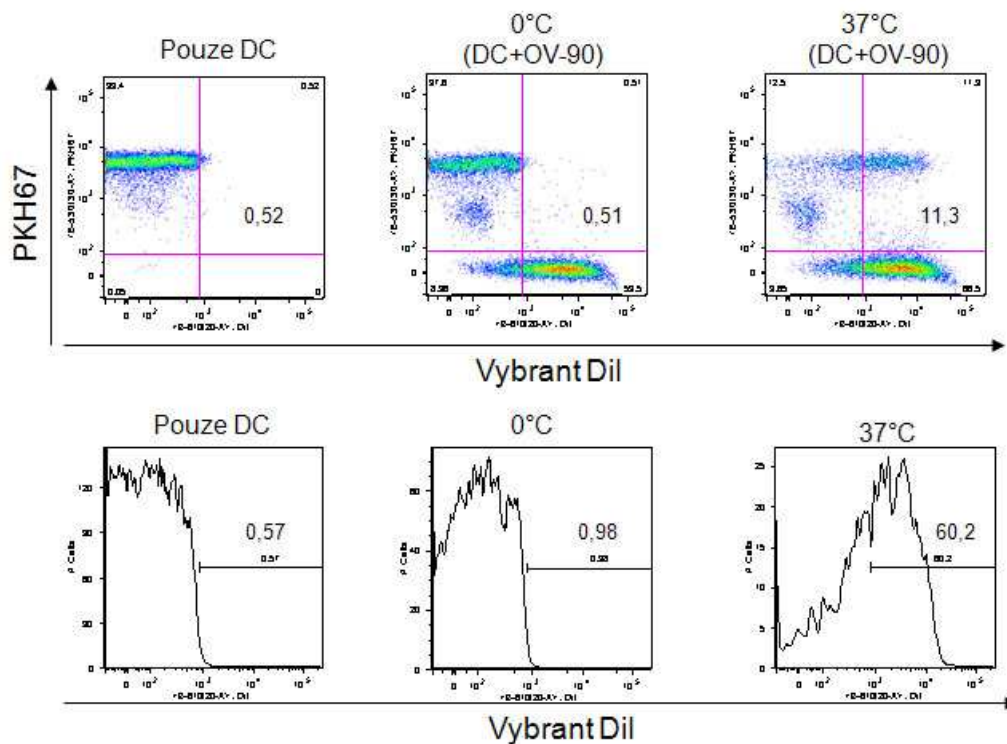
Pulsace na ledu nebyla ani u jedné z kombinací téměř detekována, v porovnání s buňkami, které byly uchovávány v inkubátoru. Nejvhodnější kombinací barev se ukázala být Vybrant DiI (OV-90) a CD11c APC (DC), neboť s použitím těchto barev jsou jasně oddělené populace dendritických a nádorových buněk a je zřetelně detekovatelná populace DC s pohlcenými nádorovými buňkami.



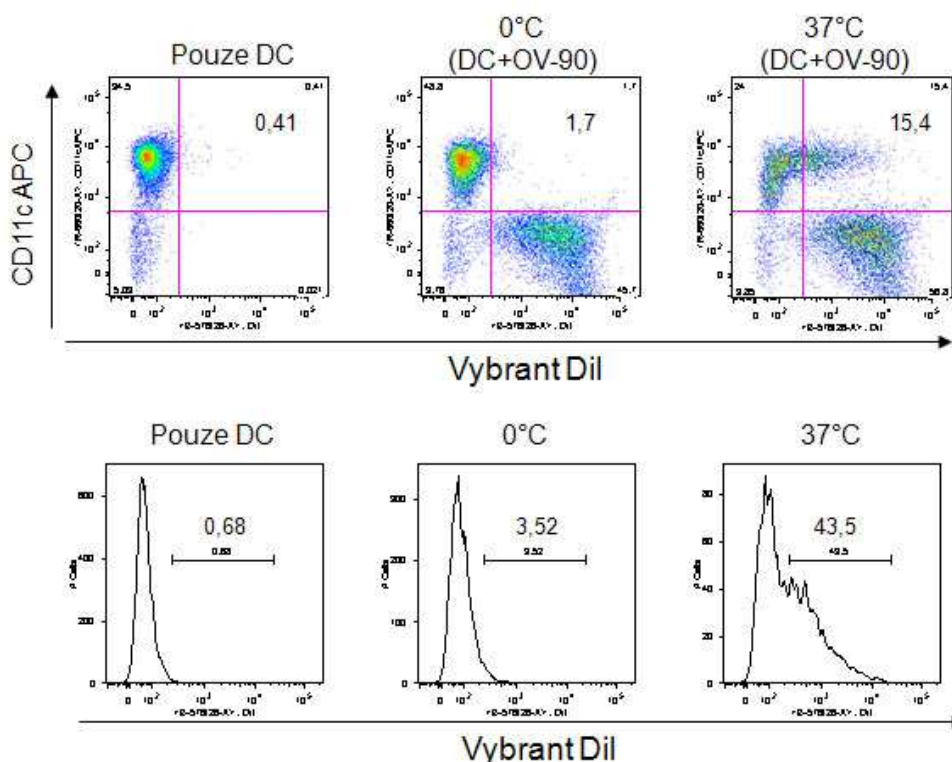
Obr. 4.1.3 a: Testování pulsace nádorových buněk nezralými dendritickými buňkami. DC byly značeny membránovou barvou PKH67, nádorové buňky barvou PKH26. Populace pohlcených buněk je znázorněna jako buňky PKH26+PKH67+, histogramy značí procento DC, které pohltily nádorové buňky.



Obr. 4.1.3 b: Testování pulsace nádorových buněk nezralými dendritickými buňkami. DC byly značeny protilátkou CD11c APC a nádorové buňky membránovou barvou PKH26. Populace pohlcených buněk je znázorněna jako buňky PKH26+CD11cAPC+, histogramy značí procento DC, které pohltily nádorové buňky.



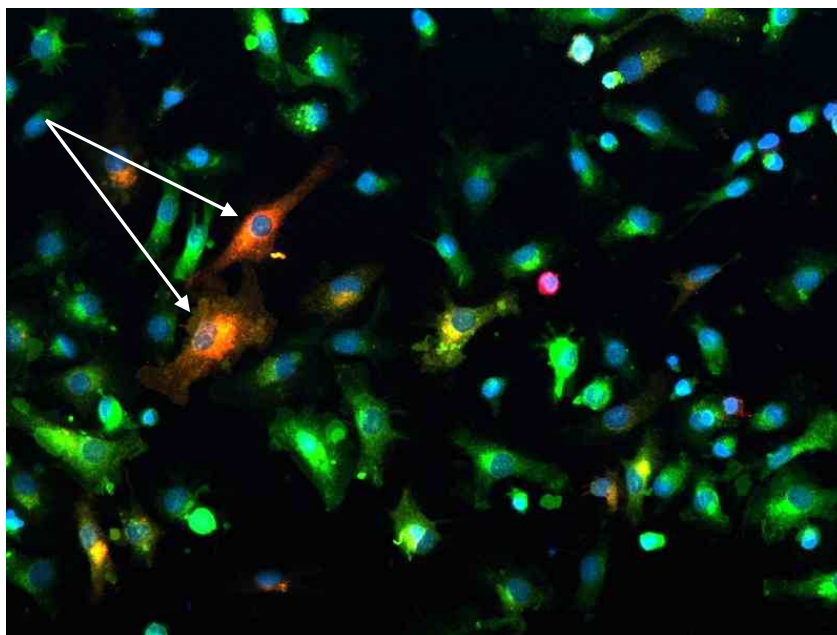
Obr. 4.1.3 c: Testování pulsace nádorových buněk nezralými dendritickými buňkami. DC byly značeny membránovou barvou PKH67 a nádorové buňky značícím roztokem Vybrant DiI. Populace pohlcených buněk je znázorněna jako buňky Vybrant DiI+PKH67+, histogramy značí procento DC, které pohltily nádorové buňky.



Obr. 4.1.3 d: Testování pulsace nádorových buněk nezralými dendritickými buňkami. DC byly značeny protilátkou CD11c APC a nádorové buňky značícím roztokem Vybrant DiI. Populace pohlcených buněk je znázorněna jako buňky Vybrant DiI+CD11cAPC+, histogramy značí procento DC, které pohltily nádorové buňky.

4.1.4 Pozorování fagocytózy nádorových buněk na konfokálním mikroskopu

Fagocytózu nádorových buněk jsme kromě analýzy na průtokovém cytometru pozorovali také pomocí konfokálního mikroskopu. K dendritickým buňkám jsme přidali v poměru 5:1 apoptotické buňky. Prokázali jsme, že přibližně 65 % nádorových buněk bylo pohlceno DC.

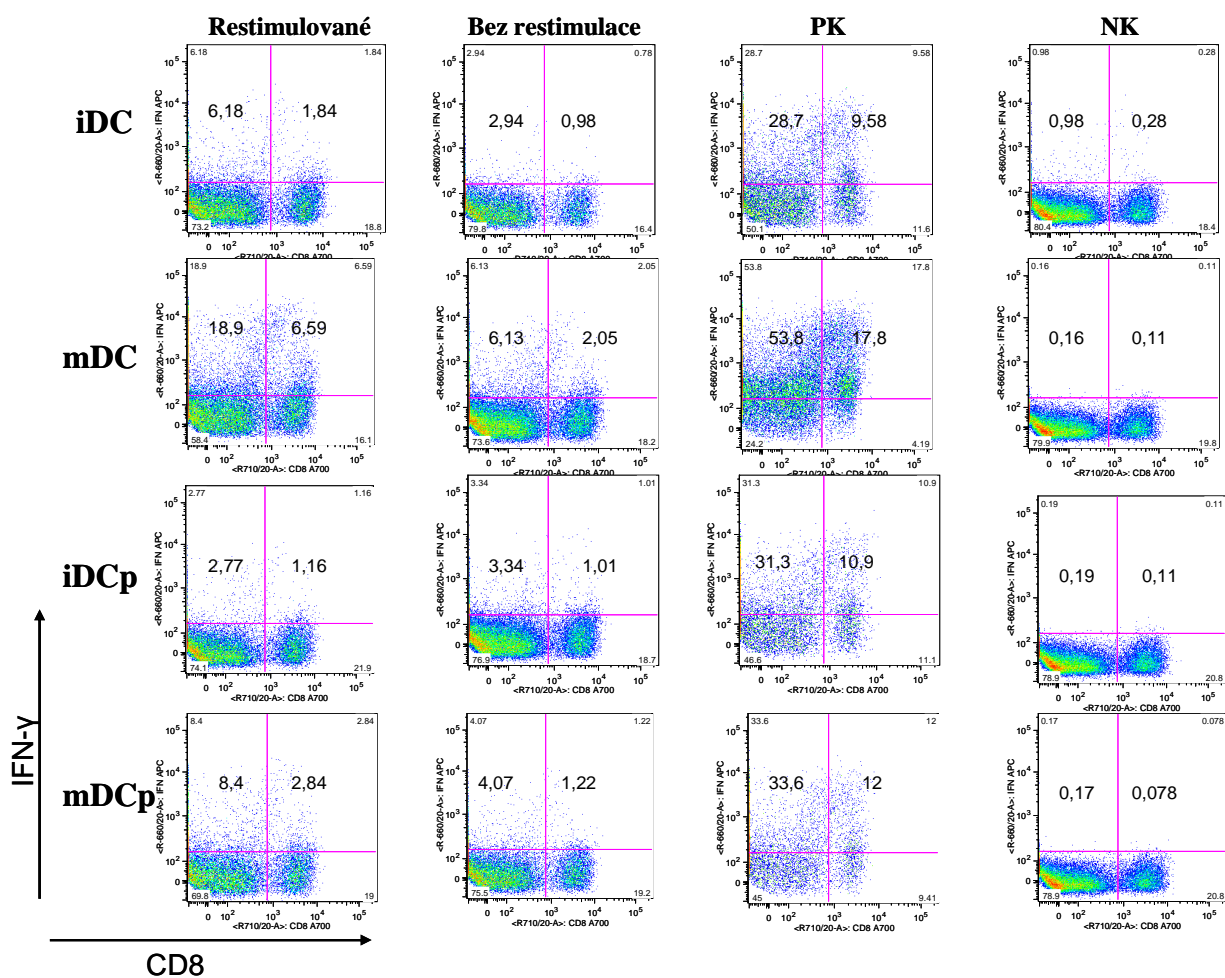


Obr. 4.1.4: Pozorování fagocytózy apoptotických nádorových buněk dendritickými buňkami pomocí konfokální mikroskopie. Dendritické buňky byly značeny barvou Vybrant DiO (zeleně), nádorové buňky byly značené barvou Vybrant DiI (červeně). Bílé šipky značí DC, které pohltily nádorové buňky. Modře zbarvená jsou buněčná jádra.

4.1.5 Test stimulace lymfocytů

Test je založen na schopnosti DC pulsovaných apoptotickými nádorovými buňkami indukovat specifickou protinádorovou lymfocytární reakci. Na průtokovém cytometru jsme analyzovali produkci IFN- γ autologními T lymfocyty po čtrnáctidenní stimulaci a restimulaci dendritickými buňkami. MoDC jsme rozdělili do 4 skupin: nezralé DC, DC stimulované maturačním činidlem polyI:C (výrobce 1), nezralé DC pulsované mrtvými nádorovými buňkami a DC stimulované polyI:C (výrobce 1) pulsované nádorovými buňkami. Postup experimentu je uveden v kapitole 3.3.7. Samotné

maturované DC vykazovaly nejvyšší schopnost stimulovat cytotoxické T lymfocyty, aktivovalo se asi 7 % CD8+ lymfocytů, avšak v kombinaci s ozářenými nádorovými buňkami byl efekt potlačen, zde jsme detekovali pouze necelá 3 % CD8+ lymfocytů produkujících IFN- γ . Experiment byl proveden osmkrát nezávisle na sobě, my uvádíme jeden reprezentativní příklad.



Obr. 4.1.5: Test schopnosti DC aktivovat specifické T lymfocyty - iDC-nestimulované buňky, mDC-stimulované DC maturačním činidlem polyI:C od výrobce 1, iDCp-nestimulované buňky pulsované mrtvými nádorovými buňkami, mDCp-stimulované DC maturačním činidlem polyI:C od výrobce 1 a pulsované nádorovými buňkami, PK-pozitivní kontrola (lymfocyty stimulované PMA a ionomycinem), NK-negativní kontrola

4.2 Imunosupresivní vliv apoptotických buněk na fenotyp DC

Vzhledem k mnohým zahraničním publikacím, ve kterých se udává, že maturační stav dendritických buněk a tudíž výslednou imunitní odpověď ovlivňuje pulsace apoptotických buněk, rozhodli jsme se tento fakt ověřit i v naší práci. Některé studie uvádí inhibiční vliv apoptotických buněk na maturaci DC, jiné udávají, že apoptotické buňky výrazněji nemění fenotyp DC. Proto jsme testovali expresi kostimulačních molekul a produkci cytokinů samotných DC a DC pulsovaných apoptotickými buňkami.

4.2.1 Stanovení fenotypu DC s použitím různých maturačních agens spolu s apoptotickými buňkami

Smyslem pokusu bylo zjistit, zda po přidání maturačního agens dojde k maturaci DC a zda mají apoptotické buňky opravdu imunosupresivní vliv na maturační stav DC. Porovnávali jsme účinek tří maturačních činidel (polyI:C od dvou různých výrobců a LPS) v kombinaci s apoptotickými nádorovými buňkami. DC jsme pulsovali mrtvými nádorovými buňkami a po 4 h stimulovali příslušným maturačním agens. Fenotyp jsme zjišťovali stanovením exprese kostimulačních molekul CD80, CD83, CD86, CD14 a HLA-DR pomocí průtokové cytometrie.

DC derivované z monocytů jsou charakteristické vyšší expresí molekuly CD14, která po maturaci výrazně klesá, zatímco molekuly CD86, CD83, CD80 a HLA-DR naopak stoupají. Také je patrné, že po interakci DC s apoptotickými buňkami jsou exprese povrchových molekul, s výjimkou CD14, nižší oproti DC nepulsovaným.

Po přidání všech tří maturačních činidel došlo dle předpokladu ke zvýšení exprese kostimulačních molekul CD86, CD83, CD80, ale pouze k mírnému zvýšení HLA-DR. Naopak u exprese CD14 došlo k očekávanému poklesu. Po pohlcení apoptotických buněk byly hodnoty molekul CD86, CD83, CD80 a HLA-DR nižší, a to především u DC stimulovaných polyI:C od výrobce 1.

Nejslabší maturační signál dodávalo buňkám polyI:C výrobce 1 v porovnání s dalšími dvěma maturačními činidly. V kombinaci s apoptotickými buňkami byl maturační účinek vyvolaný polyI:C od výrobce 1 ještě slabší.

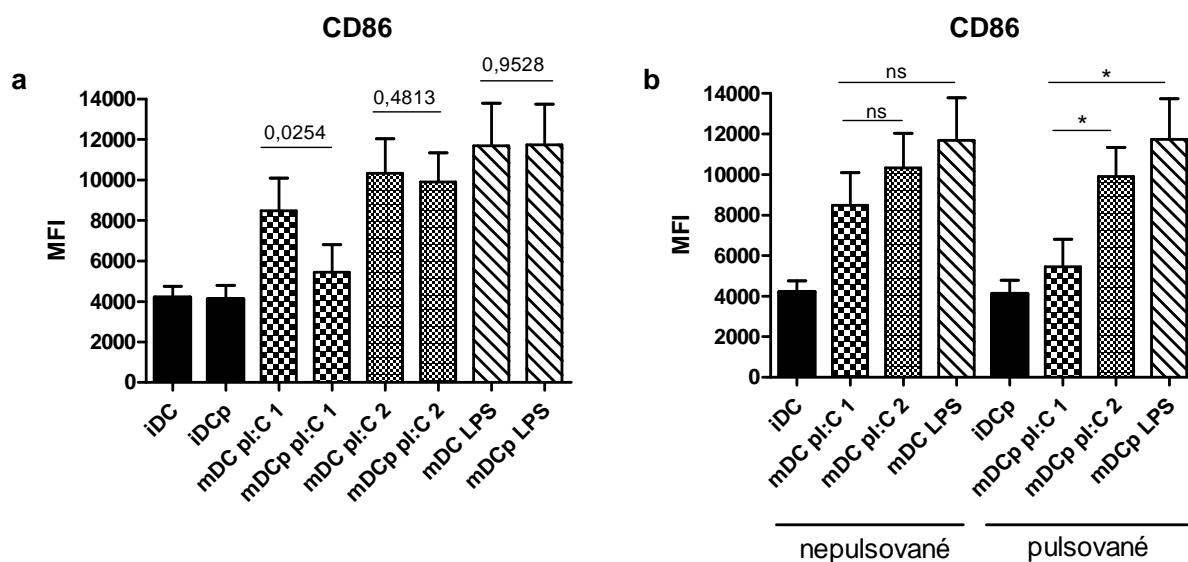
V grafech 4.2.1 jsou uvedeny výsledky měření spolu se statistickým vyhodnocením. Experiment byl proveden u osmi dárců.

Graf 4.2.1: Změny fenotypu MoDC po stimulaci různými maturačními činidly spolu s apoptotickými nádorovými buňkami

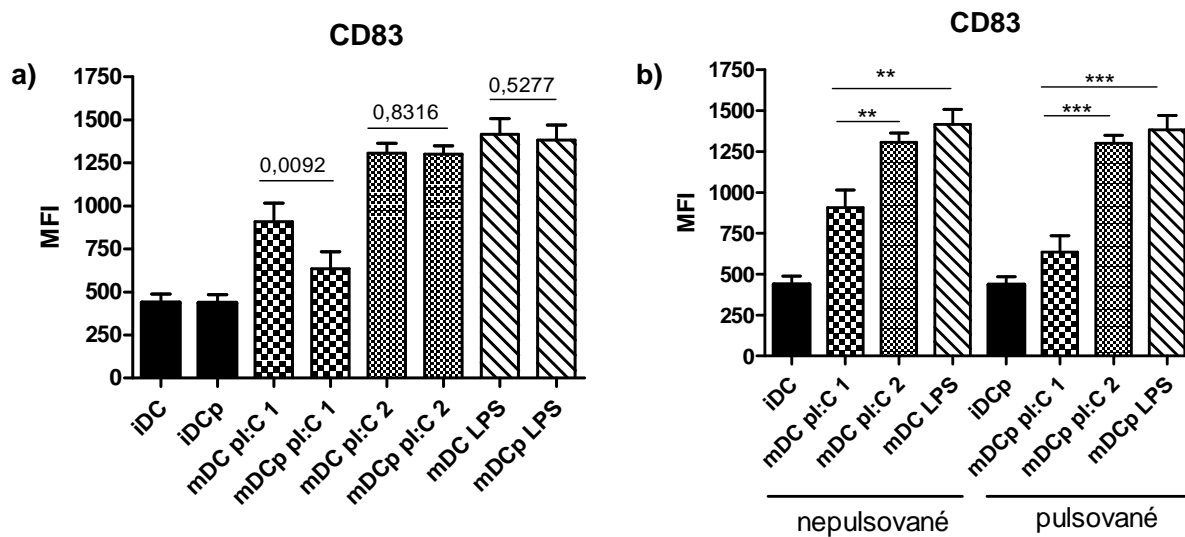
MoDC byly stimulovány TLR agonisty LPS a polyI:C od výrobce 1 a 2 v koncentracích, které uvádí tabulka 3.3.2. Grafy 4.2.1.1-5 a) navíc udávají statistické porovnání pulsovaných a nepulsovaných DC (s použitím statistického párového testu), zatímco grafy 4.2.1.1-5 b) uvádí rozdíly mezi jednotlivými maturačními činidly (s použitím statistického nepárového testu).

iDC-nestimulované buňky, iDCp- nestimulované buňky pulsované apoptotickými buňkami, mDC-stimulované buňky příslušným maturačním agens, pI:C 1-polyinosinová polycytosinová kyselina od výrobce 1, pI:C 2- polyinosinová polycytosinová kyselina od výrobce 2, LPS-lipopolysacharid, ns – není signifikantní, * - hodnoty do 0,05; ** - hodnoty do 0,01; *** - hodnoty do 0,001

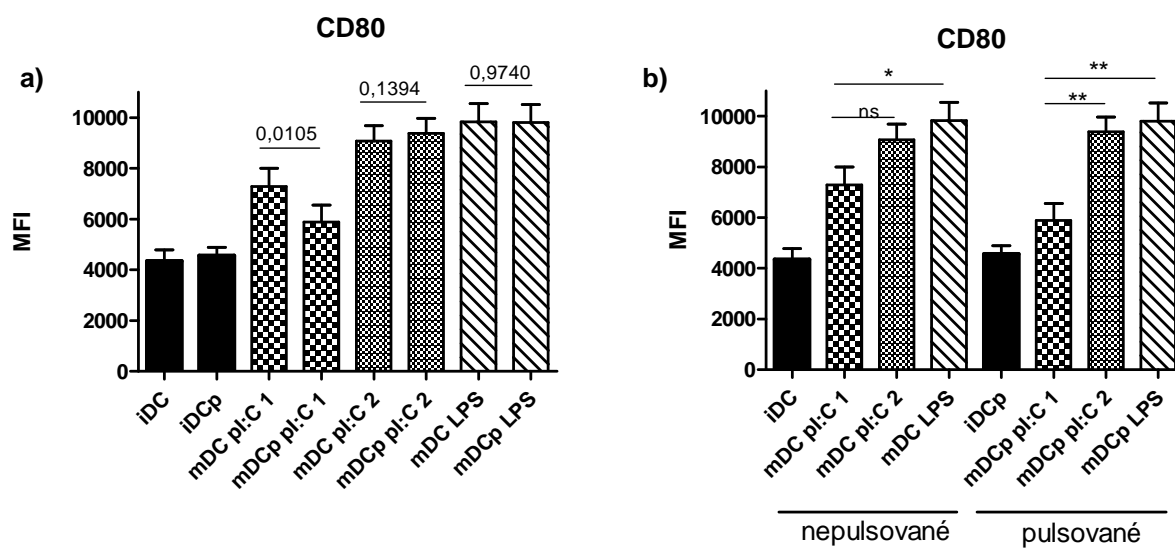
Graf 4.2.1.1: Exprese CD86 u MoDC



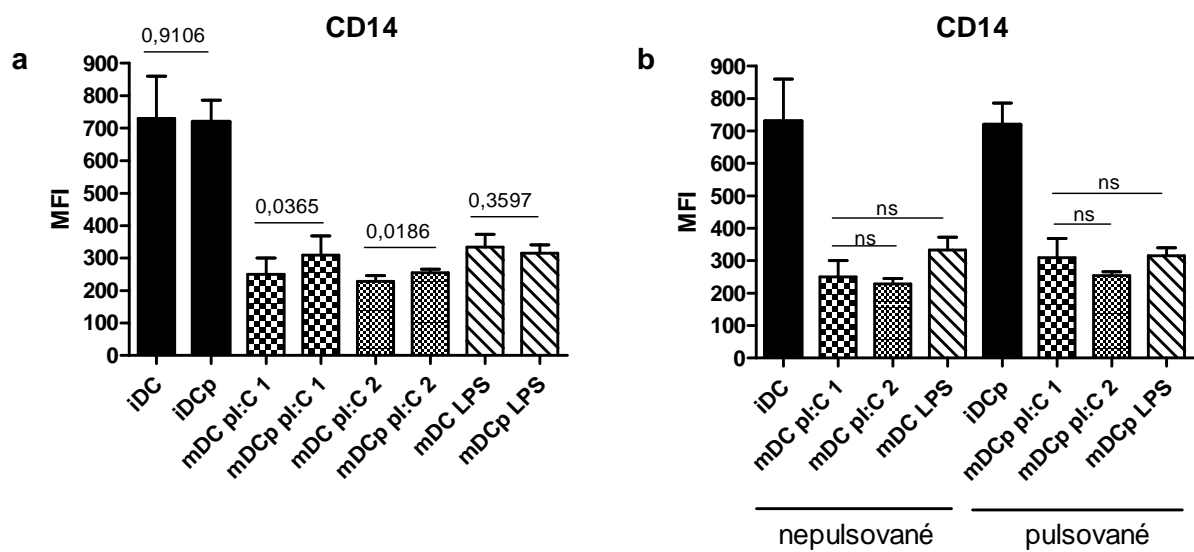
Graf 4.2.1.2: Expresie CD83 u MoDC



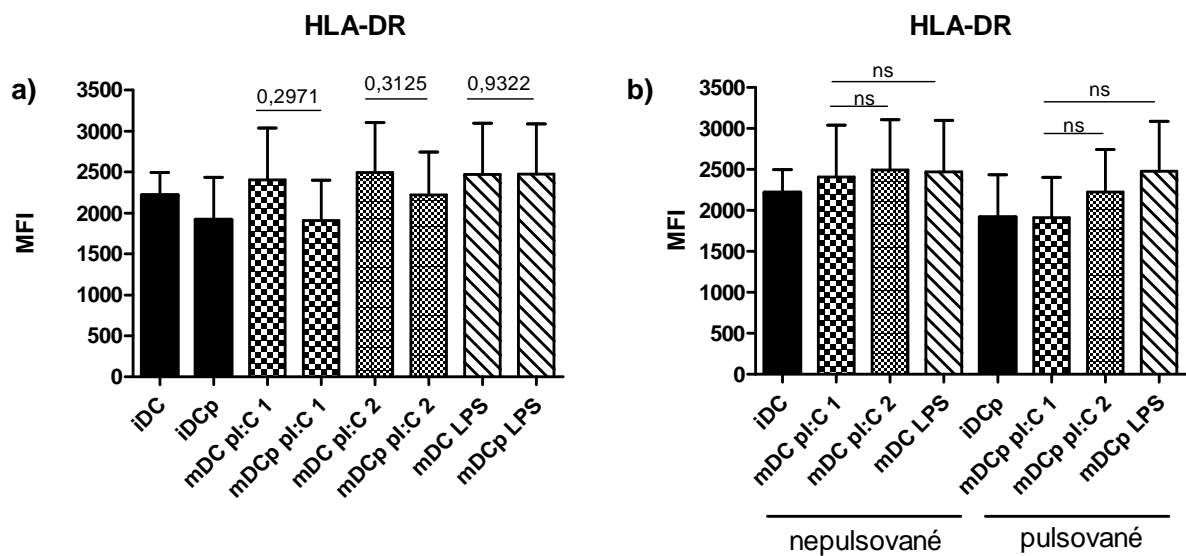
Graf 4.2.1.3: Expresie CD80 u MoDC



Graf 4.2.1.4: Expresie CD14 u MoDC



Graf 4.2.1.5: Expresie HLA-DR u MoDC



4.2.2 Stanovení produkce cytokinů u DC s použitím různých maturačních agens spolu s apoptotickými buňkami

Sledovali jsme produkci cytokinů IL-12p70, IL-6, IL-10 a TNF- α u dendritických buněk stimulovaných TLR agonisty a v kombinaci s apoptotickými buňkami. Produkce IL-12p70, IL-6 i TNF- α se v porovnání maturovaných pulsovaných a nepulsovaných DC výrazně nelišila, s výjimkou buněk stimulovaných polyI:C od výrobce 1, kde byla koncentrace těchto cytokinů znatelně nižší u DC pulsovaných nádorovými buňkami. U IL-10 se hodnoty pulsovaných a nepulsovaných maturovaných DC téměř nelišily. Překvapivě, maturační činidlo polyI:C výrobce 1 dodávalo dendritickým buňkám jednoznačně nejslabší maturační signál, který se odrážel v nižších koncentracích jednotlivých cytokinů.

Měřili jsme také cytokiny IFN- α a IL-1 β , které byly součástí kitu výrobce, nicméně produkce cytokinů byla tak nízká, že zde výsledky neuvádíme.

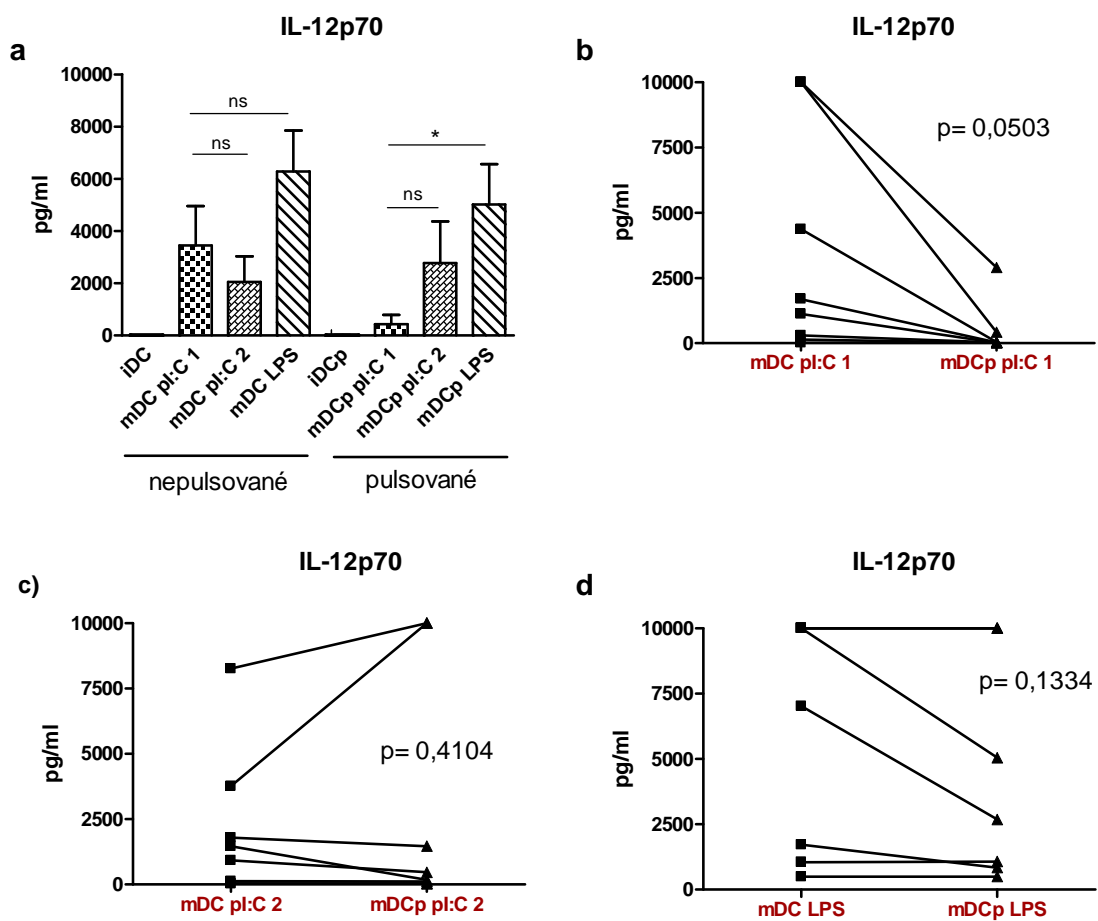
Koncentrace cytokinů jsme analyzovali z nasbíraných supernatantů a pokus byl proveden u osmi dárců.

Grafy 4.2.2: Stanovení množství cytokinů u MoDC stimulovaných jednotlivými maturačními agens v kombinaci s apoptotickými nádorovými buňkami.

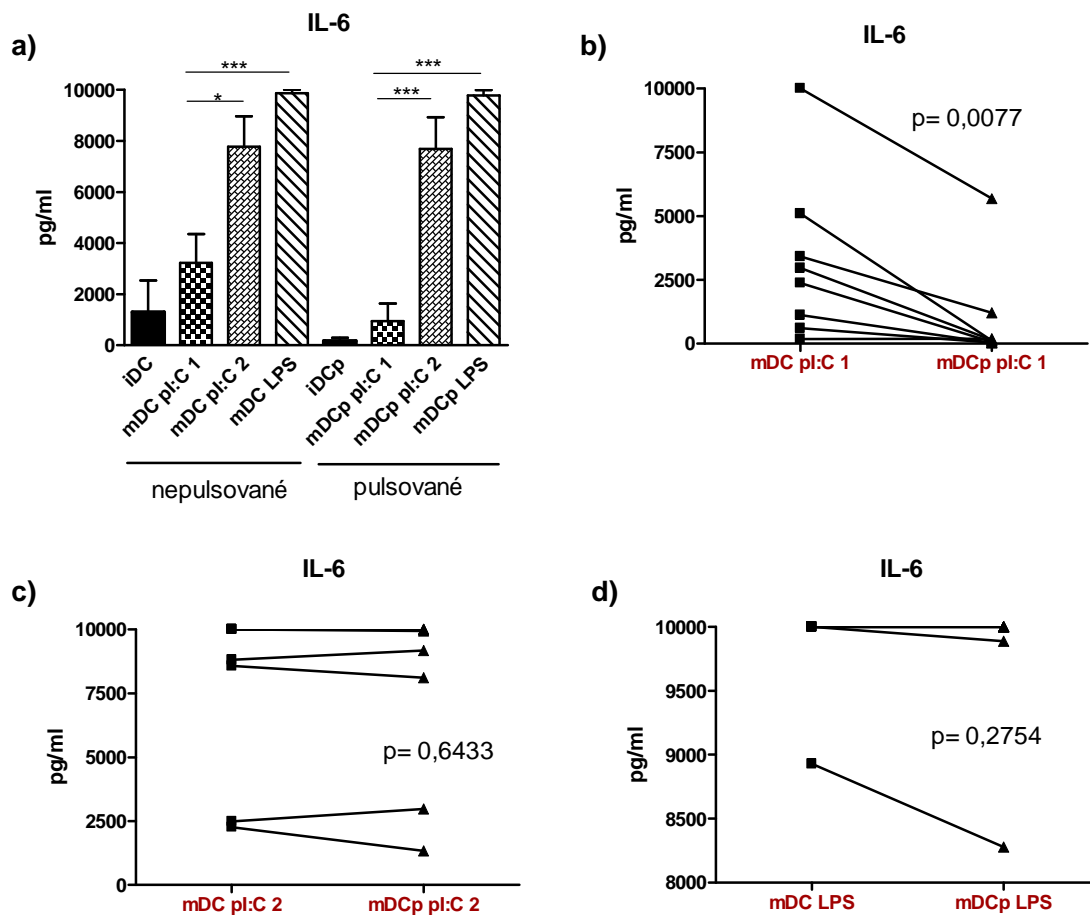
Grafy 4.2.2.1-4 a) znázorňují celkovou produkci konkrétních cytokinů se statistickým porovnáním jednotlivých maturačních agens (s použitím statistického nepárového testu), zatímco grafy 4.2.2.1-4 b), c) a d) uvádějí srovnání mezi zralými DC pulsovaných a nepulsovaných apoptotickými buňkami u jednotlivých dárců (s použitím statistického párového testu).

iDC- nestimulované buňky, iDCp- nestimulované buňky pulsované apoptotickými buňkami, mDC- stimulované buňky příslušným maturačním agens, pI:C 1- polyinosinová polycytosinová kyselina od výrobce 1, pI:C 2- polyinosinová polycytosinová kyselina od výrobce 2, LPS- lipopolysacharid, ns – není signifikantní, * - hodnoty do 0,05; ** - hodnoty do 0,01; *** - hodnoty do 0,001

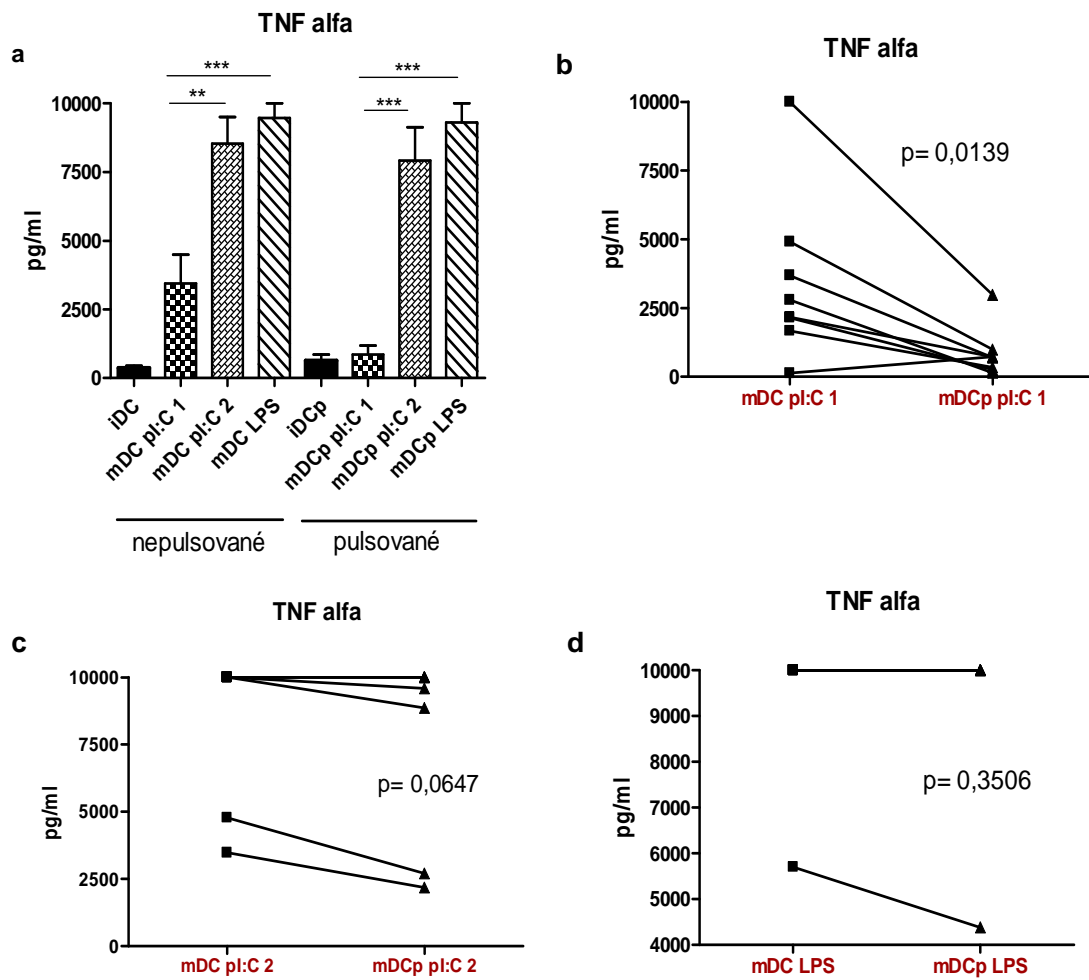
Graf 4.2.2.1: Stanovení množství cytokinu IL-12p70 u MoDC



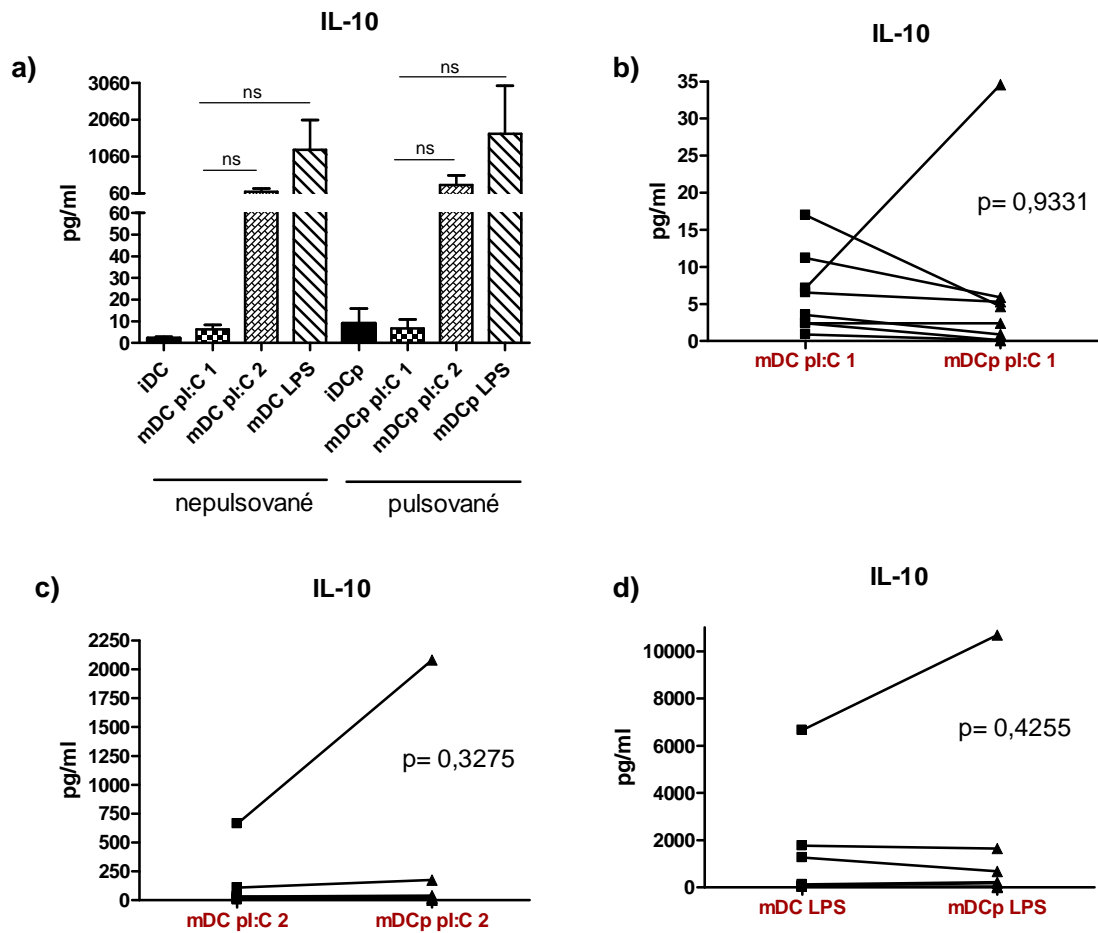
Graf 4.2.2.2: Stanovení množství cytokinu IL-6 u MoDC



Graf 4.2.2.3: Stanovení množství cytokinu TNF- α u MoDC



Graf 4.2.2.4: Stanovení množství cytokinu IL-10 u MoDC



5. DISKUSE

Protinádorová imunoterapie pomocí DC se dostala do centra zájmu přibližně v posledních deseti letech a představuje slibné terapeutické možnosti pro pacienty s různými typy onkologických onemocnění. Především pokroky v poznání biologie DC v 90. letech a pokroky v laboratorních technologiích vedly k vývoji protinádorových vakcín. Byly popsány protokoly, které umožňují připravit z monocytů v periferní krvi relativně velké množství DC. Jejich schopnost pohltit a zpracovat antigeny, aktivovat naivní T lymfocyty a indukovat tak jejich diferenciaci do cytotoxických i pomocných lymfocytů je činí zřejmě těmi nejefektivnějšími buňkami v eliminaci nádorů.

V současné době se na Ústavu imunologie v Motole připravuje klinická studie, jejíž podstatou je výroba DC vakcín, jež budou použity jako adjuvantní terapie pro pacientky s karcinomem ovaria ve stadiu minimální reziduální nemoci, tedy stádiu onemocnění, ve kterém má protinádorová imunoterapie největší šanci na úspěch. Karcinom ovaria je mezi gynekologickými nádory jedním z nejčastějších, s nejvyšší mortalitou a dlouhodobá prognóza je špatná. Cílem této práce je *in vitro* testech monitorovat charakter těchto vakcín sledováním fenotypu DC, fagocytózy, cytokinové produkce a stejně tak schopnosti indukovat proliferaci lymfocytů a produkci IFN- γ .

V naší studii byla zdrojem antigenu alogenní nádorová linie ovariálního karcinomu OV-90, u které byla působením UV záření navozena apoptóza. Některé studie udávají, že pouze antigeny z apoptotických nádorových buněk, na rozdíl od nekrotických, indukují účinnou protinádorovou odpověď (SCHEFFER *et al.* 2003). Jedním z možných vysvětlení je odlišné rozpoznaní a způsob zpracování antigenů pocházejících z apoptotických či nekrotických buněk dendritickými buňkami (ALBERT *et al.* 1998).

Většina laboratoří zabývajících se optimalizací protinádorových protokolů se dnes přiklání k využití alogenních buněčných linií, namísto autologních nádorových buněk, neboť není vždy možné získat dostatečné množství buněk od pacienta potřebné pro výrobu protinádorové vakcíny. Stejně tak je tomu například ve studii publikované v roce 2005, v níž Koido a kol. u pacientů s kolorektálním karcinomem využili k fúzi s DC, místo autologních buněk pacientů, alogenní nádorovou linii. V této práci prokázali, že přítomnost aloantigenů nebrání v rozvoji cytolytické aktivity proti autologním nádorovým buňkám pacienta (KOIDO *et al.* 2005). Výhodou alogenních linií je tedy kontinuální dostupnost dostatečného množství nádorových buněk či fakt, že jejich použití

je dobře standardizovatelné. Naopak nevýhodou by mohla být neshoda nádorových antigenů, které jsou exprimovány buněčnými liniemi, se specifickými receptory autologních T lymfocytů. Další úskalí představují rizika spojená s přenosem virů, a proto je nutné nádorové linie pravidelně testovat.

Apoptóza byla indukována vystavením buněk UV záření po dobu deseti minut. Naše data ukazují, že 24-hodinová inkubace nádorových buněk po ozáření je dostatečná pro navození apoptózy, neboť v tuto dobu byla více než polovina buněk již neživá. Pro detekci apoptózy se nám více osvědčila metoda značení annexinem V, pomocí níž se nám podařilo detekovat více než 50 % pozdně apoptotických buněk, zatímco metodou TUNEL jsme stanovili pouze necelých 20 % apoptotických buněk. Možným vysvětlením je volba nesprávného kitu či fakt, že TUNEL assay je metoda vhodná především pro detekci buněk v časně a střední fázi apoptózy, kdežto pomocí annexinu V můžeme detekovat také pozdně apoptotické buňky, a proto je metoda značení annexinem pro naše účely vhodnější.

Pro přípravu nádorových vakcín je nezbytné, aby byla po UV ozáření kompletně zablokována schopnost nádorových buněk se množit, čímž se zamezí jejich expanzi v těle pacienta. Proto byly paralelně na našem ústavu provedeny testy, které to prokazují a zároveň určují, že desetiminutové vystavení buněk UV záření je vzhledem k tomuto faktu nejbezpečnější. Současně se v různých laboratořích zkouší alternativní metody vyvolávající apoptózu nádorových buněk. Jedná se například o využití cytostatik (např. Bortezomib), které účinně zabíjejí nádorové buňky. Takto indukovaná apoptóza buněk navíc zvyšuje jejich imunogenicitu a zároveň vyvolává aktivaci DC. Nicméně zatím není použití cytostatik, vzhledem k jejich možným vedlejším účinkům, pro klinické studie vhodné (SPISEK *et al.* 2007).

Dále jsme zjišťovali, zda je 4-hodinová inkubace nezralých DC s apoptotickými buňkami dostačující k pohlcení nádorových buněk. Zkoušeli jsme kombinace různých barev pro DC i nádorové buňky a pulsovali současně na ledu i při 37°C v inkubátoru. Fagocytózu jsme analyzovali pomocí průtokové cytometrie. V případě pulsace na ledu, DC téměř nebyly schopny fagocytovat nádorové buňky, zatímco pokud byly DC s apoptotickými buňkami inkubovány při 37°C, většina nádorových buněk byla pohlcena. Fagocytickou aktivitu nezralých dendritických buněk jsme doplnili o analýzu na konfokálním mikroskopu, kdy bylo pohlceno přibližně 65 % nádorových buněk.

V další části práce jsme se zabývali schopností DC aktivovat nádorově specifické T lymfocyty. Autologní lymfocyty byly stimulovány zralými/nezralými DC a zralými/nezralými pulsovanými DC. Měřili jsme produkci IFN- γ lymfocyty po stimulaci a následné restimulaci dendritickými buňkami. Nejvíce interferonu produkovaly lymfocyty, jež byly stimulované pouze zralými DC. Z těchto výsledků je zřejmé, že pokud byly zralé DC pulsovány apoptotickými nádorovými buňkami, procento IFN- γ pozitivních buněk bylo nižší, oproti DC nepulsovaným.

Výsledky stimulace lymfocytů nás vedly k domněnce, zda pulsační apoptotickými buňkami nemohlo docházet k ovlivnění maturačního stavu dendritických buněk. Proto jsme sledovali současné působení pulsační a maturační agens na výsledný stupeň maturace dendritických buněk.

Je známo, že maturační stav DC koreluje s výslednou imunitní odpovědí indukovanou těmito buňkami. Samotné pohlcení apoptotických buněk nevede k zahájení procesu maturace. Tento fakt je velmi důležitý pro protokoly protinádorové imunoterapie, neboť nezralé DC nejsou schopny vyvolat příslušnou imunitní reakci. Je proto nutné pulsované DC aktivovat příslušnými maturačními stimuly. Vyzkoušeli jsme tři maturační činidla (polyI:C od výrobce 1 a 2 a LPS) a jejich vliv na fenotyp DC. Maturační agens, které bude zahrnuto v klinických studiích však musí splňovat podmínky GMP (Good Manufacturing Practise) kvality. PolyI:C od výrobce 1 tyto GMP podmínky splňuje a mohlo by tak být vhodným maturačním činidlem pro přípravu vakcín. PolyI:C od výrobce 2 a LPS požadavky pro GMP kvalitu nespĺňují, nicméně do tohoto projektu byly zahrnuty k porovnání maturačních účinků s polyI:C výrobce 1.

Sledovali jsme expresi kostimulačních molekul CD86, CD83, CD80, CD14 a HLA-DR, která se mění v závislosti na stupni zralosti DC. Naše výsledky překvapivě ukázaly, že polyI:C od výrobce 1 poskytuje dendritickým buňkám nejslabší maturační signál a tudíž exprese povrchových molekul CD86, CD83 a CD80 je po stimulaci tímto polyI:C nižší v porovnání s polyI:C výrobce 2 a LPS. Dále jsme se pokusili ověřit, zda má pohlcení apoptotických buněk vliv na maturaci DC. Tak jako ve studii publikované Renem a kol., která udává, že apoptotické buňky mají imunosupresivní vliv na DC (REN *et al.* 2008), i v našich pokusech se ukázalo, že DC, které byly pulsovány mrtvými nádorovými buňkami, vykazovaly nižší expresi povrchových markerů. Toto snížení se však projevilo zejména u DC maturovaných polyI:C výrobce 1. Je tedy pravděpodobné,

že maturační signál, který poskytují dendritickým buňkám další dva TLR agonisté je dostatečně silný a proto se výrazněji neprojeví inhibiční vliv apoptotických buněk, zatímco u DC stimulovaných polyI:C výrobce 1 byl inhibiční účinek apoptotických buněk prokázán.

Abychom potvrdili hypotézu, že je účinnost DC inhibována pulsatí mrtvými nádorovými buňkami, měřili jsme v supernatantech také produkci cytokinů dendritickými buňkami, neboť cytokinové prostředí je naprosto zásadní při ovlivňování charakteru imunitní odpovědi směrem k Th1 nebo Th2.

Stuart a kol. ve své studii pozorovali sníženou produkci IL-12 DC po pohlcení apoptotických buněk (STUART *et al.* 2002). Podobně i Ren a kol. zjistili, že pohltili-li DC apoptotické buňky, dojde ke snížení prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-12, oproti samotným DC (REN *et al.* 2008). V souladu s těmito výsledky jsme i my potvrdili inhibiční vliv apoptotických buněk na produkci cytokinů. U cytokinů IL-6, IL-12p70 a TNF- α došlo k signifikantnímu snížení koncentrací u DC pulsovaných nádorovými buňkami. Ovšem tyto rozdíly byly opět pozorovány pouze u DC, které byly stimulovány polyI:C od výrobce 1. U buněk maturovaných LPS a polyI:C výrobce 2 nebyly zaznamenány významnější rozdíly v porovnání pulsovaných a nepulsovaných DC. V produkci interleukinu 10 nebyly ani u jednoho maturačního agens pozorovány signifikantní rozdíly u pulsovaných a nepulsovaných DC. Nicméně i z těchto výsledků bylo patrné, že DC, jež byly stimulovány polyI:C výrobce 1 produkovaly výrazně nižší hladiny cytokinů v kontrastu s dalšími dvěma maturačními činidly.

Jak prezentují některé publikace, tak i naše data potvrzují inhibiční vliv apoptotických buněk na maturační stav DC a produkci cytokinů, nicméně tento vliv se projevil pouze u pulsovaných DC, jež byly stimulovány polyI:C od výrobce 1. To, že DC musí být maturované, aby mohly aktivovat naivní T lymfocyty je dnes již dobře známý fakt. Ale je zřejmé, že ne každé maturační činidlo je vhodné pro přípravu protinádorových vakcín. Maturační signál musí být dostatečný, aby se výrazně neprojevil inhibiční vliv pohlcených apoptotických buněk. Na druhou stranu po injikaci buněk zpět do pacienta by mohly mít příliš zmaturované DC zkrácenou životnost a nemusely by tak stihnout dostatečně zaktivovat imunitní systém k obraně proti nádoru. V neposlední řadě, jak již bylo zmíněno, maturační stimuly, stejně tak jako veškerý materiál a laboratorní postupy musí splňovat náročné podmínky GMP.

6. SOUHRN

Výsledky této diplomové práce se dají shrnout do několika bodů:

- Podařilo se nám prokázat, že je u nádorové linie ovariálního karcinomu OV-90 po desetiminutovém vystavení UV záření indukována apoptóza
- Dokázali jsme, že nezralé dendritické buňky jsou v průběhu čtyř hodin společné inkubace schopny pohltit apoptotické nádorové buňky
- Potvrdili jsme, že nezralé DC pulsované apoptotickými buňkami nevyvolávají maturaci DC
- U MoDC stimulovaných polyI:C od výrobce 1 byla zjištěna nižší exprese kostimulačních molekul CD86, CD83 a CD80 oproti polyI:C výrobce 2 a LPS
- MoDC maturované polyI:C výrobce 1 a současně pulsované nádorovými buňkami měly sníženou expresi kostimulačních molekul CD86, CD83 a CD80, zatímco u ostatních dvou maturačních činidel neměla pulsace na maturaci větší vliv
- U DC stimulovaných polyI:C výrobce 1 měla pulsace apoptotických buněk inhibiční vliv na produkci cytokinů IL-12p70, IL-6 a TNF- α
- DC stimulované LPS a polyI:C od výrobce 2 produkovaly výrazně více všech měřených cytokinů v porovnání s polyI:C výrobce 1
- Produkce IFN- γ lymfocyty byla v souladu s uvedenými předešlými výsledky potlačena po pohlcení apoptotických buněk

V této práci jsme si kladli za cíl ověřit jednotlivé kroky, které zahrnuje příprava protinádorové vakcíny pro pacientky s karcinomem ovaria. Aktivované pulsované DC jsme charakterizovali jak funkčně, tak fenotypicky, abychom ověřili jejich schopnost indukovat protinádorovou imunitní odpověď.

Fenotypická analýza zahrnovala stanovení exprese kostimulačních molekul CD86, CD83, CD80, CD14 a HLA-DR.

Funkční studie zahrnovali testování fagocytické aktivity DC, stanovení produkce cytokinů a schopnost aktivace specifických T lymfocytů.

Současně jsme také zjišťovali vliv apoptotických buněk na fenotyp DC a produkci cytokinů.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

ACKERMAN, Anne L; **CRESSWELL**, P. Cellular mechanism governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature Immunology*. 2004, 7, s. 678-684.

ALBERT, ML; **SAUTER**, B; **BHARDWAJ**, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998, 392, s. 86-89.

BANCHEREAU, J, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000, 18, s. 767-817.

BANCHEREAU, J; **STEINMAN**, RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998, 392, s. 245-252.

BARROU, B, et al. Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse, with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA. *Cancer Immunol Immunother*. 2004, 53, s. 453-460.

BASU, S, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *International Immunology*. 2000, 11, s. 1539-1546.

BERZOFSKY, JA; **AHLERS**, JD; **BELYAKOV**, IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nature Reviews Immunology*. 2001, 1, s. 209-219.

BETTELLI, E; **KORN**, T; **KUCHROO**, VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007, 19, s. 652-657.

BOOKMAN, MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *Int J Gynecol Cancer*. 2005, 15, s. 212-220.

BREMERS, AJ; **PARMIANI**, G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000, 34, s. 1-25.

BROSSART, P. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apher Sci*. 2002, 27, s. 183-186.

CANNON, MJ, et al. Novel target antigens for dendritic cell-based immunotherapy against ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002, 2, s. 97-105.

CANNON, MJ; O'BRIEN, TJ. Cellular immunotherapy for ovarian cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2009, 9, s. 677-688.

CAUX, C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha.. *J Exp Med.* 1996, 184, s. 695-706.

COLONNA, M; TRINCHIERI, G; LIU, Y-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology.* 2004, 5, s. 1219-1226.

CURIEL, TJ, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004, 10, s. 942-949.

DE SAINT-VIS, Blandine, et al. The Cytokine Profile Expressed by Human Dendritic Cells Is Dependent on Cell Subtype and Mode of Activation. *The Journal of Immunology.* 1998, 160, s. 1666-1676.

DU BOIS, A, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus. *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95, s. 1320-1329.

DZIOONEK, A, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions.. *Hum Immunol.* 2002, 63, s. 1133-1148.

EDWARDS, AD, et al. Microbial Recognition Via Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways Determines the Cytokine Response of Murine Dendritic Cell Subsets to CD40 Triggering. *The Journal of Immunology.* 2002, 169, s. 3652-3660.

FENG, H, et al. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood.* 2001, 97, s. 3505-3512.

FERLAZZO, G, et al. Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates. *International Immunology.* 2000, 12, s. 1741-1747.

FIELDS, RC; SHIMIZU, K; MULÉ, JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *PNAS*. 1998, 16, s. 9482-9487.

FORSTHUBER, TG; JI, N. Quo vadis Th1 and Th2 cells in autoimmunity and infectious diseases: Th17 cells, the new kid on the block. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2007, 3, s. 251-254.

FUCIKOVA, J, et al. Role imunitního systému v obraně proti nádorům a strategie protinádorové imunoterapie. *Alergie*. 2008, 2, s. 119-125.

GILBOA, E; VIEWEG, J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunological Reviews*. 2004, 1, s. 251-263.

GOLDSZMID, RS, et al. Dendritic Cells Charged with Apoptotic Tumor Cells Induce Long-Lived Protective CD4+ and CD8+ T Cell Immunity against B16 Melanoma. *The Journal of Immunology*. 2003, 161, s. 5940-5947.

GONG, J, et al. Fusions of Human Ovarian Carcinoma Cells with Autologous or Allogeneic Dendritic Cells Induce Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*. 2000, 165, s. 1705-1711.

GROH, V. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells . *PNAS*. 2005, 18, s. 6461-6466.

GROUARD, G, et al. The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand. *J Exp Med*. 1997, 185, s. 1101-1111.

HEATH, WR; CARBONE, FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2001, 19, s. 47-64.

HERNANDO, JJ, et al. Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor-alpha for relapsed metastatic ovarian cancer. *Lancet Oncol*. 2007, 8, s. 451-454.

HOŘEJŠÍ, V; BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha : TRITON, 2009. 316 s.

HSU, FJ, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*. 1996, 2, s. 52-58.

CHIANG, Cheryl L-L, et al. Hypochlorous acid enhances immunogenicity and uptake of allogeneic ovarian tumor cells by dendritic cells to cross-prime tumor-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2006, 55, s. 1384-1395.

JONULEIT, H, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997, 27, s. 3135-3142.

KAISHO, T; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006, 117, s. 979-987.

KAWAI, T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 2001, 167, s. 5887-5894.

KOIDO, S, et al. Dendritic Cells Fused with Allogeneic Colorectal Cancer Cell Line Present Multiple Colorectal Cancer-Specific Antigens and Induce Antitumor Immunity against Autologous Tumor Cells . *Clinical Cancer Research*. 2005, 11, s. 7891-7900.

KREJSEK, J; KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. Pardubice : NUCLEUS HK, 2004. 968 s.

KUGLER, A, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature Medicine*. 2000, 6, s. 332-336.

LIU, B, et al. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol*. 2010, 3, s. 1-11.

MALMSTROM, V; TROLLMO, CH; KLARESKOG, L. Modulating co-stimulation: a rational strategy in the treatment of rheumatoid arthritis?. *Arthritis Res Ther*.. 2005, 7, s. S15-S20.

MCIROY, D; GREGOIRE, M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother.* 2003, 52, s. 583-591.

MEDZHITOV, R; PRESTON-HURLBURT, P; JANEWAY, CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997, 388, s. 394-397.

MUNOZ, LE, et al. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *Journal of Leukocyte Biology.* 2007, 81, s. 6-14.

MUNZ, CH; STEINMAN, RM; FUJII, SI. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2005, 202, s. 203-207.

NESTLE, FO, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine.* 1998, 4, s. 328-332.

OZOLS, RF, et al. Phase III trial of carboplatin and. *J Clin Oncol.* 2003, 21, s. 3194-3200.

PEOPLES, GE, et al. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92, s. 432-436.

QIAN, F, et al. Th1/Th2 CD4⁺ T cell responses against NY-ESO-1 in HLA-DPB1*0401⁺ patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun.* 2004, 4, s. 12.

RASPOLLINI, MR, et al. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are. *Ann Oncol.* 2005, 16, s. 590-596.

REN, G, et al. Apoptotic Cells Induce Immunosuppression through Dendritic Cells: Critical Roles of IFN- γ and Nitric Oxide. *The Journal of Immunology.* 2008, 181, s. 3277-3284.

ROCK, KL; SHEN, L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev.* 2005, 207, s. 166-183.

ROMANI, N, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994, 180, s. 83-93.

ROSENTHAL, A; JACOBS, I. Ovarian cancer screening. *Semin Oncol.* 1998, 25, s. 315-325.

ROUAS, R, et al. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *International Immunology.* 2004, 5, s. 767-773.

ROZKOVA, D, et al. FOCUS on FOCIS: Combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol.* 2009, 131, s. 1-10.

SALLUSTO, F; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994, 179, s. 1109-1118.

SANTIN, AD, et al. Induction of ovarian tumor-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by acid-eluted peptide-pulsed autologous dendritic cells. *Obstet Gynecol.* 2000, 96, s. 422-430.

SAUTER, B, et al. Consequences of Cell Death : Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J Exp Med.* 2000, 191, s. 423-434.

SEDIVA, Anna. Dendritické buňky a alergie. *Alergie.* 2006, 4, s. 287-291.

SHORTMAN, K; LIU, Y-J. Mouse and human dendritic cells subsets. *Nature Reviews Immunology.* 2002, 2, s. 151-161.

SHURIN, MR, et al. Recognition of Live Phosphatidylserine-Labeled Tumor Cells by Dendritic Cells: A Novel Approach to Immunotherapy of Skin Cancer. *Cancer Res.* 2009, 69, s. 2487.

SCHEFFER, SR, et al. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *International Journal of Cancer.* 2003, 2, s. 205-211.

SCHOENBERGER, SP, et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998, 393, s. 480-483.

SINGH, AP, et al. Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *Lancet Oncol.* 2008, 9, s. 1076-1085.

SPISEK, R, et al. 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 Immunol Immunother.* 2003, 52, s. 445-454.

SPISEK, R, et al. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood.* 2007, 11, s. 4839-4845.

SPISEK, R, et al. *Www.zdn.cz* [online]. 2010 [cit. 2010-08-11]. Možnosti protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty. Dostupné z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/moznosti-protinadorove-imunoterapie-u-karcinomu-prostaty-450508>>.

STEINMAN, RM, et al. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med.* 1983, 157, s. 613-627.

STEINMAN, RM; COHN, ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973, 137, s. 1142-1162.

STUART, LM, et al. Inhibitory Effects of Apoptotic Cell Ingestion upon Endotoxin-Driven Myeloid Dendritic Cell Maturation. *The Journal of Immunology*. 2002, 168, s. 1627-1635.

TOBIASOVA, Z, et al. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol*. 2006, 122, s. 18-27.

TUEFFERD, M, et al. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS ONE*. 2007, 2, s. e1138.

WILLIAMS, TI, et al. Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers. *J Proteome Res*. 2007, 6, s. 2936-2972.

YAMAMOTO, M, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003, 301, s. 640-643.

ZHANG, L, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003, 348, s. 203-213.