

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

dr Ivan M. Rajković

**MODULACIJA DIFERENCIJACIJE I
FUNKCIJE HUMANIH
LANGERHANSOVIH ĆELIJA
MONOCITNOG POREKLA *IN VITRO***

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

dr Ivan M. Rajković

**MODULATION OF THE
DIFFERENTIATION AND FUNCTION OF
HUMAN MONOCYTE-DERIVED
LANGERHANS CELLS *IN VITRO***

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

Podaci o mentorima i članovima komisije

MENTOR:

dr Vladimir Trajković

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

akademik dr Miodrag Čolić

redovni profesor Medicinskog fakulteta VMA Univerziteta odbrane u Beogradu i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dušan Popadić

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Miloš Marković

docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Dejan Baskić

vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

Disertaciju posvećujem majci i ocu koji su uvek verovali u mene.

Reči hvale su tu nedovoljne.

Sve znate...

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Veliku zahvalnost dugujem akademiku prof. dr Miodragu Čoliću što me je uveo u svet imunologije i pružio nesebičnu podršku kao mentor tokom rada na ovoj disertaciji.

Hvala vam na ukazanoj podršci!

Posebnu zahvalnost dugujem profesorima Dragani Vučević i Saši Vasilijiću na stručnoj pomoći prilikom izrade ove teze.

Hvala vam što ste mi, kad god sam bio u nedoumici, nepogrešivo ukazali na rešenje!

Dragoj kolegici Ani Thorne želim da se zahvalim na sveobuhvatnoj pomoći počev od izrade eksperimenata pa sve do završnog oblikovanja disertacije.

Hvala ti na prijateljstvu i druženju!

To Reginald Thorne I owe a big gratitude for polishing my english translations.

Thank you my friend, you are a real champion!

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije: „**Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u imunoterapiji tumora**“ (evidencioni broj: 175102) čiji je rukovodilac akademik prof. dr Miodrag Čolić, i projekta Ministarstva odbrane Republike Srbije: „**Funkcionalni aspekti modulacije imunogenih i tolerogenih svojstava dendritskih ćelija**“ (MΦBMA/10/13-15) koji se realizuje na Medicinskom fakultetu VMA Univerziteta odbrane u Beogradu, čiji je rukovodilac prof. dr Saša Vasilijić.

Modulacija diferencijacije i funkcije humanih Langerhansovih ćelija monocitnog porekla *in vitro*

Sažetak

Uvod. Langerhansove ćelije (LĆ) predstavljaju subpopulaciju dendritskih ćelija (DĆ) koja ima ulogu u započinjanju imunskog odgovora na antigene koji su dospeli u epidermis ili sluzokože. DĆ vezuju molekulske obrasce patogena (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) i oštećenih ćelija (engl. *Damage-associated molecular patterns*, DAMP) pomoću membranskih i citosolnih receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca (engl. *Pattern recognition receptors*, PRR). Među PRR su najviše proučavani receptori slični Tollu (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i lektinski receptori C-tipa (engl. *C-type lectin receptors*, CLR). Uspostavljanje kontakta između DĆ i PAMP i DAMP je ključni događaj kojim se povezuju urođena i stečena imunost, što za posledicu ima eradikaciju antigena i nastanak imunološke memorije ili izazivanje periferne tolerancije. Nakon internalizacije i obrade PAMP i DAMP u proinflamacijskom okruženju, DĆ započinju migraciju u T-zavisne zone regionalnih limfnih čvorova u toku koje fenotipski i funkcionalno sazrevaju. Aktivacija CD40 receptora na DĆ nakon vezivanja liganda ovog molekula (CD40L) ispoljenog na površini aktivisanih T-limfocita dovodi do okončanja maturacije DĆ. Tada one postaju potpuno efikasne antigen-prezentujuće ćelije sposobne da polarizuju imunski odgovor CD4⁺ T-limfocita u Th1 smeru i da indukuju citotoksičnu efektorsku funkciju CD8⁺ T-limfocita. Konvencionalne DĆ, sa napred navedenim funkcionalnim karakteristikama, su našle primenu u prevenciji i terapiji infektivnih bolesti i maligniteta u obliku DĆ vakcina. Iako je za *in vivo* ili *in vitro* sazrevanje DĆ često dovoljna stimulacija samo jednim agonistom TLR ili CLR, fenotipski stabilniji i funkcionalno potentniji imunski odgovor u eksperimentalnim i kliničkim ispitivanjima se najčešće dobija tek kombinovanom primenom njihovih analoga, što je posledica specifične integracije različitih, međusobno nezavisnih, unutarćelijskih signala. Nakon nedavne potvrde da LĆ imaju sposobnost unakrsne prezentacije antigena stvorili su se uslovi da i one postanu kandidati za DĆ vakcine. Do sada nije bilo studija koje su ispitivale načine modulacije fenotipskih i funkcionalnih

karakteristika L^Ć koji mogu imati potencijalnu ulogu u razvoju maturacijskih protokola neophodnih za terapijsku primenu ovih ćelija.

Ciljevi. Ispitati i uporediti uticaj standardnog koktela proinflamacijskih medijatora (interleukin (IL)-1 β , faktor nekroze tumora (TNF)- α , IL-6, prostaglandin (PG)E₂), kao i efekte pojedinačne i kombinovane primene agonista TLR3 (Poly(I:C)), dectin-1/Langerin (curdlan) i solubilnog (s)CD40L na sazrevanje, produkciju citokina, potencijal alostimulacije i sposobnost polarizacije Th imunskog odgovora humanih D^Ć monocitnog porekla (MoD^Ć) i humanih Langerhansovih ćelija monocitnog porekla (MoL^Ć).

Metode. Nezrele (n)MoD^Ć su dobijene šestodnevnom kultivacijom monocita iz periferne krvi zdravih davaoca u diferencijacionom medijumu sa faktorom rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF) i IL-4. Za dobijanje nMoL^Ć u ovaj medijum je dodat faktor transformacije rasta (TGF)- β 1. Sazrevanje nMoD^Ć i nMoL^Ć je podstaknuto dodatkom standardnog koktela proinflamacijskih medijatora u ćelijske kulture u toku 48h, odnosno Poly(I:C) i curdlana, pojedinačno ili u kombinaciji, tokom 24h ili 48h. MoD^Ć i MoL^Ć su nakon 24h stimulacije isprane, pa stimulisane sCD40L tokom dodatnih 24h. Fenotipske karakteristike MoD^Ć i MoL^Ć su određivane metodom protočne citofluorimetrije na osnovu analize vezivanja monoklonskih antitela usmerenih protiv površinskih molekula. Produkcija citokina u kulturama ovih ćelija i kokulturama sa CD4⁺ T-limfocitima izmerena je ELISA metodom ili metodom citofluorimetrije pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anticitokinskim antitelima. Sposobnost alostimulacije MoD^Ć i MoL^Ć je procenjena u mešanoj kulturi sa CD4⁺ T-limfocitima.

Rezultati. Stimulacija nMoL^Ć standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora je dovela do povećanja ekspresije HLA-DR, CD83, CD86, CD54 i CCR7 molekula. zMoL^Ć su snažnije indukovale produkciju interferona (IFN)- γ IL-2, IL-4, IL-13 i TGF- β , a slabije IL-10, u ćelijskim kokulturama sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa nMoL^Ć. Sposobnost proliferacije alogernih CD4⁺ T-limfocita stimulisanih zMoL^Ć je bila slabija u odnosu na CD4⁺ T-limfocite kultivisane sa nMoL^Ć. zMoL^Ć su slabije eksprimirale HLA-DR, CD54 i CCR7 u poređenju sa zMoD^Ć. zMoL^Ć su snažnije stimulisale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-4 i TGF- β , a slabije IL-13. Odnos u produkciji IFN- γ / IL-13 je bio veći u kokulturi zMoL^Ć u poređenju sa zMoD^Ć. zMoL^Ć su pokazale snažniji potencijal alostimulacije u poređenju sa zMoD^Ć.

Kombinovani tretman Poly(I:C) i curdlanom je doveo do povećanja ekspresije CD40, CD80 i CCR7 molekula na MoLĆ u poređenju sa ćelijama koje su bile stimulisane pojedinačnim agonistima. MoLĆ stimulisane kombinacijom agonista su snažnije indukovale produkciju IL-2 i ispoljile snažniji potencijal alostimulacije, slabije su indukovale produkciju IL-4 i IL-10, a odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima bio je veći, u poređenju sa kokulturama MoLĆ stimulisanih pojedinačnim agonistima.

MoLĆ pretretirane Poly(I:C) i curdlanom su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije stimulisale produkciju IFN- γ , zbog čega je odnos IFN- γ / IL-4 bio veći u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima u poređenju sa pojedinačno stimulisanim MoLĆ. Ligacija CD40 molekula na MoLĆ pretretiranim Poly(I:C) i curdlanom dovela je do povećanja ekspresije HLA-DR, CD40 i CCR7 molekula u odnosu na MoDĆ, kao i snažnije produkcije IL-12, IL-10, IL-23 i TNF- α . Ove MoLĆ su snažnije indukovale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-17 i IL-10, slabije su stimulisale produkciju IL-4 i TGF- β i pokazale jači potencijal alostimulacije, u poređenju sa MoDĆ.

Zaključci. Tretman MoLĆ koktelom proinflamacijskih medijatora povećava fenotipsko sazrevanje i ekspresiju CCR7 molekula na ovim ćelijama, stimuliše Th1 i Th2 imunski odgovor, ali snižava njihov potencijal alostimulacije. MoLĆ tretirane koktelom proinflamacijskih medijatora pokazuju snažniju sposobnost indukcije Th1 i Th17 imunskog odgovora, ali i slabiji potencijal alostimulacije i slabiju ekspresiju CCR7 molekula u odnosu na MoDĆ.

MoLĆ stimulisane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana ispoljavaju snažniji potencijal alostimulacije, kao i snažniju sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora, a slabije indukuju produkciju IL-10, u poređenju sa MoLĆ koje su stimulisane pojedinačnim agonistima. MoLĆ tretirane ovom kombinacijom agonista ispoljavaju snažniji potencijal alostimulacije i snažnije indukuju produkciju IL-10 i TGF- β , a slabije indukuju Th17 imunski odgovor u odnosu na MoDĆ.

MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana nakon aktivacije CD40 molekula ispoljavaju snažniju sposobnost alostimulacije i indukcije Th1 imunskog odgovora u poređenju sa MoLĆ pojedinačno pretretiranim Poly(I:C) ili curdlanom. U istim uslovima je povećana njihova sposobnost alostimulacije i potencijal za indukciju Th1 i Th17 imunskog odgovora, ali i produkcije IL-10, u poređenju sa MoDĆ.

Na osnovu rezultata naše studije može se zaključiti da opisani načini modulacije fenotipskih i funkcionalnih karakteristika MoLĆ predstavljaju dobru polaznu osnovu u uspostavljanju protokola za dobijanje imunokompetentnih LĆ koje bi se mogle koristiti u terapijske svrhe.

Ključne reči: humane dendritske ćelije monocitnog porekla, humane Langerhansove ćelije monocitnog porekla, standardni koktel proinflamacijskih medijatora, Tollu-sličan receptor 3, dectin-1, Langerin, fenotipizacija, CD4⁺ T-ćelijski odgovor, imunoterapija tumora

Naučna oblast: Molekularna medicina

Uža naučna oblast: Imunologija

UDK broj:

Modulation of the differentiation and function of human monocyte-derived Langerhans cells *in vitro*

Summary

Introduction. Langerhans cells (LCs) represent a subpopulation of dendritic cells (DCs) whose function is to initiate immune responses against the antigens from epidermis and mucosae. DCs bind pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) via membrane and cytosolic pattern recognition receptors (PRRs). The most frequently studied PRRs are Toll-like receptors (TLRs) and C-type lectine receptors (CLRs). Similarly to conventional DCs, the contact established between LC's PRRs and PAMPs and DAMPs is the key event that links innate and adaptive immunity and leads to eradication of the antigen, initiation of the peripheral tolerance and introduction of the immunological memory. After LCs internalise and process PAMPs and DAMPs in a proinflammatory environment, they start to migrate toward T-dependent regions of the regional lymph nodes and, at the same time, become phenotypically and functionally mature. The activation of the CD40 molecule on LCs with a CD40 ligand (CD40L) expressed on the surface of activated T-lymphocytes brings the maturation of LCs to its end, when they become fully efficient antigen-presenting cells, capable of inducing the Th1 polarisation of CD4⁺ T-lymphocytes and cytotoxic effector functions of CD8⁺ T-lymphocytes. Conventional DCs with the aforementioned functional characteristics are used in the prevention and therapy of infectious or malignant diseases as DC-vaccines. Although DCs require stimulation with a single TLR or CLR agonist to become mature *in vitro* and *in vivo* conditions, phenotypically stable and functionally more potent immune response of these cells in experimental and clinical studies is usually achieved only after combined treatment with analogues of these receptors because of the specific integration of the various, mutually independent, intracellular signals. LCs became candidates for DC-vaccines after recent confirmation that they are capable to cross-present antigens. Until now, there were not any studies that examined the means to modulate phenotypic and functional characteristics of LCs that could have a potential role in the development of maturational protocols necessary for therapeutic application of these cells.

Aim. Investigation and comparison of the influence that standard cocktail of proinflammatory mediators (interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, prostaglandin (PG)E₂), as well as the effects of a single or combined application of TLR3 agonist (Poly(I:C)), dectin-1/Langerin agonist (curdlan) and soluble (s)CD40L, have on the maturation, cytokine production, allostimulation and Th polarisation capability of human monocyte-derived DCs (MoDCs) and human monocyte-derived LCs (MoLCs).

Methods. Immature (i)MoDCs were generated from peripheral blood monocytes of healthy donors cultivated for six days with a differentiation medium that consisted of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and IL-4. The addition of transforming growth factor- β (TGF- β) to this medium resulted in the generation of iMoLCs. Maturation of iMoDCs and iMoLCs was stimulated with the addition of a standard cocktail of proinflammatory mediators in their cultures over 48h, while Poly(I:C) and curdlan were added individually or in combination for 24h or 48h. MoDCs and MoLCs were washed out from the medium after 24h stimulation and additionally stimulated with sCD40L for 24h. Phenotypic characteristics of MoDCs and MoLCs were determined by flow cytometry method after analysis of the ligation of the monoclonal antibodies against their surface molecules. Cytokine production in these cells' cultures and in their cocultures with CD4⁺ T-lymphocytes was measured by ELISA or flow cytometry method with fluorescent beads labeled with anti-cytokine antibodies (FlowCytomix). The allostimulatory capability of MoDCs and MoLCs was tested using a mixed leukocyte reaction assay.

Results. Stimulation of iMoLCs with a standard cocktail of proinflammatory mediators enhanced the expression of HLA-DR, CD83, CD86, CD54 and CCR7 molecules. Matured (m)MoLCs were more potent inducers of interferon (IFN)- γ , IL-2, IL-4, IL-13 and TGF- β , and weaker inducers of IL-10 in the cultures with CD4⁺ T-lymphocytes, compared to iMoLCs. The proliferation capability of allogeneic CD4⁺ T-lymphocytes stimulated with mMoLCs was lower in regard to CD4⁺ T-lymphocytes cultivated with iMoLCs. mMoLCs downregulated expression of HLA-DR, CD54 and CCR7 compared to mMoDCs. mMoLCs more strongly stimulated production of IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-4 and TGF- β , but were weaker inducers of IL-13. The ratio between produced IFN- γ and IL-13 was higher in the coculture with mMoLCs in regard to

mMoDCs. The allostimulatory potential of mMoLCs was stronger compared to mMoDCs.

MoLCs treated with the combination of Poly(I:C) and curdlan upregulated the expression of CD40, CD80 and CCR7 molecules in regard to the cells stimulated with single agonists. MoLCs stimulated with the previous combination of agonists were more potent inducers of IL-2, had stronger allostimulatory potential, were weaker inducers of IL-4 and IL-10 production and the ratio between IFN- γ and IL-4 was higher in coculture with allogeneic CD4⁺ T-lymphocytes, compared to cocultures with individually stimulated MoLCs.

After activation of the CD40 molecule, MoLCs pretreated with Poly(I:C) and curdlan were stronger inducers of IFN- γ production and induced a higher ratio between IFN- γ and IL-4 in coculture with allogeneic CD4⁺ T-cells in regard to single treated MoLCs. Ligation of the CD40 molecule on MoLCs pretreated with previously mentioned combination of agonists resulted in the upregulation of HLA-DR, CD40 and CCR7 molecules compared to MoDCs, and enhanced their production of IL-12, IL-10, IL-23 and TNF- α . These MoLCs were stronger inducers of IFN- γ , IL-2, IL-17 and IL-10 production, but weaker inducers of IL-4 and TGF- β and showed stronger allostimulatory potential in regard to MoDCs.

Conclusions. The standard cocktail of proinflammatory mediators enhanced phenotypic maturation of MoLCs and upregulated expression of the CCR7 molecule, induced stronger Th1 and Th2 immune responses by these cells, but lowered their allostimulatory potential. MoLCs treated with a cocktail of proinflammatory mediators acquired a stronger capability to induce Th1 and Th17 immune responses, but had weaker allostimulatory potential and downregulated expression of CCR7 compared to MoDCs.

MoLCs stimulated with the combination of Poly(I:C) and curdlan exhibited a stronger allostimulatory capability, were more potent inducers of Th1 immune response and weaker inducers of IL-10 production, with regard to MoLCs treated with single agonists. MoLCs treated with this combination of agonists expressed stronger allostimulatory potential and were more potent inducers of IL-10 and TGF- β production, but had weaker Th17 polarisation capability compared to MoDCs.

After activation of the CD40 molecule, MoLCs pretreated with the combination of Poly(I:C) and curdlan showed stronger allostimulatory and Th1 polarisation capability when related to MoLCs singly treated with Poly(I:C) or curdlan. The ligation of the CD40 molecule on MoLCs pretreated with the aforementioned combination of agonists enhanced their allostimulatory capability and potential to induce Th1 and Th17 immune responses, as well as the production of IL-10, compared to MoDCs.

According to the results of our study, it can be concluded that the described modes for the modulation of phenotypic and functional characteristics of MoLCs represent a good starting point in establishing protocols for obtaining immunocompetent LCs that could be used for therapeutic purposes.

Key words: human-monocyte derived dendritic cells, human-monocyte derived Langerhans cells, cocktail of proinflammatory mediators, Toll-like receptor 3, dectin-1, Langerin, CD40, phenotypisation, T-helper immune responses, tumor immunotherapy

Scientific field: Molecular medicine

Narrower scientific field: Immunology

UDK number:

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. IZOLACIJA I DIFERENCIJACIJA LANGERHANSOVIH ČELIJA	5
1.2. ONTOGENEZA I HOMEOSTAZA LANGERHANSOVIH ČELIJA	8
1.3. PREPOZNAVANJE MOLEKULSKIH OBRAZACA PATOGENA OD STRANE LANGERHANSOVIH ČELIJA	11
1.3.1. LIGACIJA TLR3	13
1.3.2. LIGACIJA DECTIN-1/LANGERIN RECEPTORA	16
1.4. MIGRACIJSKE KARAKTERISTIKE LANGERHANSOVIH ČELIJA	18
1.5. SPOSOBNOST ANTIGENSKE PREZENTACIJE I POKRETANJE STEČENOG IMUNSKOG ODGOVORA OD STRANE LANGERHANSOVIH ČELIJA	22
1.5.1. ANTIGENSKA PREZENTACIJA CD4 ⁺ T-LIMFOCITIMA	22
1.5.2. ANTIGENSKA PREZENTACIJA CD8 ⁺ T-LIMFOCITIMA	24
1.6. POSLEDICE LIGACIJE CD40 MOLEKULA NA LANGERHANSOVIM ČELIJAMA NA ČELIJSKI IMUNSKI ODGOVOR	25
1.7. ZNAČAJ LANGERHANSOVIH ČELIJA U PREVENCIJI I TERAPIJI BOLESTI	27
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. MEDIJUMI, HEMIKALIJE I OSTALE SUPSTANCE	35
3.1.1. MEDIJUMI I PUFERI	35
3.1.1.1. RPMI 1640	35
3.1.1.2. PBS	35
3.1.1.3. Puffer za magnetno izdvajanje ćelija	36
3.1.1.4. K-PBS	36
3.1.1.5. TBS	36
3.1.2. CITOKINI	36
3.1.2.1. Rekombinantni humani GM-CSF	36
3.1.2.2. Rekombinantni humani interleukin IL-4	36
3.1.2.3. Rekombinantni humani TGF-β1	37
3.1.2.4. Rekombinantni humani TNF-α, IL-6 i IL-1β	37
3.1.2.5. PGE ₂	37
3.1.3. IMUNOMODULACIJSKE I DRUGE SUPSTANCE	37
3.1.3.1. Poly(I:C)	37
3.1.3.2. Curdlan	37
3.1.3.3. Rekombinantni humani CD40L	38
3.1.3.4. 2-ME	38
3.1.3.5. [³ H]-timidin	38
3.1.3.6. PMA i Ionomycin	38
3.1.3.7. Limfoprep	38
3.2. IZOLACIJA I KULTIVACIJA HUMANIH MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE KRVI	39

3.2.1. IZOLACIJA HUMANIH MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE KRVI	39
3.2.2. IZOLACIJA MONOCITA PERIFERNE KRVI	39
3.2.3. DOBIJANJE I KULTIVACIJA DENDRITSKIH ČELIJA MONOCITNOG POREKLA (MoDC) I LANGERHANSOVIH ČELIJA MONOCITNOG POREKLA (MoLC)	40
3.2.4. IZOLACIJA ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA TEHNIKOM IMUNOMAGNETNOG IZDVAJANJA	41
3.3. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU MoDC I MoLC	43
3.3.1. MONOKLONSKA ANTITELA	43
3.3.2. PROTOČNA CITOFLUORIMETRIJA	43
3.3.3. IMUNOCITOHEMIJSKA DETEKCIJA LANGERINA	44
3.4. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKU MoDC I MoLC	45
3.4.1. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoDC I MoLC	45
3.4.2. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE CITOKINA OD STRANE KULTIVISANIH MoDC I MoLC	46
3.4.3. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE CITOKINA U KOKULTURI CD4 ⁺ T-LIMFOCITA SA MoDC ILI MoLC	47
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	48
4. REZULTATI	49
4.1. UTICAJ KOKTELA PROINFLAMACIJSKIH MEDIJATORA NA SAZREVANJE I FUNKCIJE MoLC	50
4.1.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU MoLC	50
4.1.2. PRODUKCIJA CITOKINA OD STRANE MoLC	54
4.1.3. PRODUKCIJA CITOKINA U KOKULTURI ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA I MoLC	55
4.1.4. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoLC	58
4.2. POREĐENJE FENOTIPSKIH I FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA MoDC I MoLC STIMULISANIH KOKTELOM PROINFLAMACIJSKIH MEDIJATORA	59
4.2.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU MoDC I MoLC	59
4.2.2. PRODUKCIJA CITOKINA OD STRANE MoDC I MoLC	62
4.2.3. PRODUKCIJA CITOKINA U KOKULTURI ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA SA MoDC ILI MoLC	64
4.2.4. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoDC I MoLC	66
4.3. UTICAJ POLY(I:C) I CURDLANA NA FENOTIPSKU SVOJSTVA I FUNKCIJE MoLC	68
4.3.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU MoLC	68
4.3.2. PRODUKCIJA CITOKINA OD STRANE MoLC	70
4.3.3. PRODUKCIJA CITOKINA U KOKULTURI ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA I MoLC	73
4.3.4. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoLC	75
4.4. RAZLIKE U FENOTIPSKIM I FUNKCIONALNIM OSOBINAMA IZMEĐU MoDC I MoLC STIMULISANIH POLY(I:C) I CURDLANOM	77
4.4.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU MoDC I MoLC	77
4.4.2. PRODUKCIJA CITOKINA OD STRANE MoDC I MoLC	79
4.4.3. PRODUKCIJA CITOKINA U KOKULTURAMA ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA SA MoDC ILI MoLC	81
4.4.4. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoDC I MoLC	83

4.5. UTICAJ LIGACIJE CD40 MOLEKULA NA FENOTIPSKU I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE MoLĆ U ZAVISNOSTI OD NJIHOVOG PRETRETMANA	85
4.5.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE MoLĆ	85
4.5.2. PRODUKCIJA CITOKINA OD STRANE MoLĆ	88
4.5.3. PRODUKCIJA CITOKINA U KOKULTURI ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA I MoLĆ	90
4.5.4. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoLĆ	93
4.6. RAZLIKE U FENOTIPSKIM I FUNKCIONALNIM OSOBINAMA IZMEĐU IDENTIČNO PRETRETIRANIH MoDĆ I MoLĆ NAKON LIGACIJE CD40 MOLEKULA	96
4.6.1. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE MoDĆ I MoLĆ	96
4.6.2. PRODUKCIJA CITOKINA OD STRANE MoDĆ I MoLĆ	98
4.6.3. PRODUKCIJA CITOKINA U KOKULTURI ALOGENIH CD4 ⁺ T-LIMFOCITA SA MoDĆ ILI MoLĆ	100
4.6.4. POTENCIJAL ALOSTIMULACIJE MoDĆ I MoLĆ	102
5. DISKUSIJA	104
5.1. UTICAJ KOKTELA PROINFLAMACIJSKIH MEDIJATORA NA SAZREVANJE I FUNKCIJE MoLĆ	105
5.2. POREĐENJE FENOTIPSKIH I FUNKCIONALNIH SVOJSTVIMA MoDĆ I MoLĆ STIMULISANIH KOKTELOM PROINFLAMACIJSKIH MEDIJATORA	109
5.3. UTICAJ POLY(I:C) I CURDLANA NA FENOTIPSKA SVOJSTVA I FUNKCIJE MoLĆ	113
5.3.1. POLY(I:C)	113
5.3.2. CURDLAN	114
5.3.3. KOMBINOVANA STIMULACIJA POLY(I:C) I CURDLANOM	115
5.4. RAZLIKE U FENOTIPSKIM I FUNKCIONALNIM OSOBINAMA IZMEĐU MoDĆ I MoLĆ STIMULISANIH POLY(I:C) I CURDLANOM	118
5.5. UTICAJ LIGACIJE CD40 MOLEKULA NA FENOTIPSKU I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE MoLĆ U ZAVISNOSTI OD NJIHOVOG PRETRETMANA	119
5.5.1. MoLĆ U PRISUSTVU CD40L	120
5.5.2. MoLĆ PRETRETIRANE KOMBINACIJOM POLY(I:C) I CURDLANA	122
5.5.2.1. Poređenje između MoLĆ pretretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana i MoLĆ pretretiranih Poly(I:C)	125
5.5.2.2. Poređenje između MoLĆ pretretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana i MoLĆ pretretiranih curdlanom	126
5.6. RAZLIKE U FENOTIPSKIM I FUNKCIONALNIM OSOBINAMA IZMEĐU IDENTIČNO PRETRETIRANIH MoDĆ I MoLĆ NAKON LIGACIJE CD40 MOLEKULA	128
6. ZAKLJUČCI	133
7. LITERATURA	136
8. PRILOZI	156
9. BIOGRAFIJA AUTORA	181
10. IZJAVE	183

1. UVOD

Langerhansove ćelije (LĆ) predstavljaju poseban podtip dendritskih ćelija (DĆ) koje su od ključnog značaja za procese prepoznavanja, internalizacije i obrade patogena koji narušavaju epitelne barijere, kao i pokretanje adekvatnog imunskog odgovora radi uspostavljanja narušene homeostaze organizma.

Student medicine Pol Langerhans je prvobitno opisao ove ćelije sa razgranatim citoplazmatskim produžecima kao kožne nervne završetke još 1868. godine, nakon što je tkivne preseke epidermisa obojio hloridom zlata koji se u to vreme koristio kao marker nervnog tkiva (Langerhans, 1868). U drugoj polovini prošlog veka se smatralo da su LĆ ontogenetski povezane sa melanocitima i keratinocitima, dok se danas zna da je njihova veza isključivo funkcionalne prirode (Reams i Tompkins, 1973, Seiji i sar., 1961). Napredak u izučavanju biologije LĆ je napravljen od trenutka kada su ove ćelije prepoznate kao leukociti koji vode poreklo od prekursora iz kostne srži (Katz i sar., 1979, Volc-Platzer i sar., 1984) i da su fenotipski slične antigen-prezentujućim ćelijama (APĆ) (Stingl i sar., 1980). Ubrzo je pokazano da *in vitro* suspenzija epidermalnih ćelija u kojoj dominiraju LĆ snažnije stimuliše antigen-specifičnu proliferaciju T-limfocita u poređenju sa suspenzijom epidermalnih ćelija (Stingl i sar., 1978, Braathen i sar., 1980, Braathen i Thorsby, 1980). Istovremeno su usledile *in vivo* potvrde ovog zapažanja na modelima kontaktnog dermatitisa (Silberberg i sar., 1976) i alogene transplantacije kože (Streilein i sar., 1982). Glavni nedostatak ovih studija je u tome što nisu mogle da objasne zašto samo strani antigeni u koži, ali ne i sopstveni, nakon kontakta sa LĆ dovode do nastanka dermatitisa. Radikalna izmena navedenog koncepta je usledila nakon studije Schulera i Steinmana (Schuler i Steinman, 1985) koji su prvi pokazali da mišje *ex vivo* izolovane LĆ mogu imati dva fenotipska i funkcionalna statusa. Sveže LĆ izolovane iz epidermisa tripsinizacijom su bile okruglog oblika, slabo su eksprimirale molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) II klase, a snažno monocitno-makrofagne markere, kao što su F4/80, CD32 i ATP-aza. Ove ćelije su slabo stimulisale proliferaciju T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita (eng. *Mixed Leukocyte Reaction*, MLR), uprkos izražene sposobnosti prezentacije proteinskih antigena u sklopu MHC molekula II klase. Nakon trodnevne kultivacije u potpunom medijumu, zapažena je promena u morfologiji LĆ sa pojavom brojnih

citoplazmatskih nastavaka, smanjenje ekspresije navedenih markera i gubitak sposobnosti obrade proteinskih antigena, ali snažnija stimulacija proliferacije T-limfocita u MLR (Romani i sar., 1989). Kasnije je pokazano da sveže izolovane LĆ nisu identične onima *in situ* (Mommaas i sar., 1995), kao i da LĆ *in situ* ne ekspimiraju MHC molekule II klase sve dok ne počnu da sazrevaju (Pierre i sar., 1997). Maturacija LĆ je dovedena u vezu sa proinflamacijskim citokinima koje proizvode keratinociti koji su došli u kontakt sa signalima opasnosti (Enk i Katz, 1992).

Navedeni eksperimentalni podaci dobijeni *in vitro* omogućili su nastanak hipoteze pod nazivom „paradigma LĆ“ koja je stavila u *in vivo* kontekst posledice prepoznavanja patogena od strane DĆ (Girolomoni i sar., 2002, Wilson i Villadangos, 2004).

Nezrele LĆ su lokalizovane u epidermalnom sloju kože i u drugim epitelima koji oblažu respiratorni, gastrointestinalni i urogenitalni trakt. Specifične su po visokoj ekspresiji: 1) CD207/Langerina koji pripada receptorima za prepoznavanje molekulskih obrazaca (eng. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), 2) Birbekovih granula koje obrazuju molekuli Langerina nakon kontakta sa antigenom a uključene su u alternativni proces antigenske prezentacije T-limfocitima, 3) CD1a koji je odgovoran za vezivanje i prezentaciju lipidnih antigena i 4) E-kadherina, adhezivnog molekula (Merad i sar., 2008). U dermisu i subepitelnim vezivnim tkivima zastupljena je fenotipski heterogena populacija DĆ poznata kao intersticijalne/dermalne DĆ (IDDC). Ova populacija se sastoji od tri subpopulacije koje se razlikuju u ekspresiji CD14 i CD1a molekula: CD14⁺ CD1a⁻, CD14⁻ CD1a⁻ i CD14⁻ CD1a⁺ (Nestle i sar., 1993). Pretpostavlja se da CD14⁺ subpopulacija odgovara makrofagima ili prekursorima APC u koži (Larregina i sar., 2001), dok CD1a⁺ subpopulacija obuhvata dermalne DĆ koje se razlikuju od LĆ (Angel i sar., 2007). CD1a⁺ ćelije, za razliku od CD14⁺ ćelija, pokazuju sposobnost da migriraju u T-zavisne zone limfnih čvorova (Ebner i sar., 2004). IDDC za razliku od LĆ ekspimiraju DC-SIGN (CD209) koji pripada C-tipu lektinskih receptora (Larregina i sar., 2001). Mali procenat CD14⁺ dermalnih DĆ je Langerin⁺, pa se pretpostavlja da su u pitanju prekursori LĆ (Bechettoille i sar., 2006).

LĆ poseduju visoko konzervisan sistem membranskih i citosolnih receptora namenjen prepoznavanju delova patogena koji se pojavljuje ili oslobađa u organizmu u toku inflamacije. Osim patogena, za lokalnu aktivaciju LĆ, važan je i proinflamacijski citokinski milje koji obezbeđuju komponente urođene imunosti kao što su aktivirani tkivni makrofagi i neutrofili privučeni u tkivo iz cirkulacije pod uticajem patogena. Aktivisane LĆ stiču sposobnost migracije i putem aferentnih limfnih sudova odlaze u obližnje T-zavisne zone perifernih limfnih čvorova gde završavaju proces sazrevanja koji je započeo u epitelu. LĆ povećavaju ekspresiju MHC molekula I i II klase, kostimulacijskih molekula (CD40, CD86, CD80), adhezivnih molekula (CD54) i CC-hemokinskog receptora 7 (CCR7), dok istovremeno snižavaju ekspresiju Langerina i E-kadherina (Poulin i sar., 2007, Merad i sar., 2008, Ginhoux i sar., 2007). Zrele LĆ prezentuju T-limfocitima u limfnim čvorovima obrađene antigenske fragmente u sastavu MHC molekula što dovodi do aktivacije i podsticanja proliferacije antigen-specifičnih naivnih T-limfocita, odnosno usmeravanja nepolarizovanih CD4⁺ T-limfocita (Th0) u različite efektorske podtipove (Th1, Th2 i Th17). Takođe, zrele LĆ aktiviraju i već uspostavljene memorijske limfocite, kako bi patogen u zavisnosti od porekla bio najefikasnije eliminisan (Moore i sar., 2001, Geissmann i sar., 2002).

„Paradigma LĆ“ je modifikovana na dva načina:

1) DĆ nisu isključivo imunogene, već mogu da pokrenu i perifernu toleranciju. Nakon preuzimanja antigena one mogu da steknu sposobnost migracije bez adekvatne maturacije i da indukuju perifernu toleranciju putem dva različita mehanizma: a) indukcijom anergije ili apoptoze specifičnih CD4⁺ T-limfocitnih klonova ili b) diferencijacijom naivnih CD4⁺ T-limfocita u regulatorne T-limfocite (Treg) (Hawiger i sar., 2001, Bonifaz i sar., 2002). Ova funkcija poluzrelih (eng. *semi-matured*) LĆ u koži nije bila prepoznata ranije i uglavnom je povezivana sa dermalnim DĆ.

2) LĆ indukuju razvoj i aktivaciju citotoksičnih T-limfocita (CTL) (Stoitzner i sar., 2006) i imaju sposobnost unakrsne prezentacije antigena CD8⁺ T-limfocitima (Klechevsky i sar., 2008).

LĆ imaju potencijalan terapijski značaj kao LĆ vakcine, ali i znatan preventivni potencijal u uspostavljanju ili pojačavanju vakcinalnog imunskog odgovora na vakcinu. Direktno unošenje antigena i adjuvansa u kožu (intrakutani pristup) ili preko kože (epikutani pristup) moglo bi da dovede do nastanka imunokompetentnih LĆ *in situ* koje bi potencijalno zamenile *ex vivo* LĆ vakcine i time značajno metodološki pojednostavile terapiju kožnih maligniteta. Da bi se uspostavio efikasan i stabilan terapijski ili protektivni imunski odgovor posredstvom LĆ, neophodno je da se za adjuvans izaberu imunomodulatorne supstance koje će dovesti do najoptimalnije fenotipske i funkcionalne maturacije ovih ćelija *in situ* ili *ex vivo*.

1.1. Izolacija i diferencijacija Langerhansovih ćelija

In vitro studije koje proučavaju diferencijaciju i maturaciju DĆ imaju za cilj optimizaciju metoda za njihovu kultivaciju i izučavanje funkcija kako bi se ove ćelije uspešno koristile u terapijske svrhe kao ćelijske vakcine. Humane LĆ se najčešće dobijaju delovanjem citokina na CD34⁺ progenitorske ćelije i CD14⁺ monocita ili se izoluju iz kožnih eksplantata.

CD34⁺ hematopoetske ćelije izolovane iz krvi pupčanika ili kostne srži se u prisustvu faktora stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) i faktora nekroze tumora (TNF)- α diferenciraju tokom dve nedelje u DĆ. Na putu diferencijacije u DĆ, u kulturi CD34⁺ ćelija se izdvajaju dve nezavisne subpopulacije: CD14⁺CD1a⁻ i CD14⁻CD1a⁺. LĆ nastaju od ćelija koje pripadaju CD14⁻CD1a⁺ populaciji (Caux i sar., 1996). Studija Jaksitsa i saradnika je pokazala da i CD14⁺CD1a⁻ ćelije mogu da budu izvor LĆ samo ukoliko se u diferencijacioni koktel sastavljen od GM-CSF/TNF- α doda faktor transformacije rasta β (eng. *Transforming Growth Factor β* , TGF- β) (Jaksits i sar., 1999). Ovakvu osobinu je imala isključivo njihova CD11b⁻ ćelijska frakcija, dok su se CD11b⁺CD14⁺CD1a⁻ ćelije u daljem toku diferencirale u Langerin⁺ DĆ, slično kao i subpopulacija CD14⁻CD1a⁺ u odsustvu TGF- β . Obe populacije ćelija su, za razliku od CD11b⁻ populacije, ekspimirale CD36 molekul i faktor XIIIa, a nisu

ekspimirale E-kadherin i Birbekove granule (Jaksits i sar., 1999, Ardavin i sar., 2001).

CD14⁺CD1a⁻ monociti se nakon sedmodnevne kultivacije u prisustvu GM-CSF, interleukina (IL)-4 i TGF- β diferenciraju u L \acute{C} . Diferencijacija L \acute{C} je bila u korelaciji sa potpunim nestankom CD14⁺CD1a⁻ monocita, i pojavljivanjem CD14⁻CD1a⁺ ćelija koje ekspimiraju E-kadherin i Langerin/Birbekove granule (Geissmann i sar., 1998).

Klasična metoda za izolaciju L \acute{C} *ex vivo* započinje enzimskom separacijom epidermisa od dermisa u prisustvu dispaze. Postoje dva osnovna načina za dobijanje L \acute{C} iz epidermisa: nanošenjem ćelijske suspenzije dobijene tripsinskom digestijom epidermisa na gustinski gradijent ili spontanom migracijom ovih ćelija iz epidermisa nakon kultivacije u osnovnom medijumu (Romani i sar., 2003). Ovakva tehnika izolacije L \acute{C} naziva se sekvencijalnom i karakteriše se niskom čistoćom suspenzije (8%) i visokim prinosom (80%). Naknadnim imunomagnetnim izdvajanjem ćelija anti-CD1a antitelom moguće je dobiti veoma čistu suspenziju L \acute{C} (97%) ali uz dodatno smanjen prinos (70%) (de Jong i sar., 2010a). Osim što je metodološki komplikovana, ova metoda prouzrokuje značajne etičke probleme kada se radi o humanom sistemu pošto zahteva velike uzorke kože kako bi se dobio dovoljan broj L \acute{C} za eksperimente, a dobijene ćelije najčešće nisu pravi reprezentanti nezrelih L \acute{C} *in situ*. L \acute{C} izolovane sekvencijalnom tehnikom su u manjoj ili većoj meri fenotipski i funkcionalno sazrele kao posledica eksperimentalnih manipulacija tokom obrade kožnih reznjeva, zbog čega imaju ograničenu upotrebu tokom ispitivanja protokola maturacije (Romani i sar., 2003, Lenz i sar., 1993).

Modulacija funkcije D \acute{C} može se izazvati brojnim proinflamacijskim citokinima i medijatorima koji se proizvode u toku zapaljenja. Najbolje su proučeni efekti standardizovanog koktela maturacije koga sačinjavaju TNF- α , IL-1 β , IL-6 i prostaglandin (PG)E₂ (Jonuleit i sar., 1997), a koji se najčešće upotrebljavao za sazrevanje D \acute{C} u toku pripreme antitumorskih D \acute{C} vakcina. Kultivacija D \acute{C} u prisustvu ovog koktela ne samo što je povećala ekspresiju MHC molekula I i II klase, CD40, CD80 i CD86, već se ovakav fenotip pokazao najstabilnijim u poređenju sa drugim koktelima maturacije. Takođe, ove D \acute{C} su i pored niske

produkcije IL-12, pokazale jaču sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora, ispoljile snažniji potencijal alostimulacije i bolje preživljavanje u odnosu na nezrele DĆ (Lee i sar., 2002). PGE₂ je odgovoran za povećanje ekspresije CCR7 molekula na DĆ i osetljivosti na hemokine CCL19 i CCL21 što je od značaja za njihovu migraciju u obližnja limfna tkiva, a samim tim i za uspešnost DĆ vakcina. S druge strane, u *in vitro* eksperimentima je pokazano da PGE₂ ponekad dodatno smanjuje produkciju IL-12 od strane aktivisanih DĆ i da indukuje diferencijaciju Th2 i Treg-limfocita, što potencijalno može da inhibira antitumorski odgovor (Scandella i sar., 2002).

Radi prevazilaženja nedostataka standardizovanog koktela maturacije na modulaciju sazrevanja DĆ u okviru razvoja različitih imunoterapijskih protokola, danas se njegov sastav modifikuje uvođenjem, pre svega, agonista PRR i drugih proinflamacijskih citokina. Na taj način se *in vitro* imitiraju uslovi pod kojima DĆ sazrevaju u organizmu u toku inflamacije. DĆ sazrele u prisustvu koktela koga sačinjavaju TNF- α , IL-1 β , Poly(I:C), interferon (IFN)- α i IFN- γ snažnije proizvode IL-12p70 i jače stimulišu imunski odgovor CTL, u poređenju sa DĆ stimulisanim standardizovanim koktelom, a poseduju i sposobnost da migriraju u smeru CCR7 liganada (Mailliard i sar., 2004). Nekoliko studija je pokazalo značaj vremenske i prostorne integracije maturacijskih signala radi postizanja sinergijskog efekta prilikom produkcije citokina ili indukcije Th imunskog odgovora od strane DĆ, a što bi moglo imati terapijski značaj. Produkcija IL-12p70 od strane DĆ je najsnažnija ukoliko se prvo stimulišu pomoću IFN- γ , potom istovremeno agonistima Tollu-sličnog receptora 3 (eng. *Toll-like receptor 3*, TLR3) i TLR4 pa tek onda agonistima TLR8 (Napolitani i sar., 2005), i na kraju angažovanjem CD40L (Schulz i sar., 2000). DĆ pacijenata obolelih od tuberkuloze indukuju snažan Th1 imunski odgovor ukoliko se istovremeno stimulišu agonistima TLR2 i TLR9 (Bafica i sar., 2005).

Efekti standardizovanog maturacijskog koktela na funkciju LC još nisu ispitani. Do sada je pokazano da TGF- β inhibira sazrevanje MoLC samo u prisustvu nespecifičnih signala opasnosti poput lipopolisaharida (LPS), TNF- α ili IL-1 β , ali da nema uticaja na njihovu stimulaciju pomoću CD40L (Geissmann i sar., 1999).

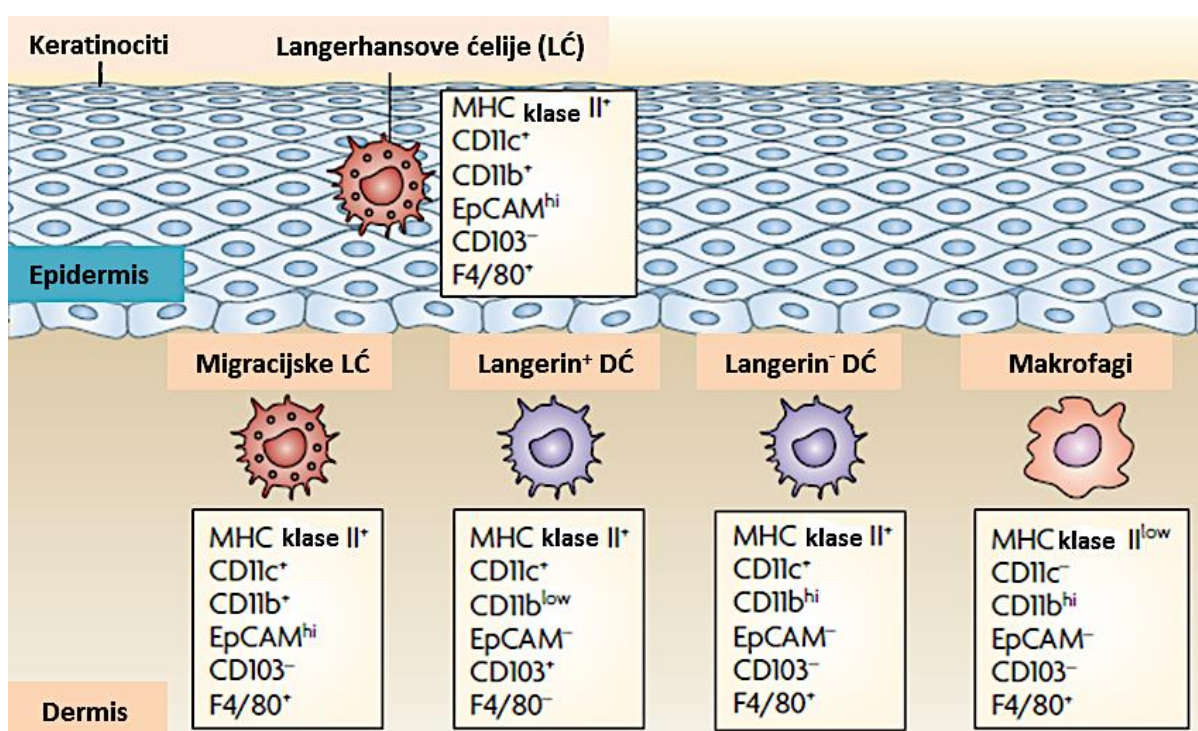
1.2. Ontogeneza i homeostaza Langerhansovih ćelija

LĆ nastaju diferencijacijom progenitorskih ćelija koje vode poreklo od CD34⁺ hematopoetskih matičnih ćelija. Iako se ne zna sa sigurnošću kojoj razvojnoj liniji pripadaju ove prekursorske ćelije, činjenica da LĆ eksprimiraju CD8 molekul i da je za njihovu diferencijaciju neophodan transkripcioni faktor PU.1 a ne PelB, Ikaros i Notch-1, ukazuje na mogućnost mijeloidnog porekla (Romani i sar., 2003). Kao potencijalni direktni prekursor LĆ navodi se populacija CD4⁺CD1a⁺CD11c^{jak^o+}BDCA-1⁺ DĆ prisutna u perifernoj krvi, koja ima sposobnost da endocituje dextran-FITC i eksprimira CD45RO molekul i mijeloidne markere kao što su CD13 i CD33 (Ito i sar., 1999, Sato i Fujita, 2007). Glavna zamerka ovom konceptu jeste da za normalan razvoj LĆ nije neophodno prisustvo Flt3L, najvažnijeg faktora za diferencijaciju kako zajedničkog progenitora, tako i usmerenih mijeloidnih i limfoidnih progenitora (Karsunky i sar., 2003, Merad i sar., 2008).

Prekursori LĆ koji počinju da migriraju u kožu tokom prenatalnog perioda uglavnom potiču iz jetre, dok uoči i nakon rođenja vode poreklo iz kostne srži. Diferencijacija ovih prekursora u LĆ okončava se prvih nedelja po rođenju (Geissmann i sar., 2010). Kongena transplantacija ćelija fetalne jetre novorođenim ili odraslim miševima nakon izlaganja letalnoj dozi radioaktivnog zračenja pokazala je nastanak ćelijskih himera u kostnoj srži, slezini i limfnim čvorovima već u toku prvih šest meseci, ali ovi hibridi nisu bili nađeni i u epidermisu. Slični rezultati su potvrđeni i u eksperimentima sa transplantacijom kostne srži, što sve navodi na zaključak da su LĆ već od prvog dana nakon rođenja potpuno samoobnavljajuća subpopulacija DĆ (Merad i sar., 2002). Rezultati istraživanja na humanoj koži fetusa pokazali su da su LĆ prekursori snažno proliferišuća CD45⁺ populacija leukocita koja u toku prvih šest meseci intrauterinog razvoja počinje da eksprimira markere HLA-DR, CD1c, Langerin i CD1a i stiče ATP-aznu aktivnost. Navedene promene u ćelijskom fenotipu su pozitivno korelirale sa porastom produkcije TGF-β i IL-10 u lokalnom miljeu fetalne kože i pretpostavlja se da imaju ulogu u blokiranju funkcije ovih ćelija (Schuster i sar., 2009). Geissmann i saradnici su analizom Ki-67 proteina u jedrima mišjih LĆ pokazali da se početni talas proliferacije LĆ koji je započeo

intrauterino nastavlja i nakon rođenja, dostižući vrhunac u toku prve nedelje kada se čak 60% ovih ćelija nalazi u mitozu, da bi nakon toga usledilo njegovo smanjenje, kada u adultnom periodu proliferiše samo 2-5% ćelija (Chorro i sar., 2009).

Fenotip rezidentnih LČ u koži ukazuje na snažnu antigen-prezentujuću funkciju i razvijene međucelijske kontakte (MHCII⁺CD1a⁺CD1c⁺CD1b⁺E-cadherin⁺EpCAM^{jak^o+}CD103⁻F4/80⁺CD205⁺CD207⁺). Osnovna razlika između LČ i jedine druge ćelijske populacije u koži koja eksprimira Langerin, dermalnih DČ, jeste u ekspresiji CD11b, EpCAM i CD103 molekula (Merad i sar., 2008) (*Slika 1*).



Merad i sar.; *Nat Rev Immunol* 2008, 8, 935-47

Slika 1. Fenotip antigen-prezentujućih ćelija u zdravoj koži

LČ epidermisa imaju izrazito dug životni vek i znatnu radiorezistentnost. Opisano je da donorske LČ u humanom kožnom graftu mogu da opstanu i duže od četiri godine (Kanitakis i sar., 2004). LČ se u uslovima homeostaze u organizmu obnavljaju deobom ćelija iz sopstvene populacije i ne zahtevaju prisustvo progenitorskih ćelija iz kostne srži ili dermisa. Potvrda ove tvrdnje se može naći u studiji Merada i saradnika koji su na himeričkim miševima proučavali vezivanje bromodeoksiuridina (BrdU) od strane LČ. BrdU je ubrizgan letalno ozračenim

miševima nakon uspostavljanja himeričkog statusa (posle transplantacije kostne srži), tj. kada je dominantan broj ćelija u krvi, kostnoj srži i slezini stekao osobine donora. L^C iz kože ovih miševa se genetski nisu razlikovale od L^C netransplantiranih jedinki i pokazivale su isti intenzitet proliferacije (Merad i sar., 2002). L^C respiratornog, gastrointestinalnog i genitalnog epitela imaju kraći životni vek i u homeostatskim uslovima se nadoknađuju iz populacije cirkulišućih prekursora. Opisana razlika između epidermalnih i ostalih L^C može biti posledica veće sličnosti ovih potonjih sa dermalnim Langerin⁺ DC⁺ (Holt i sar., 1994, Iijima i sar., 2007).

L^C se nakon znatnijih oštećenja tkiva nadoknađuju iz cirkulišućih prekursora, pre svega monocita. Merad i saradnici su na mišjem modelu pokazali da se repopulacija kože L^C posle UV zračenja odigrava na račun monocita mehanizmom zavisnim od CCR2 i da je direktno proporcionalna intenzitetu i dužini izlaganja kože UV zračenju (Merad i sar., 2002). Novije studije su definisale direktne *in vivo* prekursore L^C kao Gr-1^{jako+}CSF-1R⁺ monocite (Ginhoux i sar., 2006), ali i kao CD16⁺ monocite (Imhof i Aurrand-Lions, 2004).

Na modelu repopulacije mišjeg epidermisa nakon izlaganja difteričnom toksinu (Romani i sar., 2010) ili UV-C zračenju (Merad i sar., 2002) pokazano je da se obnavljanje populacije L^C odvija u dve faze (Sere i sar., 2012). L^C se u prvoj fazi repopulacije, koja započinje u toku prve nedelje po nastanku traume, brzo nadoknađuju od Gr⁺ monocita iz cirkulišuće krvi. Druga faza repopulacije nastupa tek nakon mesec dana po oštećenju epidermisa i traje barem tri meseca. Ćelije koje učestvuju u ovoj fazi su uglavnom kratkoživeći prekursori L^C (CD11b^{jako+}EpCAM^{slabo+}CD205^{slabo+}MHCII⁺Langerin⁻) koji se u lokalnoj mikrosredini postepeno transformišu u konvencionalne, dugoživeće L^C. Iako ove prekursorne ćelije eksprimiraju LysM molekul, što je karakteristično za ćelije koje pripadaju mijelo-monocitnoj lozi, nije potpuno jasno da li su one poreklom iz cirkulišuće krvi ili pripadaju populaciji rezidentnih prekursora L^C iz dermisa.

1.3. Prepoznavanje molekularnih obrazaca patogena od strane Langerhansovih ćelija

Tkivne DĆ su fenotipski i funkcionalno nezrele ćelije sa izraženim svojstvom prepoznavanja, internalizacije i proteolitičke obrade antigena. Poseduju visoko konzerviran sistem za prepoznavanje zajedničkih molekularnih struktura karakterističnih za patogene (eng. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) ili oštećena tkiva (eng. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP) koje se pojavljuju/oslobađaju u toku različitih patoloških procesa u organizmu (Merad i Manz, 2009). Ovaj receptorski sistem sastoji se od više klasa membranskih i citosolnih receptora za prepoznavanje PRR među kojima su najviše proučavani TLR i receptori koji pripadaju tipu C-lektina (CLR). Vezivanje PRR na DĆ za PAMP ili DAMP praćeno je internalizacijom i obradom ovih struktura, nakon čega njihovi peptidi bivaju predstavljeni T-limfocitima u sklopu MHC molekula, odnosno dovodi do pokretanja unutarćelijskih signala koji će povećati transkripciju gena uključenih u regulaciju inflamacijskih procesa. U spomenute genske produkte spadaju proinflamacijski citokini (TNF- α , IL-1 β , IL-6), interferoni I klase (IFN- α , IFN- β), hemokini, antimikrobne supstance, i proteini koji moduliraju aktivnost PRR. Osim prisustva patogena, za lokalnu aktivaciju DĆ je neophodan i proinflamacijski citokinski milje u kome dominira IFN- γ , a koji obezbeđuju ćelije urođene imunosti kao što su aktivirani tkivni makrofagi, urođene ubilačke (NK) ćelije i neutrofilii, privučene u tkivo iz cirkulacije pod uticajem patogena (Akira, 2006, Takeuchi i Akira, 2010). Uspostavljanje kontakta između DĆ i patogena u proinflamacijskom okruženju, ključni je događaj kojim se povezuju urođena i stećena imunost što će za posledicu imati eradikaciju patogena i nastanak imunološke memorije.

Koža i sluzokože čine imunološku barijeru prema spoljašnjoj sredini, zbog čega predstavljaju puteve ulaska većine patogena u organizam. Zahvaljujući tome što su od svih APC smeštene najpovršnije u ovim tkivima, LC prve dolaze u kontakt sa patogenima (Merad i sar., 2008). Pored toga, spomenuta tkiva su naseljena i komensalnim mikroorganizmima pa je neophodno da u njima postoji stroga kontrola između tolerogenosti i imunosti kako bi se očuvala homeostaza, budući da PRR ne razlikuju patogene od nepatogenih mikroorganizama. U prilog prethodnom govore

rezultati eksperimentalnih studija u kojima su LĆ poreklom iz kože (Flacher i sar., 2006) ili dobijene od monocitnih prekursora (Takeuchi i sar., 2003) stimulisane peptidoglikanima (PGN), PAMP-ovima karakterističnim za ćelijski zid Gram pozitivnih bakterija koje su agonisti TLR2/TLR6 (van Bergenhenegouwen i sar., 2013). Ove LĆ su osim povećane ekspresije markera maturacije, CD83, CD80 i CD86, snažnije sekretovale IL-10. Uspostavljanje imunske tolerancije na Gram-pozitivne komensalne bakterije na koži je dovedeno u vezu sa smanjenjem sposobnosti LĆ da indukuju Th1 imunski odgovor nakon stimulacije PGN, kao posledica snažnijeg autokrinog uticaja IL-10 (Re i Strominger, 2004). Navedena pretpostavka je u saglasnosti sa rezultatima studije koja je pokazala da TLR2^{-/-} miševi, za razliku od divljih sojeva, mogu spontano da razviju sistemske oblike infekcije *Staphylococcus aureusom* (Takeuchi i sar., 2000).

Ex vivo LĆ izolovane iz kože ne prepoznaju PAMP-ove poreklom od Gram negativnih bakterija i nekih virusa poput LPS, jednolančane RNK i oligonukleotida sa CpG motivima, budući da ne ekspimiraju TLR4, TLR7/8 i TLR9 (Flacher i sar., 2006). S druge strane, *in vivo* eksperiment je pokazao da mišje LĆ nakon intradermalnog ubrizgavanja imiquimoda i DNK sa nemetilovanim CpG dinukleotidima, agonista TLR7 i TLR9, stižu fenotipsku zrelost i sposobnost migracije u obližnje limfne čvorove (Ban i sar., 2000, Suzuki i sar., 2000). Objašnjenje za ove naizgled suprotstavljene nalaze bi trebalo potražiti u sastavu lokalnog proinflamacijskog miljea za koji je u *in vitro* eksperimentima pokazano da ga proizvode keratinociti, fibroblasti, makrofagi ili dermalne DĆ nakon stimulacije spomenutim agonistima (Berthier-Vergnes i sar., 2005, Flacher i sar., 2006). Izneti primeri ukazuju na to da pored direktnog kontakta sa antigenom, LĆ mogu biti aktivirane i indirektno putem proinflamacijskih medijatora koje sekretuju ćelije iz okolnog tkiva u odgovoru na antigene.

Polazeći od činjenice da PRR na DĆ omogućuju prepoznavanje stranih, a ne sopstvenih neizmenjenih struktura, kao i da su koža i sluzokože u stalnom kontaktu sa virusima i gljivicama, pokretanje protektivnog imunskog odgovora posredstvom TLR3 i Langerina ekspimiranih na LĆ je od ključne važnosti za održavanje homeostaze na nivou imunološke barijere organizma.

1.3.1. Ligacija TLR3

TLR3 pripada grupi PRR koji prepoznaju dvolančanu virusnu (ds)RNK unutar endozomalnih vezikula APC. Genetski materijal virusa prisutan unutar APC vodi poreklo od njihovih fagozoma ili internalizovanih apoptotskih telašaca inficiranih virusima (Jin i Lee, 2008). Ovaj materijal se po okončanju proteolitičke obrade uključuje u citoplazmatski ili endocitozni put prezentacije antigena T-limfocitima. Tačan mehanizam kojim će očuvani molekul dsRNK, a ne imunogeni fragmenti nastali njegovom enzimskom razgradnjom, dospeti do organela u kojima se nalaze TLR3 još uvek nije dovoljno razjašnjen. Poznato je da MoDC internalizuju dsRNK mehanizmom endocitoze posredovane klatrinom (Johnsen i sar., 2006), kao i da su TLR3 u MoDC smešteni isključivo intracelularno, unutar organela koje samo strukturno podsećaju na kasne endosome budući da u njima nije pokazana kolokalizacija ovih receptora sa MHC molekulima II klase (Matsumoto i sar., 2003). Jedna od teorija koja bi mogla da objasni ulazak intaktne dsRNK u ćeliju zasnovana je na hemijskoj sličnosti TLR3 i CD14 molekula (Choe i sar., 2005) i njihovoj kolokalizaciji unutar vezikula poreklom od endoplazmatskog retikuluma i Goldži kompleksa (Lee i sar., 2006). Kako je CD14 molekul, za razliku od TLR3, lokalizovan na površini ćelije, moguće je da upravo ovaj molekul ima funkciju da transportuje dsRNA i njene analoge do TLR3 gde će oni potom pokrenuti adekvatnu signalizaciju (Lee i sar., 2006).

TLR3 su transmembranski proteini koji se sastoje od ekstracitoplazmatskog, receptorskog dela bogatog sekvencama leucina koje se ponavljaju, transmembranskog dela i citoplazmatskog, signalnog regiona koji sadrži toll/interleukin-1 receptorski (TIR) domen (Jin i Lee, 2008). *Ex vivo* LC poreklom iz kože slabije ekspimiraju TLR3 od BDCA1⁺ mijeloidnih DC, ali mnogo snažnije od BDCA4⁺ plazmacitoidnih DC (Kadowaki i sar., 2001). Ovi receptori regrutuju adaptorske molekule koji poseduju TIR domen i indukuju IFN- β (eng. *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* , TRIF), a oni, potom, posredstvom drugih adaptorskih i signalnih molekula, konačno aktiviraju tri ključne grupe transkripcionih faktora, faktora koji regulišu interferone (eng. *Interferon Regulation Factors*, IRF), nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) i protein kinaze aktivirane

mitogenom (eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) od kojih zavisi maturacija DĆ i njihova sposobnost da produkuju IFN tipa I i proinflamacijske citokine (Gauzzi i sar., 2010). Produkcija IFN- β i ekspresija markera maturacije (HLA-DR, CD40, CD86 i CD80) direktno su uslovljene aktivnošću NF- κ B (Rescigno i sar., 1998, Yang i sar., 2003), dok je IRF3 odgovoran za sekreciju p35 subjedinice IL-12 (IL-12p35) (Goriely i sar., 2006).

Poliinozinska:policitidilinska kiselina (eng. *Polyinosinic:polycytidylic acid*, Poly(I:C)) je najčešće proučavani sintetski analog virusne dsRNK za koga je pokazano da dovodi do snažne maturacije nezrelih MoDĆ (povećava ekspresiju CD83, HLA-DR i CD86, i smanjuje pinocitozu) nakon čega ove ćelije imaju sposobnost da indukuju proliferaciju T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita, odnosno da usmere polarizaciju CD4⁺ T-limfocita u Th1 smeru (snažnije produkuju IL-12, a slabije IL-10, u poređenju sa nestimulisanim ćelijama) i da pokrenu citotoksičan odgovor CD8⁺ T-limfocita (Cella i sar., 1999, Verdijk i sar., 1999). MoDĆ pretretirane Poly(I:C) su nakon aktivacije CD40 molekula pokazale osobinu preusmeravanja Th1 imunskog odgovora u pravcu Th17 (Dragicevic i sar., 2011). Jačina odgovora mijeloidnih DĆ na Poly(I:C) je u direktnoj korelaciji sa nivoom ekspresije TLR3 receptora (Kadowaki i sar., 2001). Produkcija IL-12 od strane MoDĆ stimulisanih Poly(I:C) posledica je aktivacije p38 MAPK signalnog puta u prisustvu IFN tipa I (Bohnenkamp i sar., 2007).

MoDĆ stimulisane Poly(I:C) povećavaju ekspresiju MHC molekula II klase tako što inhibiraju njihovu degradaciju posredstvom MARCH-1 ligaze (Walseng i sar., 2010). Skorašnji eksperimenti na mišjim peritonealnim makrofagima ukazali su na interakciju MHC molekula II klase i TLR3 na nivou signalnih puteva. Signalni kompleks MHC II - CD40 u endozomima MoDĆ aktivira Btk tirozin kinazu koja direktno povećava aktivnost TRIF-zavisnog signalnog puta preko koga Poly(I:C) reguliše sintezu proinflamacijskih citokina i IFN tipa I (Liu i sar., 2011).

Fenotipske i funkcionalne posledice stimulacije humanih LĆ sa Poly(I:C) su dosad ispitivane na *ex vivo* LĆ poreklom iz kožnih režnjeva, kao i na LĆ poreklom od CD34⁺ stem ćelija iz krvi pupčanika *in vitro*. Za sada nema objavljenih rezultata o uticaju Poly(I:C) na LĆ dobijene *in vitro* od humanih monocita periferne krvi.

LĆ, izolovane enzimskom digestijom iz kože, su nakon stimulacije sa Poly(I:C) duže preživljavale, povećale ekspresiju kostimulacijskih molekula (CD40, CD80 i CD86), stekle snažniji potencijal alostimulacije i imale snažniju sposobnost da indukuju Th1 imunski odgovor, u poređenju sa nestimulisanim LĆ (Furio i sar., 2010). Iako se u supernatantu ove kulture LĆ nije detektovala produkcija IFN tipa I, inhibicija spomenutih efekata nakon blokade endocitoznog transporta upotrebom bafilomicina, ukazala je na to da se oni odigravaju posredstvom TLR3. LĆ su nakon stimulacije Poly(I:C) imale sposobnost da indukuju Th1 imunski odgovor premda nisu sekretovale p70 subjedinicu IL-12 (IL-12p70). Dodavanje blokirajućih antitela usmerenih protiv p40 subjedinice IL-12 (IL-12p40) u kulture ovih LĆ nije promenila njihovu sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora, što upućuje na postojanje nekog nepoznatog humoralnog ili kontaktnog faktora koji u ovom sistemu, slično IL-12p70, usmerava imunski odgovor u Th1 smeru. CD4⁺Th1 limfociti indukovani od strane LĆ stimulisanih Poly(I:C) su istovremeno produkovali IFN- γ i IL-10 (Furio i sar., 2010). Limfociti sa ovakvim profilom produkcije citokina sprečavali su prekomerna oštećenja zdravog tkiva *in vivo* u toku antimikrobnog i antivirusnog dejstva IFN- γ (Jankovic i sar., 2007).

Metodološki sličan eksperiment je potvrdio sve prethodno opisane fenotipske nalaze, a dodatno je pokazao da su *ex vivo* LĆ izolovane iz kože nakon stimulacije Poly(I:C) povećale ekspresiju DC-LAMP molekula, kao i produkciju TNF- α i IL-6, u poređenju sa nestimulisanim ćelijama (Flacher i sar., 2006).

Eksperimenti u kojima je analiziran uticaj Poly(I:C) na LĆ dobijenim *in vitro* od CD34⁺ stem ćelija pokazuju kontradiktorne rezultate, počevši od potpunog izostanka efekta ovog TLR agonista zbog neispoljavanja TLR3 na LĆ (Rozis i sar., 2008), pa sve do snažnije produkcije IL-12p40 i slabije produkcije TNF- α , CCL5 i CXCL10 od strane LĆ u poređenju sa MoDĆ (Renn i sar., 2006).

Studija Renn-a i saradnika pokazuje da su LĆ nakon stimulacije Poly(I:C) snažnije sekretovale CXCL9 i CXCL11, u poređenju sa MoDĆ (Renn i sar., 2006). LĆ su, za razliku od MoDĆ, produkovalе ove hemokine i nakon direktnog izlaganja virusima, što je potvrđeno na preparatima epidermisa inficiranog virusima vezikularnog stomatitisa (VSV) na kojima su molekuli CXCL9 i CXCL11

kolokalizovali sa CD1a molekulima ispoljenim na LĆ. Preinkubacija kulture fibroblasta sa supernatantom iz kulture Poly(I:C)-stimuliranih LĆ, značajno je smanjila infekciju ovih ćelija sa VSV, u odnosu na kontrolne, netretirane fibroblaste. S druge strane, spomenuti supernatant je imao slabiji citoprotektivni efekat na inficirane fibroblaste nakon što su u kulturu Poly(I:C)-stimuliranih LĆ dodata blokirajuća antitela usmerena protiv IFN- α/β receptora (Renn i sar., 2006). Od ranije je poznato da CXCL9 i CXCL11 imaju, slično defenzinima, zaštitnu ulogu u očuvanju integriteta imunoloških barijera u organizmu (Cole i sar., 2001). Ovi hemokini takođe privlače CD4⁺ Th1 limfocite i CTL koji ekspiriraju CXCR3 receptor i proizvode IFN- γ u inficirano područje (Colvin i sar., 2004, Farber, 1997). Proizvodnja spomenutih hemokina je indukovana u prisustvu IFN tipa I (Conzelmann, 2005).

1.3.2. Ligacija dectin-1/Langerin receptora

DĆ prepoznaju ugljenohidratne komponente (manozu, fukozu i β -glikan) u sastavu ćelijskog zida bakterija i gljivica pomoću DC-SIGN i dectin-1 receptora (Figdor i sar., 2002, Brown i sar., 2003, Taylor i sar., 2002). Izuzetak od ovog pravila predstavljaju LĆ, koje za razliku od drugih subpopulacija DĆ, interakciju sa ovim strukturama ostvaruju posredstvom Langerina (CD207).

Nezrele CD1a⁺ LĆ izolovane iz humanog epidermisa su pokazale visoku ekspresiju Langerina, niske nivoe dectin-1 i nisu ispoljile DC-SIGN receptor. Dodavanje blokirajućih anti-dectin-1 antitela nije uticalo na vezivanje β -glikana curdlana za LĆ u ovim kulturama, dok je prisustvo manoze ili blokirajućih anti-Langerin antitela, primenjenih pojedinačno ili u kombinaciji sa anti-dectin-1 antitelima, značajno inhibiralo njegovo vezivanje (de Jong i sar., 2010b). Aktivacija CD40 molekula na MoLĆ, slično signalu koji DĆ dobijaju *in vivo* od aktiviranih T-limfocita u limfnom čvoru, dovela je do nishodne regulacije Langerina i Birbekovih granula, i istovremeno povećala ekspresiju HLA-DR i CD86 molekula (Valladeau i sar., 1999). Razlog za prisustvo Langerin⁺ DĆ u limfnim čvorovima koji dreniraju hronično inflamirano područje kože mogao bi biti posledica razdvajanja procesa maturacije i migracije pod uticajem proinflamacijskih signala, poput TNF- α , koji

povećavaju ekspresiju Langerina na MoLĆ u sredini bogatoj TGF- β (Geissmann i sar., 2002).

Langerin, zajedno sa DC-SIGN i dectin-1 molekulom, pripada grupi Ca^{2+} - zavisnih lektinskih receptora II tipa, sastavljenih od jednog ekstraćelijskog domena na C-terminalnom kraju molekula (CRD) koji služi za prepoznavanje manoznih struktura u ćelijskom zidu bakterija i gljivica, transmembranskog fiksirajućeg segmenta i unutarćelijskog dela, bogatog ponavljajućim sekvencama prolina na N-terminalnom kraju preko koga se ostvaruje signalizacija (Valladeau i sar., 2000). Da bi Langerin mogao da veže oligosaharidne strukture veće od manoze neophodna je aglomeracija CRD segmenata tri susedna molekula Langerina (Valladeau i sar., 2003). Vezivanje glikoproteinskog ili glikolipidnog liganda za Langerin dovodi do interakcije prolinskih rezidua na njegovom N-terminalnom kraju sa src homolognim 3 domenom (eng. *src homology 3 domain*, SH3) adaptorskih proteina kao što su superfamilija Ras proteina, GTP-zavisni dinamin i aktin-vezujući protein koji su uključeni u pokrete citoskeleta i unutarćelijskih vezikula (Kay i sar., 2000, Valladeau i sar., 2000). Jedina, do sada, poznata posledica aktivacije ovih proteina jeste višestruko presavijanje ćelijske membrane koje vodi nastanku specifičnih, elektronskom mikroskopijom vidljivih, vezikula - Birbekovih granula (Valladeau i sar., 2000, Geijtenbeek i Gringhuis, 2009). Budući da internalizovani kompleks Langerin-glikoproteinski ligand u Birbekovim granulama ne kolokalizuje sa HLA-DR niti sa molekulima iz LAMP familije, pretpostavlja se da bi ove strukture mogle da imaju ulogu u alternativnom načinu prezentacije peptidnih antigena različitom od egzogenog i citosolnog puta. Birbekove granule bi u tom slučaju štatile ingestirane antigene od enzimske degradacije sve dok nezrele LĆ ne bi dobile adekvatne aktivacione signale za maturaciju i migraciju. Smanjenje ekspresije Langerina pod uticajem ovih signala moglo bi da pokrene obradu antigena u Birbekovim granulama koji bi nakon toga bili prezentovani T-limfocitima na neki od dva klasična načina (Valladeau i sar., 2003). Pokazana kolokalizacija Langerina i CD1a molekula u Birbekovim granulama ukazuje na ulogu LĆ i u prezentaciji glikolipidnih antigena T-limfocitima (Hunger i sar., 2004, Valladeau i sar., 2000). Osim što LĆ posredstvom CD4 i CXCR4 molekula predstavljaju početnu metu za virus HIV i glavni izvor infekcije memorijskih CD4^+ T-limfocita (Sugaya i sar., 2004), ove

ćelije mogu da imaju i protektivnu ulogu ukoliko se HIV-1 virion veže za Langerin, budući da nakon toga biva razgrađen u Birbekovim granulama (de Witte i sar., 2007).

Imunske posledice prepoznavanja β -glikana su uslovljene građom njegovog molekula, vrstom aktiviranog receptora kao i poreklom aktivirane ćelije. Molekuli β -glikana su polisaharidi izgrađeni od nepravilno razgranatog osovinskog lanca D-glikoznih monomera povezanih β -(1, 3) i β -(1, 6) glikozidnim vezama. Dosadašnje studije su pokazale da je za imunomodulacijsku aktivnost β -glikana potreban očuvan osovinski lanac, dok se o uticaju tipa i frekvencije grananja, odnosno fizičko-hemijskih karakteristika samog molekula i okolne sredine na njihovu efikasnost, još uvek ne zna dovoljno. Neki od najčešćih izvora β -(1, 3) glikana koji se koriste u eksperimentalne svrhe jesu kvasnice (*Saccharomyces cerevisiae*) i bakterije (curdlan izolovan iz *Alcaligenes faecalis*) (Goodridge i sar., 2009, McIntosh i sar., 2005).

U *in vitro* eksperimentima na humanim MoDC je pokazano da curdlan putem dectin-1 receptora dovodi do fenotipskog sazrevanja ovih ćelija što je praćeno povećanjem ekspresije HLA-DR, CD86, CD40 i CD83 molekula, nakon čega su MoDC i pored niske produkcije IL-12p70 i IL-23, stekle sposobnost da indukuju Th1 i Th17 imunski odgovor (Dragicevic i sar., 2012). Do sada nije bilo objavljenih podataka o efektima koje curdlan preko Langerina ima na modulaciju funkcije LC, kako onih izolovanih *ex vivo*, tako ni MoLC.

1.4. Migracijske karakteristike Langerhansovih ćelija

Nakon izlaganja LC sopstvenim ili stranim antigenima dolazi do slabljenja njihovih međućelijskih veza sa okolnim keratinocitima zbog čega one počinju da migriraju iz epidermisa. Od ispitivanih citokina prisutnih u lokalnoj mikrosredini najvažniju ulogu u započinjanju njihove migracije imaju IL-1 β i TNF- α . LC sekretuju IL-1 β pomoću koga indukuju produkciju TNF- α od strane keratinocita. Pod zajedničkim uticajem TNF- α i autokrinog dejstva IL-1 β , na LC se smanjuje ekspresija E-kadherina i CCR6 molekula zbog čega su one slabije osetljive na CCL20 hemokin (MIP3 α) kojeg produkuju okolni keratinociti, a samim tim i slabije

međusobno povezane (Randolph i sar., 2005). Pokazano je, takođe, da TNF- α putem preuređenja aktinskog dela citoskeleta DĆ, koje obuhvata depolimerizaciju F-aktina i inhibiciju sinteze adaptornog proteina vinkulina, povećava pokretljivost DĆ nakon slabljenja fokalnih adhezivnih plakova između aktinskih i integrinskih molekula (Winzler i sar., 1997). Sa povećanjem ekspresije molekula integrina na LĆ, pre svega $\alpha\beta1$, migracija ovih ćelija se usmerava prema bazalnoj membrani bogatoj lamininom (Villablanca i sar., 2008, Randolph i sar., 2005).

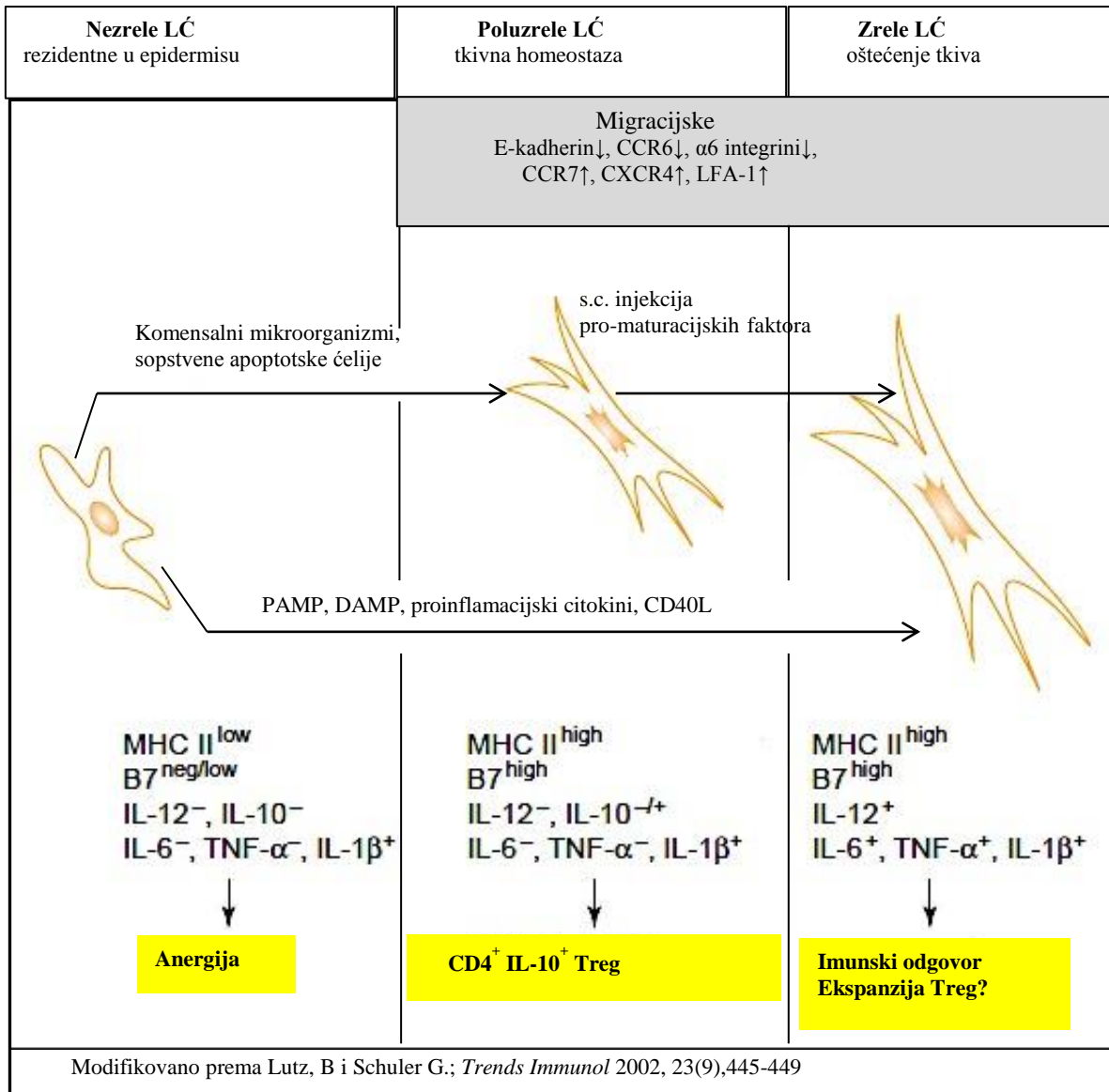
LĆ započinju epidermo-dermalnu migraciju nakon povećanja ekspresije CXCR4 receptora pod uticajem proinflamacijskog miljea u epidermisu. Njih u dermis privlači povećana sinteza CXCL12 od strane dermalnih fibroblasta pod uplivom TNF- α (Villablanca i Mora, 2008, Ouwehand i sar., 2008). Sličan način prelaska DĆ u subepitelno vezivno tkivo posredovan hemokinskim receptorom i njegovim ligandom pokazan je i na LĆ u bronhijalnom epitelu gde se ova migracija odigrava putem CCR5-CCL5 (RANTES) molekula (Grayson i sar., 2007). Ekspresija LFA-1 na kožnim DĆ omogućuje njihov dalji prelaz iz dermisa u obližnje limfne čvorove preko endotelnih ćelija aferentnih limfatičnih sudova, koje ispoljavaju ICAM-1 (CD54) (Randolph i sar., 2005).

Ipak, smatra se da je zapravo CCR7 ključni molekul koji je odgovoran za migraciju DĆ prema T-zavisnim zonama drenirajućih limfnih čvorova u tkivima poput kože, pluća i creva, koja se nalaze u stalnom kontaktu sa spoljašnjom sredinom. Eksperimenti na CCR7^{-/-} miševima i eksplantima humane kože pokazuju da u ovom procesu ključnu ulogu imaju hemokini, CCL19 i CCL21, koje proizvode endotelne ćelije u limfnim sudovima i regionalnim limfnim čvorovima (Ohl i sar., 2004).

Ono što je LĆ izdvojilo u odnosu na druge DĆ subpopulacije, kada je u pitanju migracija u limfno tkivo, jeste pretpostavljeni model „dvofaznog“ napuštanja epidermisa koji se poklapa sa povećanjem ekspresije CXCR4 i CCR7 (Villablanca i Mora, 2008). Eksperimenti sa kontaktnim alergenima u koži su pokazali da se povećanje ekspresije CXCR4 receptora odigralo tokom 24h nakon izlaganja ovim supstancama, dok je CCR7 dostigao maksimum ekspresije oko 48h kasnije. Uočena razlika u vremenu ispoljavanja pomenutih markera omogućila bi LĆ dodatnu

integraciju signala opasnosti kao i potencijalno prenošenje antigena rezidentnim, dermalnim DC na dalju obradu (Ouwehand i sar., 2008). Jedan od pomenutih signala je i PGE₂ za koji je odranije poznato da ne samo što ima snažno dejstvo na povećanje ekspresije CCR7 molekula na DC putem EP2 i EP4 receptora, već da u *transwell* sistemu (u kome je onemogućena direktna međucelijska komunikacija, a omogućen prolaz solubilnih medijatora) povećava i intenzitet migracije MoDC (Scandella i sar., 2002).

Fenotipska i funkcionalna analiza LC u limfnim čvorovima zdrave i inflamirane humane i mišje kože je pokazala da sposobnost ovih ćelija da migriraju nije isključivo povezana sa njihovom zrelošću (Geissmann i sar., 2002, Stoitzner i sar., 2005). U limfnim čvorovima zdrave kože među LC dominiraju one koje po svojim osobinama podsećaju na rezidentne LC nešto zrelijeg fenotipa („poluzrele LC“) dok su u limfnim čvorovima inflamirane kože uglavnom prisutne zrele LC. Unutar poluzrelih LC koje su spontano migrirale ka obližnjim limfnim čvorovima u odsustvu inflamacije dokazano je prisustvo obrađenih tkivnih antigena (Hemmi i sar., 2001, Huang i sar., 2000), što uz snažnu ekspresiju HLA-DR, CD40, CD86 i CD80 molekula na ovim ćelijama (Geissmann i sar., 1998, Lutz i Schuler, 2002), kao i slabu sposobnost produkcije IL-12 i niza drugih proinflamacijskih citokina (Lutz i Schuler, 2002, Menges i sar., 2002) ukazuje na njihov potencijal indukcije Treg u limfnom čvoru *in vivo*. Za razliku od poluzrelih LC, zrele LC su nakon uspostavljanja kontakta sa T-limfocitima putem CD40:CD40L interakcije dodatno povećale ekspresiju kostimulacijskih molekula i proinflamacijskih citokina do nivoa koji pokreće uspostavljanje stečenog imunskog odgovora (*Slika 2*).



Slika 2. Uticaj maturacijskog statusa LČ na indukciju tolerogenosti i imunosti

U *in vitro* eksperimentalnom modelu je pokazano da je TGF-β smanjio fenotipsko i funkcionalno sazrevanje MoLČ u prisustvu TNF-α tako što je snizio ekspresiju TNFRI, ali i da nije imao uticaja na ekspresiju CCR7 niti na njihovo sazrevanje pod uticajem CD40L (Geissmann i sar., 1999). Ovakav efekat TGF-β bi trebalo da spreči svaku nekontrolisanu maturaciju LČ u uslovima homeostaze pod uticajem nespecifičnih proinflamacijskih signala prisutnih u epitelima, budući da je TGF-β prisutan u visokoj koncentraciji u intaktnoj koži i sluzokožama (Li i sar., 2006).

1.5. Sposobnost antigenske prezentacije i pokretanje stečenog imunskog odgovora od strane Langerhansovih ćelija

1.5.1. Antigenska prezentacija CD4⁺ T-limfocitima

Dendritske ćelije, B-limfociti i monociti/makrofagi pripadaju tzv. profesionalnim APC koje eksprimiraju peptide nastale degradacijom ekstracelularnih antigena u sklopu MHC molekula II klase radi prezentacije antigen-specifičnim CD4⁺ T-limfocitima. Kada T-ćelijski receptor na naivnom, CD4⁺ T-limfocitu (Th0) prepozna kompleks peptid / MHC molekul II klase, uspostavlja se imunološka sinapsa između ovih ćelija koja dovodi do aktivacije i proliferacije limfocita. U zavisnosti od porekla prezentovanog peptida, karakteristika interakcije između kostimulacijskih molekula u sastavu imunološke sinapse i produkcije polarizacijskih citokina od strane APC, dolazi do diferencijacije aktivisanih, naivnih CD4⁺ T-limfocita u različite efektorske podtipove limfocita (Th1, Th2, Th17 i Treg) i do aktivacije već uspostavljenih memorijskih limfocita, kako bi se organizam oslobodio od uzročnika infekcije na što adekvatniji način (Banchereau i Steinman, 1998, Banchereau i sar., 2000).

LĆ snažnije stimulišu proliferaciju alogениh CD4⁺ T-limfocita u poređenju sa CD14⁺ DC, nezavisno od toga da li su dobijene *in vitro* od CD34⁺ progenitorskih ćelija iz pupčane vrpce ili su izolovane nakon enzimske digestije iz kožnog eksplantata. Iako su ove LĆ značajno indukovale sekreciju IL-2, IL-10 i IFN- γ u kokulturi sa naivnim alogениm CD4⁺ T-limfocitima, dominantna produkcija IL-4, IL-5 i IL-13 ukazuje da one ipak prevashodno usmeravaju imunski odgovor u Th2 smeru (Klechevsky i sar., 2008). Snažniji alostimulacijski kapacitet LĆ poreklom iz kože u poređenju sa CD14⁺DC mogao je da bude posledica slabije ekspresije PDL-1 (eng. *Programmed Death Ligand-1*) i jače ispoljenosti ICOS-L (eng. *Inducible Costimulator Ligand*) (Furio i sar., 2010).

CCR7⁺ LĆ su jedina subpopulacija DC u koži koja je mogla da indukuje Th17 imunski odgovor u kontaktu sa alogениm CD4⁺ T-limfocitima *in vitro*, zahvaljujući produkciji IL-15, IL-6 i TGF- β (Mathers i sar., 2009). Ove LĆ su,

takođe, pokazale sposobnost da indukuju i IL-22⁺ IL-17⁻ CD4⁺ T-limfocite, odnosno IL-22⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-limfocite, ali samo ukoliko nisu bile izolovane iz kožnih reznjeva pomoću enzimске digestije, već nakon spontane migracije, i ako u medijumu za kultivaciju nije bilo telećeg seruma (Fujita i sar., 2009). IL-22 uglavnom produkuju CD4⁺ T-limfociti i NK ćelije u koži, crevima i plućima, gde on ispoljava protektivnu ulogu u očuvanju integriteta njihovih epitelnih barijera tako što stimuliše produkciju β -defensina od strane epitelnih ćelija i fibroblasta. Ovaj citokin je odgovoran i za podsticanje proliferacije keratinocita kod obolelih od atopijskog dermatitisa i psorijaze (Zheng i sar., 2008). Skorašnje studije su potvrdile da se populacija Th22 limfocita sastoji od memorijskih CD4⁺ T-limfocita usmerenih ka koži i sluzokožama, koji ekspimiraju CCR4, CCR6 i CCR10 receptore, i da su za njihovu indukciju neophodni IL-6 i TNF- α (Duhon i sar., 2009, Trifari i sar., 2009).

Nedavno je pokazano da najveći deo populacije T-limfocita u koži odrasle osobe sačinjavaju memorijski T-limfociti (CD45RO⁺CLA⁺CCR4⁺) (Clark i sar., 2006). Mnoge od ovih ćelija su zapravo rezidentne u koži, ne recirkulišu i imaju ulogu u uspostavljanju i održavanju lokalne imunosti (Clark i sar., 2012). Nakon *in vitro* kultivacije sa autolognim rezidentnim CD4⁺ T-limfocitima, LĆ dobijene *ex vivo* iz kože su indukovale aktivaciju i proliferaciju samo subpopulacije memorijskih Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻). Dodatak toplotom inaktivisanih konidija *Candida albicans* u ovu kokulturu, doveo je do dozno-zavisne inhibicije proliferacije Treg, odnosno snažnije proliferacije memorijskih IFN- γ ⁺ IL-17⁺ CD4⁺ T-limfocita. Pokazani rezultati su ukazali na sposobnost kožnih LĆ da u odsustvu infekcije indukuju imunsku toleranciju na sopstvene antigene, kao i da u slučaju nastanka inflamacije pokrenu lokalni efektorski imunski odgovor koji ne uključuje migraciju u limfno tkivo (Seneschal i sar., 2012).

Kožne LĆ su indukovale produkciju IFN- γ u kokulturi sa alognim CD4⁺ T-limfocitima nakon *in vitro* inkubacije sa virusima rubeole koji su bili inaktivisani UV zračenjem (van der Vlist i sar., 2011). Kako u ovoj studiji nije analiziran profil produkcije drugih Th-polarizacijskih citokina, nije bilo moguće zaključiti da li su ove LĆ zapravo sposobne da indukuju Th1 imunski odgovor.

1.5.2. Antigenska prezentacija CD8⁺ T-limfocitima

Sve nukleisane ćelije eksprimiraju sopstvene peptide CD8⁺ T-limfocitima u kompleksu sa MHC molekulima I klase čime se održava tolerancija prema vlastitim antigenima. Kada se u kompleksu sa MHC molekulima I klase na površini fenotipski i funkcionalno zrele APĆ ispolje sopstveni izmenjeni ili strani peptidi, nakon kontakta sa CD8⁺ T-limfocitima pokrenuće se odgovor posredovan CTL. Unakrsna prezentacija predstavlja sposobnost APĆ da putem MHC molekula I klase predstave CD8⁺ T-limfocitima peptide poreklom od ekstraćelijskih antigena. (Banchereau i sar., 2000, Joffre i sar., 2012).

Igyarto i saradnici su sva istraživanja u vezi sa sposobnošću LĆ da prezentuju antigene CD8⁺ T-limfocitima podelili u 3 osnovne grupe. Prva grupa studija urađena je na *in vitro* dobijenim ili *ex vivo* izolovanim LĆ, koje su nakon izlaganja antigenima bile kokultivisane sa transgenim CD8⁺ T-limfocitima. Druga grupa studija obuhvatila je eksperimente sa LĆ koje su *in vivo* bile izložene antigenu, a nakon *ex vivo* izolacije su bile kokultivisane sa CD8⁺ T-limfocitima. Treća grupa studija pokazala je uticaj koji su LĆ, nakon *in vivo* izlaganja antigenu, imale na CD8⁺ T-limfocite, takođe *in vivo*. Prve dve grupe studija su potvrdile sposobnost LĆ da unakrsno prezentuju antigene, dok treća grupa nije, što bi moglo biti posledica metodoloških poteškoća u njihovom izvođenju (Igyarto i Kaplan, 2013).

Humane CD1a⁺CD14⁻CD207⁺ LĆ dobijene *in vitro* od CD34⁺ progenitorskih ćelija poreklom iz pupčane vrpce ili izolovane enzimskom digestijom iz kožnih eksplanata, pokazale su sposobnost da indukuju proliferaciju antigen specifičnih CD8⁺ T-limfocita, čija su citotoksičnost i sposobnost da produkuju IFN- γ , takođe, naknadno dokazane *in vitro*. Pre inkubacije sa CD8⁺ T-limfocitima, LĆ su inkubirane sa MART-1 i gp100 proteinima, specifičnim za melanom. Sposobnost unakrsne prezentacije ovih LĆ je bila izraženija u poređenju sa CD1⁻CD14⁺CD207⁻ dermalnim DĆ (Klechevsky i sar., 2008). Navedena osobina kožnih LĆ je pokazana i u metodološki sličnom eksperimentu na miševima gde je kao antigen korišćen ovalbuminski peptid primenjen epikutano (Stoitzner i sar., 2006).

Neke od skorašnjih studija su dovele u sumnju sposobnost LĆ da unakrsno prezentuju antigene. LĆ izolovane iz eksplantata humane kože nisu pokazale osobinu unakrsne prezentacije nakon Langerinom-posredovane ingestije apoptotskih tela inficiranih virusima rubeole koji su prethodno inaktivisani UV zračenjem (van der Vlist i sar., 2011). U humanom epidermisu je opisana subpopulacija CD141^{jako+}CD1c^{umereno+}CD14⁻CD207⁻ DĆ koja je ispoljavala snažniju sposobnost unakrsne prezentacije HBsAg u poređenju sa LĆ. Ova sposobnost nije zavisila od maturacijskog statusa DĆ (Haniffa i sar., 2012).

Prethodni primeri su pokazali da ključnu važnost u unakrsnoj prezentaciji antigena od strane LĆ imaju površinski receptori na ovim ćelijama preko kojih se odigrava njegova internalizacija. Na primer, humane LĆ, bez obzira na poreklo, pokazale su sposobnost unakrsne prezentacije proteina matriksa virusa influence (FluMP) tek nakon što je on usmeren na dendritski imunoreceptor (DCIR) u obliku anti-DCIR-FluMP konjugata koji omogućuje njegovo preuzimanje (Klechevsky i sar., 2010). Jedna od potencijalnih uloga LĆ u terapiji ogledala bi se u efikasnoj unakrsnoj prezentaciji antigena prisutnih u vakcinama protiv različitih infektivnih patogena ili malignih tumora koje se aplikuju preko kože, i zavisila bi, pre svega, od izbora pravog načina za njegovo dopremanje, tj. internalizaciju.

1.6. Posledice ligacije CD40 molekula na Langerhansovim ćelijama na ćelijski imunski odgovor

Signalizacija preko CD40 receptora na površini DĆ nakon vezivanja CD40 liganda (CD40L/CD154) eksprimiranog na aktivisanim T-limfocitima, dovodi do produženog preživljavanja DĆ, povećanja ekspresije kostimulacijskih (CD86, CD80) i adhezivnih molekula (CD54), kao i povećane produkcije citokina od strane DĆ neophodnih za usmeravanje Th imunskog odgovora CD4⁺ T-limfocita ili efektorsku aktivnost CD8⁺ T-limfocita. Od ranije je poznato da je upravo aktivacija CD40 receptora na DĆ ključni signal, nakon koga, nezavisno od dotadašnjeg stupnja maturacije, one postaju potpuno efikasne APC (Ma i Clark, 2009).

Studija u kojoj su upoređivani fenotip i funkcionalne karakteristike nezrelih MoLĆ i LĆ izolovanih iz kože pokazala je da ove ćelije imaju sličnu ekspresiju CD40 molekula (Peiser i sar., 2004). Nakon stimulacije agonistima TLR2, 4 i 5 (bakterijski peptidoglikan, LPS i flagelin) i kokultivacije sa transvektovanim mišjim L ćelijama koje ekspimiraju humani CD40L, obe vrste ćelija su povećale ekspresiju HLA-DR, CD83 i CD86, dok su samo MoLĆ povećale ekspresiju CD80. MoLĆ su, takođe, snažnije produkovale IL-12 i IL-10, dok su LĆ povećale produkciju IL-10 i nisu izmenile sekreciju IL-12. Oba tipa LĆ nakon izlaganja signalima opasnosti i dodavanja solubilnog CD40L ispoljile su snažniju sposobnost alostimulacije i indukcije Th1 imunskog odgovora (Peiser i sar., 2004).

Osim imunostimulacijskog potencijala LĆ, na animalnom modelu je opisana i njihova specifična imunoregulacijska funkcija zavisna od CD40 molekula kojom LĆ suprimiraju autoreaktivne ili preterano aktivne T-limfocite aktivacijom indukovane ćelijske smrti (eng. *Activation-induced cell death*, AICD). Mišje LĆ *ex vivo* izolovane iz kože su samo nakon *in vitro* tretmana stimulatornim anti-CD40 antitelom ekspimirale FasL (CD95L), ali ne i nakon izlaganja proinflamacijskim stimulusima poput LPS-a ili IFN- γ , što bi ukazivalo na to da je ekspresija FasL na LĆ moguća tek nakon CD40:CD40L interakcije sa aktivisanim T-limfocitima (Shibaki i Katz, 2001).

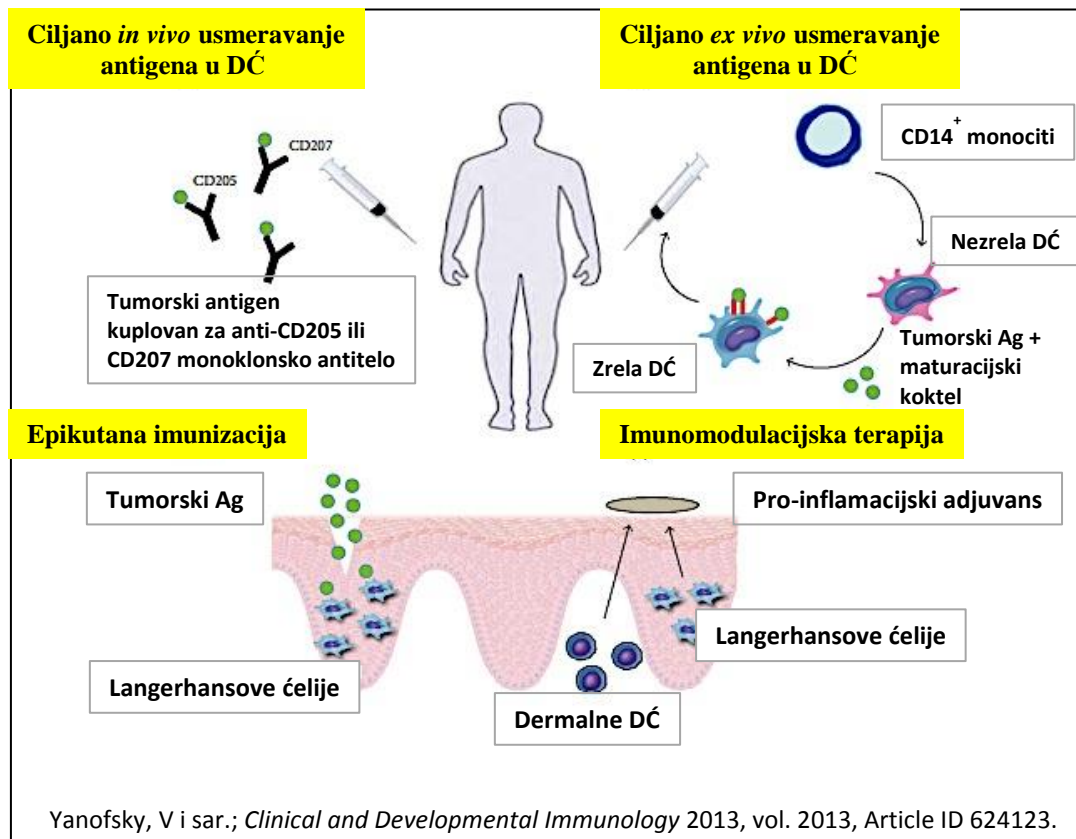
Ono što LĆ razlikuje od drugih subpopulacija DĆ jeste činjenica da one nakon interakcije sa T-limfocitima mogu ekspimirati i Fas receptor (CD95) ali samo u prisustvu dovoljne koncentracije IFN- γ . LĆ su rezistentne na apoptozu posredovanu mehanizmom AICD sve dok se nakon uspostavljanja kontakta sa naivnim CD4⁺ T-limfocitima ne razvije nekontrolisani Th1 imunski odgovor praćen prekomernom produkcijom IFN- γ i povećanom ekspresijom CD95 na LĆ (Kawamura i sar., 1999). Kao mogući razlog ove privremene otpornosti LĆ na AICD navodi se povećanje sinteze antiapoptotskih molekula Bcl-2 i Bcl-xL opisano na DĆ poreklom od CD34⁺ progenitorske ćelije nakon ligacije CD40 molekula (Bjorek i sar., 1997).

Na primeru tolerogenih LĆ je pokazano da ligacija CD40 molekula ne utiče na njihovu sposobnost da aktiviraju T-limfocite. Mišje *ex vivo* izolovane LĆ su

nakon stimulacije niskim dozama agonista TLR2 i TLR4 (peptidoglikan i LPS) stekle nezreo fenotip koji se karakteriše niskom ekspresijom CD40, CD80 i CD86 molekula i niskom produkcijom IL-6. Nakon aktivacije CD40 molekula ove ćelije nisu izmenile ekspresiju kostimulacijskih molekula, ali su povećale produkciju IL-6 i IL-12p40, smanjile ekspresiju CCR7 molekula i sposobnost migracije u smeru hemokina CCL19 i CCL21 i inhibirale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita (Hegde i sar., 2004, Gerlach i sar., 2012). Nabrojani efekti su posledica izostanka fosforilacije MAPKp38 pod uticajem CD40L (Gerlach i sar., 2012). DĆ nezrelog fenotipa koje proizvode IL-6 pokazale su sposobnost da usmere Th imunski odgovor CD4⁺ T-limfocita u Th2 smeru putem dva nezavisna mehanizma. Snažnija sekrecija IL-6 u odsustvu sinteze TNF- α i bioaktivnog IL-12p70 povećala je ekspresiju NFAT transkripcionog faktora (eng. *Nuclear Factor of Activated T-cells*) koji je potom indukovao povećanje produkcije IL-4 ili povećao ekspresiju SOCS (eng. *Silencer of Cytokine Signaling*) u CD4⁺ T-limfocitima čime je inhibirao produkciju IFN- γ (Diehl i Rincon, 2002).

1.7. Značaj Langerhansovih ćelija u prevenciji i terapiji bolesti

Modeli za terapiju kožnih tumora (melanom, spinocelularni karcinom) i prevenciju obolevanja od infektivnih bolesti (HIV, kolera, tetanus, bakterijski enterokolitis) bazirani na DĆ kože mogu se metodološki podeliti na *in vivo* imunizaciju specifičnim antigenima i *ex vivo* vakcinaciju DĆ (Romani i sar., 2010) (*Slika 3*).



Slika 3. Imunska terapija kožnih maligniteta pomoću DĆ

Imunizacija se izvodi ubrizgavanjem antigena u kožu (intrakutana) ili topikalnim nanošenjem na skarifikovanu kožu nakon uklanjanja stratuma corneuma (epikutana). Pokazano je da epidermalne LĆ indukuju snažniji odgovor CTL u poređenju sa IDDC u *in vitro* uslovima (Klechevsky i sar., 2008, Ratzinger i sar., 2004).

Efikasnost intrakutane imunizacije se povećava kuplovanjem antigena za antitelo (fuzioni proteinski kompleks) koje prepoznaje neki receptor na DĆ, najčešće iz grupe C-lektina. Na ovaj način se može ciljano povećati preuzimanje antigena od strane DĆ i time potencijalno unaprediti ovaj vid vakcinacije (Steinman, 2008, Caminschi i sar., 2009). Kožne DĆ koje su *in vivo* ili *in vitro* preuzele fuzione proteinske komplekse preko DEC-205/CD205 molekula indukuju znatno jači ćelijski i humoralni imunski odgovor u poređenju sa DĆ koje su kultivisane u prisustvu iste koncentracije nekonjugovanog proteinskog antigena (Flacher i sar., 2009, Bonifaz i sar., 2004, Boscardin i sar., 2006, Bozzacco i sar., 2007). Sličan efekat se dobija i

nakon ciljanog preuzimanja antigena putem Langerina eksprimiranog na LC i dermalnim Langerin⁺ DC (Flacher i sar., 2010).

Epikutana imunizacija je uveliko našla praktičnu primenu u prevenciji infektivnih bolesti. Nakon što je pokazano da miševi ne obolevaju od kolere, tetanusa i toksičnog enterokolitisa ukoliko su prethodno bili epikutano izloženi njihovim toksinima (Glenn i sar., 1998, Beignon i sar., 2001) nije proteklo puno vremena pre nego što su na tržištu postale dostupne komercijalne humane vakcine protiv putničke dijareje i gripa (Frech i sar., 2008, Vogt i sar., 2008). Ove vakcine se aplikuju pomoću flastera koji sadrži termički inaktivisan enterotoksin *Escherichie coli* ili imunogene proteine virusa influence. Na primeru vakcine protiv gripa je pokazano da nema značajne razlike u indukciji produkcije IFN- γ od strane aktivisanih CD4⁺ T-limfocita nakon epikutane vakcinacije, u poređenju sa intramuskularnom vakcinom, dok se citotoksični odgovor CD8⁺ T-limfocita detektovao samo prilikom epikutanog pristupa (Vogt i sar., 2008).

Studija u kojoj je praćen efekat transkutane aplikacije živog virusa HIV-a na indukciju CTL odgovora miša sistemski i lokalno (mukozno) ukazuje na značajne sistemske efekte ovakvog načina aplikacije antigena (Belyakov i sar., 2004). Analizom kokulture i fenotipa T-limfocita i LC iz Pajerovih ploča pokazano je da LC nakon fagocitoze virusa migriraju, ne samo u obližnje limfne čvorove, već i u crevnu mukozu gde aktiviraju rezidentne CD8⁺ T-limfocite.

Danas se sve više radi na razvijanju metoda imunske terapije za ponovno uspostavljanje anti-tumorskog odgovora među kojima važno mesto zauzimaju DC vakcine. Opšti princip na kome počivaju DC vakcine podrazumeva izolaciju DC prekursora iz kostne srži ili krvi, stimulaciju diferencijacije ovih ćelija *in vitro*, izlaganje tumorskim antigenima pacijenta, indukciju maturacije i *in vivo* aplikaciju autologih i imunogenih DC obolelom (Janikashvili i sar., 2010, Sabado i Bhardwaj, 2010).

DC koje se koriste za pripremanje *ex vivo* anti-tumorskih i anti-infektivnih vakcina treba da imaju snažnu i stabilnu produkciju IL-12p70, da nakon unakrsne prezentacije antigena T-limfocitima usmere naivne CD4⁺ T-limfocite u Th1 smeru i

aktiviraju naivne CD8⁺ T-limfocite u specifične CTL, i da mogu da pokrenu adekvatne memorijske imunske odgovore (Sabado i Bhardwaj, 2010). Kako je kod obolelih od tumora efektorski imunski sistem suprimiran, između ostalog, i zbog smanjenja ekspresije kostimulacijskih molekula na DĆ pod uticajem tumorske mikrosredine nakon čega one postaju tolerogene prema tumorskim antigenima, sposobnost DĆ da indukuju Th2 imunski odgovor uglavnom nije poželjna u vakcinama (Grunig i sar., 2005). Uloga Th17 imunskog odgovora u anti-tumorskoj imunosti je još uvek kontradiktorna (Kryczek i sar., 2009).

Nakon razvoja *in vitro* metoda za produkciju velikog broja DĆ, kao i povoljnih rezultata primene DĆ vakcina na animalnim modelima tumora (Muranski i sar., 2008, Pajtasz-Piasecka i sar., 2008, Sin i sar., 2006), stekli su se uslovi za njihovu upotrebu u terapiji malignih tumora kod ljudi. Neki od maturacijskih protokola za dobijanje humanih DĆ vakcina protiv karcinoma cerviksa uterusa, melanoma i karcinoma prostate već su u fazi kliničkih studija i daju ohrabrujuće rezultate (Trakatelli i sar., 2006, Frank i sar., 2010, Adams i sar., 2003). Prednost ove vrste terapije u odnosu na klasične metode, pre svega zračenje i hemioterapiju, proističe iz njenog specifičnijeg efekta na ciljno tkivo uz istovremeno minimalna oštećenja zdravog tkiva.

LĆ još nisu testirane kao antitumorske vakcine. Razlog za to treba tražiti u činjenici da je tek nedavno dokazano sa sigurnošću da LĆ mogu da vrše unakrsnu prezentaciju antigena (Romani i sar., 2010, Stoitzner i sar., 2006, Klechevsky i sar., 2008), kao i zbog nedovoljno proučenih protokola za njihovo sazrevanje. Nalaz jedne od prvih studija da LĆ dobijene od CD34⁺ prekursora iz kostne srži nakon izlaganja antigenima melanoma snažnije aktiviraju specifične CTL u poređenju sa DĆ CD14⁺-monocitnog porekla, pozitivan je korak u smeru daljeg ispitivanja anti-tumorskih efekata LĆ (Romano i sar., 2011).

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Radne hipoteze:

1. Sposobnost polarizacije imunskog odgovora CD4⁺ T-limfocita od strane MoLĆ zavisi od:

- vrste faktora koji indukuju maturaciju MoLĆ;
- pojedinačne ili kombinovane primene faktora maturacije;
- vremenskog perioda izlaganja ćelija faktorima maturacije;
- dodatne ligacije CD40 molekula.

2. Razlike u potencijalu MoLĆ i MoDĆ da indukuju polarizaciju imunskog odgovora CD4⁺ T-limfocita u prisustvu istih stimulatora ili njihove kombinacije su posledica:

- različite ekspresije markera maturacije i kostimulacijskih molekula na ovim populacijama;
- produkcije citokina sa različitim proinflamacijskim, imunogenim ili tolerogenim svojstvima od strane DĆ;
- različite osetljivosti DĆ na ligaciju CD40 molekula.

Za proveru hipoteza postavljeni su sledeći ***ciljevi istraživanja***:

1. Ispitati i uporediti efekat koktela proinflamacijskih medijatora (IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂) na sazrevanje, produkciju citokina, alostimulacijsku i Th polarizacijsku sposobnost humanih MoLĆ i MoDĆ;

2. Ispitati i uporediti efekat pojedinačne i kombinovane primene agonista TLR3 (Poly(I:C)) i dectina-1/Langerina (curdlan) na sazrevanje, produkciju citokina, alostimulacijsku i Th polarizacijsku sposobnost humanih MoLĆ i MoDĆ;

3. Ispitati uticaj ligacije CD40 molekula na sazrevanje, produkciju citokina, alostimulacijsku i Th polarizacijsku aktivnost humanih MoLĆ i MoDĆ i uporediti ove efekte;

4. Ispitati i uporediti procese sazrevanja, produkcije citokina, aloreaktivnost i Th polarizacijske sposobnosti MoLĆ i MoDĆ nakon kombinovane stimulacije ovih ćelija Poly(I:C), curdlanom i sCD40L.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Medijumi, hemikalije i ostale supstance

3.1.1. Medijumi i puferi

3.1.1.1. RPMI 1640

Za izolaciju i kultivisanje ćelija, kao osnovni medijum, korišćen je RPMI 1640 medijum (ICN Flow, SAD) sa 1% L-glutamina (ICN Flow, SAD), 1% gentamicina (ICN-Galenika, Srbija) i 7.5% NaHCO₃ (Apoteka VMA, Srbija) kao pufer.

Mononuklearne ćelije periferne krvi (MNC) su izolovane sa osnovnim medijumom uz dodatak 0.02% NaEDTA (Apoteka VMA, Srbija).

MNC su ispirane pomoću osnovnog medijuma kome je dodato 2% fetalnog telećeg seruma (eng. *Fetal calf serum*, FCS, ICN Flow, SAD).

Za kultivaciju ćelija je korišćen kompletni medijum koji predstavlja osnovni medijum u koji je dodato 10% FCS, 50µM 2-merkaptoetanol (2-ME), 50 i.j/ml penicilina i 50 mg/ml streptomocina (0.1% penicilina i streptomocina).

3.1.1.2. PBS

Fiziološki rastvor puferovan fosfatnim puferom (eng. *Phosphate-buffered saline*, PBS) je napravljen po sledećoj recepturi: 14 ml 0.2M NaH₂PO₄ (Serva, Nemačka) + 36 ml 0.2M Na₂HPO₄ (Serva, Nemačka) + 50 ml 16% NaCl (Zorka, Srbija), sve rastvoreno u 900 ml destilovane vode.

Modifikovani puferi za pripremu ćelija za fenotipsku analizu metodom protočne citofluorimetrije pravljani su dodavanjem natrijum-azida (NaN₃, Apoteka VMA, Srbija) i FCS u PBS i to:

PBS1 = PBS + 0.01% NaN₃

PBS2 = PBS + 0.01% NaN₃ + 2% FCS

3.1.1.3. Pufer za magnetno izdvajanje ćelija

Pufer za magnetno izdvajanje ćelija se sastojao od PBS u koji je dodat 2 mM EDTA i 0.5% goveđi serumski albumin (Sigma-Aldrich, Nemačka).

3.1.1.4. K-PBS

PBS sa dodatkom kalijuma (K-PBS) je puferski rastvor koji je služio za ispiranje ploča u ELISA testovima. Rastvor se sastojao od 137 mM NaCl (Zorka, Šabac), 2.7 mM KCl (Serva, Nemačka), 8.1 mM Na₂HPO₄ (Serva, Nemačka) i 1.5 mM KH₂PO₄ (Serva, Nemačka). Vrednost pH mu je podešena na 7.2 - 7.4.

3.1.1.5. TBS

Fiziološki rastvor puferovan Trizma bazom (eng. *Tris-buffered saline*, TBS) je korišćen za rastvaranje antitela i ispiranje preparata u toku imunohistohemije. Sastojao se od 50 mM Tris-Cl (Sigma-Aldrich, SAD) i 150 mM NaCl (Zorka, Šabac). Vrednost pH mu je podešena na 7.0 – 7.4.

3.1.2. Citokini

3.1.2.1. Rekombinantni humani GM-CSF

Rekombinantni humani GM-CSF (Leucomax, specifične aktivnosti 4.44×10^6 IU, Sandoz-Schering Plough, Švajcarska) je rastvoren pod sterilnim uslovima u destilovanoj vodi i RPMI 1640 medijumu do koncentracije od 100 µg/ml, da bi potom bio čuvan do upotrebe na -80°C. U eksperimentima je korišćen u finalnoj koncentraciji od 100 ng/ml.

3.1.2.2. Rekombinantni humani interleukin IL-4

Rekombinantni humani IL-4 (Roche Diagnostics GmbH, Nemačka) rastvoren je pod sterilnim uslovima u PBS-u obogaćenom sa 0.1% goveđim serum-albuminom do koncentracije od 25 µg/ml i tako čuvan do upotrebe na -80°C. U eksperimentima je korišćen u finalnoj koncentraciji od 20 ng/ml.

3.1.2.3. Rekombinantni humani TGF- β 1

Rekombinantni humani TGF- β 1 (R&D Systems, SAD) rastvoren je pod sterilnim uslovima u 4mM HCl obogaćenom sa 0.1% goveđim serum-albuminom do koncentracije od 20 μ g/ml, i tako čuvan na -80°C do upotrebe. U eksperimentima je korišćen u koncentraciji od 5 ili 10 ng/ml.

3.1.2.4. Rekombinantni humani TNF- α , IL-6 i IL-1 β

Rekombinantni humani TNF- α , IL-6 i IL-1 β (svi R&D Systems, SAD) rastvoreni su pod sterilnim uslovima u PBS-u obogaćenom sa 0.1% goveđim serumskim albuminom do koncentracije od 100 μ g/ml (TNF- α i IL-6), odnosno 25 μ g/ml (IL-1 β), i potom čuvani na -80°C do upotrebe. U eksperimentima su korišćeni u koncentraciji od 10 ng/ml.

3.1.2.5. PGE₂

PGE₂ (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) je rastvoren ultrasonifikovanjem u 0.1 M PBS-u do koncentracije od 50 μ g/ml, i potom čuvan na -80°C do upotrebe. U eksperimentima je primenjivan u koncentraciji od 1 μ g/ml.

3.1.3. Imunomodulacijske i druge supstance

3.1.3.1. Poly(I:C)

Poly(I:C) (Sigma-Aldrich, Nemačka) je rastvoren u RPMI 1640 medijumu do koncentracije od 10 mg/ml i čuvan do upotrebe na -20°C. Poly(I:C) je u eksperimentima korišćen u koncentraciji od 25 μ g/ml.

3.1.3.2. Curdlan

Curdlan (Sigma-Aldrich, Nemačka) je rastvoren do koncentracije od 30 mg/ml, najpre u destilovanoj vodi, a potom u 3N NaOH, i čuvan je do upotrebe na +4°C. Curdlan je u eksperimentima korišćen u koncentraciji od 100 μ g/ml.

3.1.3.3. Rekombinantni humani CD40L

Rekombinantni humani CD40L (InvivoGen, SAD) je rastvoren pod sterilnim uslovima u PBS-u obogaćenom sa 0.1% goveđim serum-albuminom do koncentracije od 100 µg/ml, i tako čuvan do upotrebe na -80°C. rhCD40L je u eksperimentima korišćen u finalnoj koncentraciji od 1 µg/ml.

3.1.3.4. 2-ME

2-ME (Fluka, Nemačka) je rastvoren u medijumu za kultivaciju do koncentracije od 50 mM i čuvan do upotrebe na +4°C, zaštićen od svetlosti. Finalna koncentracija je bila 50 µM.

3.1.3.5. [³H]-timidin

Timidin obeležen tricijumom ([³H]-timidin, Amersham International, Velika Britanija), specifične aktivnosti 5 µCi/mM, korišćen je u koncentraciji od 1 µCi po bazenu ploče od 96 mesta (Sarstedt, Nemačka).

3.1.3.6. PMA i Jonomicin

Forbol-12-miristat-13-acetat (eng. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) i Jonomicin (eng. *Ionomycine*) (oba Sigma-Aldrich, Nemačka) su rastvoreni u dimetil sulfoksidu (DMSO, R&D, SAD) do koncentracije od 20mM (PMA), odnosno 10mg/ml (jonomicin) i čuvani do upotrebe na -20°C. PMA je korišćen u radnoj koncentraciji od 20 ng/ml, a kalcijum jonomicin 500 ng/ml.

3.1.3.7. Limfoprep

Limfoprep (Lymphoprep, PAA Laboratories GmbH, Austrija) je gradijent gustine 1.077 g/ml i korišćen je za izolovanje mononuklearnih ćelija iz humane periferne krvi.

3.2. Izolacija i kultivacija humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi

3.2.1. Izolacija humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi

Humane MNC su izolovane iz „buffy coat“-a (sloj leukocita dobijen centrifugiranjem pune krvi u postupku pripremanja krvnih derivata-plazme, eritrocita, trombocita) koji je dobijen iz Instituta za transfuziologiju Vojnomedicinske akademije uz pismenu saglasnost davalaca. „Buffy coat“ je prvo razblažen u medijumu za izolaciju MNC u odnosu 1:4. Razblažena ćelijska suspenzija je u zapremini od 7 ml pipetom pažljivo nanošena na 3 ml Limfoprep gradijenta. U tako dobijenoj dvofaznoj suspenziji se posle centrifugiranja na 2200 obrtaja u minutu (eng. *Rounds per minute*, rpm) (788 x g) tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi izdvojio prsten MNC u interfazi. Gornji sloj razblažene plazme je uklonjen, a MNC su pažljivo sakupljane i potom resuspendovane u medijumu sa 0.02% NaEDTA i ispirane od gradijenta centrifugiranjem na 1300 r.p.m. (466 x g) tokom 15 min na sobnoj temperaturi. U cilju uklanjanja trombocita MNC su resuspendovane u medijumu za ispiranje i centrifugirane na malim brzinama (800 r.p.m. (287 x g)) tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Talog je resuspendovan u medijumu za kultivaciju.

Ovako dobijene ćelije su korišćene za dalju izolaciju monocita i CD4⁺ T-limfocita.

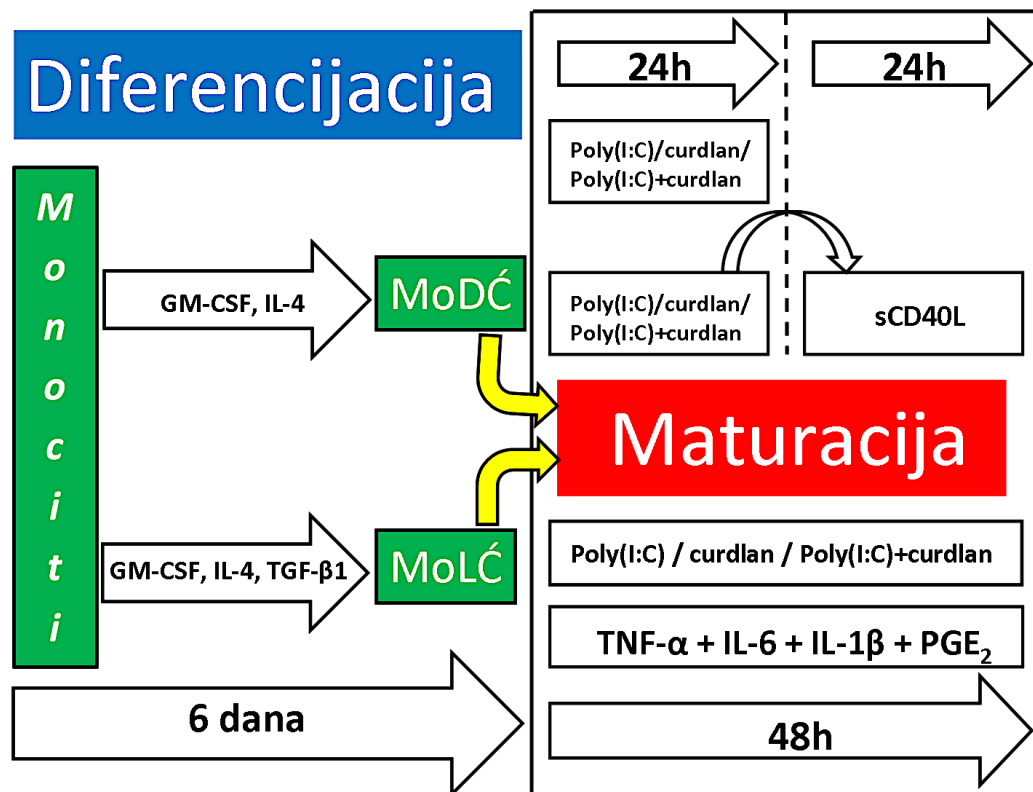
3.2.2. Izolacija monocita periferne krvi

Monociti su izolovani iz MNC adherencijom za plastiku bočica za ćelijske kulture (Flow, Velika Britanija). U svaku bočicu je dodato po 30-40x10⁶ ćelija u 5 ml medijuma u cilju adherencije monocita. Nakon inkubacije u trajanju od 1,5 sata na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom sa 5% CO₂ bočice su ispirane toplim medijumom zagrejanim na 37°C u cilju uklanjanja neadherentnih ćelija. Adherentni monociti su dalje kultivisani prema eksperimentalnim potrebama.

3.2.3. Dobijanje i kultivacija dendritskih ćelija monocitnog porekla (MoDC) i Langerhansovih ćelija monocitnog porekla (MoLC)

Monociti dobijeni adherencijom MNC za plastiku kultivisani su narednih 6 dana na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom sa 5% CO₂ u diferencijacionom medijumu sa GM-CSF (100 ng/ml) i IL-4 (20 ng/ml) u cilju dobijanja MoDC. Za dobijanje MoLC je dodatno korišćen TGF-β1 (5 ili 10 ng/ml). Nakon 6 dana kultivacije sakupljene su neadherentne ćelije, koje su dominantno činile nezrele MoDC i MoLC, i koje su nakon toga korišćene u daljim ispitivanjima.

Sazrevanje nezrelih MoDC i MoLC je podstaknuto dodatkom koktela proinflamacijskih medijatora u ćelijske kulture: TNF-α, IL-6, IL-1β (svi po 10 ng/ml) i PGE₂ (1 μg/ml) u toku 48h. Ove ćelije su takođe bile stimulisane i sa Poly(I:C) (25 μg/ml), curdlanom (100 μg/ml) i solubilnim (s)CD40L (1 μg/ml) u različitim kombinacijama i vremenskim terminima naznačenim u legendama odgovarajućeg grafikona. Efekti Poly(I:C) i curdlana su ispitivani pojedinačno ili u kombinaciji tokom 24h ili 48h. MoDC i MoLC nakon 24h stimulacije su isprane, pa naknadno stimulisane sCD40L u toku dodatnih 24h (*Slika 4*). Ćelije su nakon svake stimulacije isprane u čistom medijumu, u cilju oslobađanja od egzogenih i endogenih citokina, i potom korišćene u daljim testovima. Supernatanti iz svih bazena u kojima su ćelije bile kultivisane su pokupljeni i zamrznuti na -20°C radi kasnijeg određivanja nivoa produkovanih citokina.



Slika 4. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna

Nezrele MoDC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLC dodatkom TGF-β ovom diferencijacionom koktelu. Obe grupe ćelija su potom stimulisane standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora (TNF-α, IL-1β, IL-6 i PGE₂) u toku 48h, kao i pojedinačno ili kombinacijom Poly(I:C) i curdlana u toku 24h ili 48h. Fenotipske i funkcionalne karakteristike MoDC i MoLC su nakon 24h maturacije procenjene i dodatkom sCD40L.

3.2.4. Izolacija alogernih CD4⁺ T-limfocita tehnikom imunomagnetnog izdvajanja

Za postavljanje MLR, kao i za utvrđivanje Th citokinskog profila, korišćene su CD4⁺ T-ćelije koje su dobijene kao negativna frakcija iz MNC primenom tehnike imunomagnetnog izdvajanja. Od dobijenih MNC odvojeno je 1×10^8 ćelija i izvedena je procedura imunomagnetnog izdvajanja CD4⁺ T-limfocita, korišćenjem kompleta za izolaciju CD4⁺ T-limfocita, a prema protokolu proizvođača (CD4⁺ T-Cell Isolation Kit II, MACS, Myltenyi Biotec, Nemačka). MNC su inkubirane 15 minuta na hladnom u puferu za magnetno izdvajanje ćelija sa koktelom antitela

konjugovanih biotinom, u razblaženju 1:5. Koktel je sadržao antitela na sledeće antigene: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ i CD235a. Nakon inkubacije, ćelije su dva puta isprane u puferu za sortiranje ćelija i inkubirane 15 minuta na hladnom sa magnetnim partikulama za koje su vezana anti-biotinska antitela u finalnom razblaženju 1:5. Ćelijska suspenzija obeležena magnetnim partikulama isprana je nakon inkubacije dva puta u puferu za imunomagnetno izdvajanje ćelija, resuspendovana u 500 μ l istog pufera i potom naneta na separacionu kolonu (LS Columns, MACS, Myltenyi Biotec, Nemačka) postavljenu u magnetnom polju (Midi MACS Magnet, Myltenyi Biotec, Nemačka). Nakon jednog ciklusa imunomagnetnog izdvajanja ćelija na koloni su izdvojene imunomagnetno obeležene ćelije, dok su u eluatu sakupljene prečišćene CD4⁺ T-ćelije. Čistoća izolovanih CD4⁺ T-ćelija je, u zavisnosti od eksperimenta, bila između 91-96 %, što je potvrđeno protočnom citofluorimetrijom korišćenjem anti-CD4-FITC (engl. *Fluorescein isothiocyanate*, FITC) i anti-CD3-PE (engl. *Phycoerythrin*, PE) antitela (oba Serotec, Velika Britanija).

3.3. Fenotipske karakteristike MoDC i MoLC

3.3.1. Monoklonska antitela

Diferencijacija i sazrevanje MoDC i MoLC praćeno je analizom ekspresije površinskih markera. U tu svrhu korišćena su monoklonska antitela u određenim razblaženjima (Tabela 1).

Tabela 1. Monoklonska antitela korišćena za procenu fenotipskih karakteristika MoDC i MoLC.

Monoklonsko antitelo	Razblaženje	Proizvođač
Mišije anti-humano CD40 (PE)	1:5	BD Biosciences, SAD
Mišije anti-humano HLA-DR (PE)	1:10	Serotec, V. Britanija
Mišije anti-humano HLA-DR (biotine)	1:10	eBioscience, SAD
Mišije anti-humano CD54 (PE)	1:10	Serotec, V. Britanija
Mišije anti-humano CD83 (FITC)	1:5	BD Biosciences, SAD
Mišije anti-humano CD86 (PE)	1:10	Serotec, V. Britanija
Mišije anti-humano CCR7 (FITC)	1:10	R&D Systems, SAD
Mišije anti-humano CD80 (FITC)	1:10	Serotec, V. Britanija
Mišije anti-humano CD14 (FITC)	1:10	Serotec, V. Britanija
Mišije anti-humano CD1a (PE)	1:10	Serotec, V. Britanija

3.3.2. Protočna citofluorimetrija

MoDC i MoLC su isprane u hladnom PBS1 na 1500 r.p.m. (537 x g) tokom 8 minuta na +4°C. Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u PBS1 ili PBS2 do koncentracije od 1×10^5 ćelija u ukupnoj zapremini od 50 μ l po epruveti za protočnu citofluorimetriju. U ćelijsku suspenziju su dodata monoklonska antitela u odgovarajućim razblaženjima, najčešće u vidu dvostruke fluorescence. Ćelije su potom inkubirane 30 minuta na +4°C, pa isprane centrifugiranjem na 1500 r.p.m. tokom 8 minuta na hladnom. U suspenziju ćelija u kojoj su inkubirana primarna

antitela konjugovana biotinom dodavan je streptavidin konjugovan sa 5-PE-Cy5 (eng. *Phycoerythrin cyanine*, 5-PE-Cy5) (eBioscience, SAD) u konačnom razblaženju 1:100. Posle dodatne inkubacije od 30 minuta na +4°C i ispiranja sa hladnim PBS1 u toku 5 minuta, ćelije su fiksirane u 10% rastvoru paraformaldehida u PBS1. Kontrola se sastojala od uzoraka sa adekvatnim irelevantnim mišjim monoklonskim antitelima, specifičnim za pacovske antigene, koja su bila konjugovana sa odgovarajućom fluorescentnom bojom (FITC, PE) ili biotinom uz dodatak streptavidin-5-PE-Cy5.

Fenotip obeleženih ćelija je analiziran na EPICS XL-MCS protočnom citofluorimetru (Coulter, Krefeld, Nemačka). U ovom aparatu kao izvor svetlosti korišćen je argonski laser sa emisijom ekscitirajuće svetlosti u opsegu talasne dužine 450-530 nm. Rezultati su predstavljeni kao numeričke vrednosti procenta pozitivnih ćelija i srednje vrednosti intenziteta fluorescence (engl. mean fluorescence intensity, mfi). Procenat pozitivnih ćelija je određivan postavljenjem graničnika na histogramu fluorescencije na osnovu kontrole. Srednji intenzitet fluorescencije predstavlja aritmetičku sredinu intenziteta fluorescencija pojedinačnih događaja (ćelija) izraženu u relativnim brojevima kanala fluorescencije (0 - 1024). Analizirano je najmanje 5000 ćelija po uzorku.

3.3.3. Imunocitohemijska detekcija Langerina

Citospinovi MoDĆ i MoLĆ su napravljeni korišćenjem citocentrifuge (Shandon Cytospine Centrifuge, Thermo Scientific, Holandija). Citospin preparati su zatim fiksirani u 2% rastvoru pararozanilina u PBS-u a potom 30 min inkubirani sa kozjim anti-humanim IgG antitelom na Langerin (CD207) (R&D Systems, SAD). Usledila je 15 min inkubacija sa biotinizovanim poliklonskim antitelom u prisustvu 5% normalnog (AB) humanog seruma, pa nakon toga još jedna 15 min inkubacija sa streptavidinom konjugovanim alkalnom fosfatazom (LSAB+SystemAP; DakoCytomation, Danska). Bojenje je završeno posle 10 min inkubacije sa kompleksom fuksina i obojenog substrata (eng. *Fuchsin-substrate chromogen*). Nakon svake faze bojenja, pločice su ispirane slanim puferskim rastvorom TBS. Preparati su analizirani svetlosnom mikroskopijom. Preparati koji nisu inkubirani sa primarnim antitelom poslužili su kao negativna kontrola. Na svakom preparatu je

analizirano najmanje 500 ćelija nakon čega je određen procenat pozitivnih MoDC i MoLC na Langerin.

3.4. Funkcionalne karakteristike MoDC i MoLC

Alostimulacijski potencijal MoDC i sposobnost usmeravanja T-ćelijskog odgovora ka Th1, Th2, Th17 ili Treg odgovoru ispitivani su korišćenjem sledećih testova:

- Alogeni test proliferacije u MLR;
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test za utvrđivanje koncentracije citokina produkovanih u kulturama MoDC i MoLC;
- ELISA i Th1/Th2 11 plex test za utvrđivanje koncentracije citokina produkovanih u kokulturama MoDC i MoLC sa alogenim T-limfocitima – Th profil.

3.4.1. Potencijal alostimulacije MoDC i MoLC

Alostimulacijski potencijal MoDC je ispitivan testom MLR u kome su MoDC i MoLC korišćene kao stimulatori, dok su kao responderi korišćeni CD4⁺ T-limfociti od alogenog davaoca. U ploču od 96 mesta sa „U“- dnom (Sarstedt, Nemačka) su dodati stimulatori kao triplikati dvostruko opadajućeg broja (od 1x10⁴ do 0.125x10⁴ MoDC po bazenu) i konstantan broj (1x10⁵) CD4⁺ T-ćelija u ukupnoj zapremini od 200 µl po bazenu. Ćelije su kultivisane 6 dana u kompletnom medijumu u termostatu na 37°C i 5% CO₂. [³H]-timidin je dodat 18 sati pre isteka kultivacije u koncentraciji od 1 µCi po bazenčiću. Nakon isteka kulture ćelije su pokupljene automatskim skidačem kulture (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, SAD). Ugradnja [³H]-timidina izmerena je scintilacionim β-brojačem (LKB-1219 Rackbeta, Finska) i izražena kao broj otkucaja u minuti (engl. *Counts per minute*, c.p.m).

Dobijene vrednosti su izražene u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) ± SD, dobijenog od triplikata iz pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$IP = \frac{\text{c.p.m. (MoDC(LC)/CD4}^+ \text{ T-limfocitna kokultura)}}{[\text{c.p.m. (sami CD4}^+ \text{ T-limfociti)} + \text{c.p.m. (sami MoDC(LC))}]}$$

3.4.2. Određivanje produkcije citokina od strane kultivisanih MoDC i MoLC

Količina produkovanih citokina od strane MoDC ili MoLC (IL-12p70, IL-23, IL-27, IL-10, IL-6, TNF- α i IL-1 β) određena je u supernatantima kultura ovih ćelija ELISA metodom (R&D Systems i eBioscience, SAD).

U ELISA testovima, mikroploče od 96 mesta (Corning Costar 9018 ELISA plate, Sigma-Aldrich, Nemačka) su bile obložene monoklonskim antitelima specifičnim za navedene citokine, dok je sekundarno anti-citokinsko antitelo konjugovano biotinom. U cilju kvantifikacije citokina u standardu ili uzorcima, enzim peroksidaze rena je bio konjugovan streptavidinom. Kao supstrat za ovaj enzim su korišćeni stabilizovani vodonik peroksid (H₂O₂) sa tetrametilbenzidinom, dok je kao standard u testu korišćen adekvatni rekombinantni humani citokin. Optička gustina sadržaja u bazenima je merena spektrofotometrijski na 450 nm talasne dužine, a tražena koncentracija citokina u svakom od uzoraka je određena na osnovu standardne krive. Senzitivnost metode je bila 3,0 pg/ml za IL-12p70 i IL-10; 1,3 pg/ml za IL-23; 1,5 pg/ml za IL-27 i TNF- α ; 0,1 pg/ml za IL-6, i 0,05 pg/ml za IL-1 β .

Od količnika izmerenih koncentracija IL-12p70 i IL-10, dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata (n = 5), izračunate su prosečne vrednosti. Ove vrednosti su poslužile za procenu sposobnosti DC da nakon određenog tretmana indukuju Th1 ili Th2 imunski odgovor:

$$I > \frac{\xi \left(\frac{IL-12p70}{IL-10} \right)}{n} > I$$

(Th2) (Th1)

3.4.3. Određivanje produkcije citokina u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa MoDC ili MoLC

Sposobnost MoDC i MoLC da polarizuju imunski odgovor određena je merenjem koncentracije citokina u supernatantima njihovih kokultura sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima pomoću ELISA metode (IFN- γ , IL-10, IL-4, TGF- β i IL-17) ili citofluorimetrijskom metodom pomoću fluorescentnih kuglica obloženih anti-citokinskim antitelima (IL-2) (R&D Systems, SAD i Th1/Th2 11plex Kit, Bender MedSystems, Austrija).

U bazene ploče sa 96 mesta sa „U“-dnom (Sarstedt, Nemačka) dodato je po 1×10^4 nezrelih i stimuliranih MoDC ili MoLC. U iste bazene dodati su i sortirani ukupni CD4⁺ T-limfociti, 1×10^5 po bazenu u zapremini od 200 μ l medijuma za kultivaciju ćelija po bazenu. Nakon petodnevne inkubacije u svaki bazen su dodati PMA, u koncentraciji od 20 ng/ml, i Jonomicin, u koncentraciji od 500 ng/ml, kako bi se indukovala intracelularna produkcija Th-citokina. Ćelije su inkubirane još 24h, a zatim su u supernatantima svakog bazena određivane koncentracije citokina.

Nivoi produkovanih Th-citokina određivani su ELISA testovima po uputstvima proizvođača kako je to opisano u poglavlju 3.4.2. Senzitivnost metode je bila 0,06 pg/ml za IFN- γ ; 1,5 pg/ml za IL-17; 3,0 pg/ml za IL-10; 0,1 pg/ml za IL-4; 4,0 pg/ml za IL-13, i 3,0 pg/ml za TGF- β .

IL-2 je određivan u supernatantima kokultura MoDC i MoLC sa CD4⁺ T-limfocitima korišćenjem humanog Th1/Th2 11plex sistema. Za analizu ovog citokina su korišćene fluorescentne kuglice obložene monoklonskim anti humanim-IL-2 antitelom, kao i sekundarno anti-IL-2 antitelo konjugovano biotinom. Detekcija vezanog IL-2 iz uzorka je izvršena pomoću rastvora streptavidin-fikoeritina. Senzitivnost metode je bila 16,4 pg/ml. Uzorci su analizirani u FL4 kanalu na protočnom citofluorimetru (EPICS XL-MCS, Coulter, Nemačka), a rezultati su obrađeni softverom koji je dobijen uz kit (FlowCytomix Pro Software).

Od količnika IFN- γ / IL-4, IFN- γ / IL-13, IFN- γ / IL-10, IFN- γ / IL-17 i IL-2 / TGF- β , dobijenih u pet nezavisnih eksperimenata, izračunate su srednje vrednosti na način opisan u poglavlju 3.4.2. Ove vrednosti su poslužile za procenu dominantnog smera Th polarizacije ili sposobnosti proliferacije alogenih CD4⁺ T-

limfocita, u zavisnosti od prethodnog tretmana DĆ sa kojima su bili kokultivisani limfociti.

3.5. Statistička obrada podataka

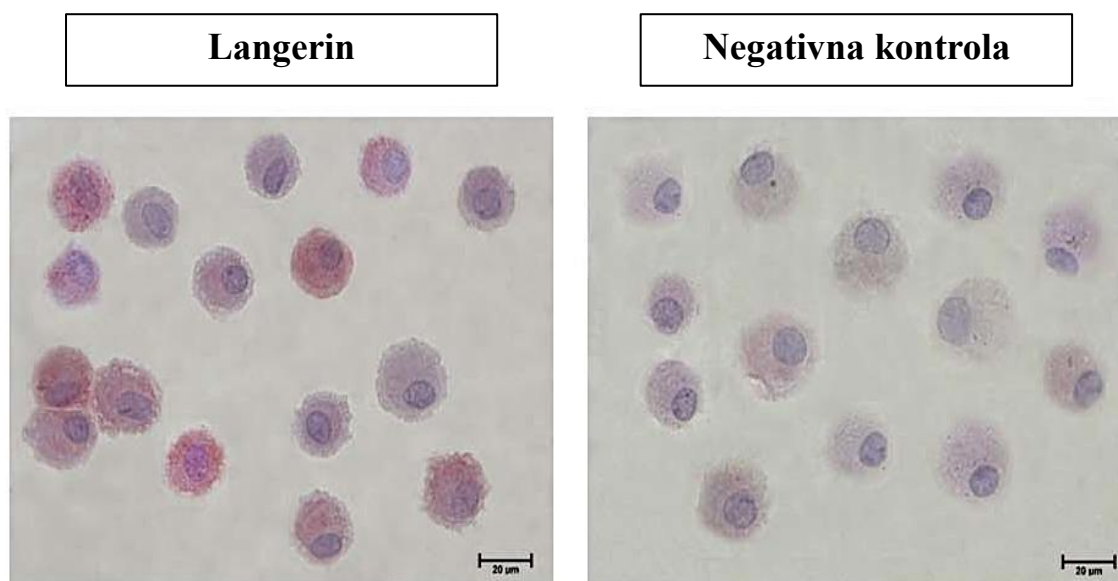
Podaci su statistički obrađeni Studentovim t-testom i/ili analizom varijanse (ANOVA) uz odgovarajući posthoc test (Tukey za One-Way ANOVA, Bonferroni za Two-Way ANOVA) u programu GraphPad Prism v.5.04. Vrednosti p manje od 0,05 smatrale su se statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Uticaj koktela proinflamacijskih medijatora na sazrevanje i funkcije MoLĆ

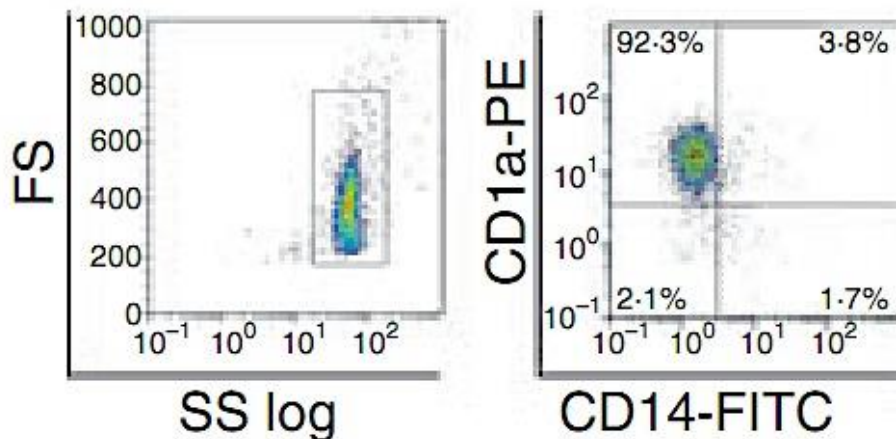
4.1.1. Fenotipske karakteristike MoLĆ

Nezrele MoLĆ su dobijene šestodnevnom inkubacijom humanih monocita u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β . Fenotipska svojstva ovih ćelija su opisana pomoću imunohistohemijske (Langerin) i citofluorimetrijske (CD14, CD1a) analize vezivanja antitela usmerenih protiv njihovih površinskih molekula. Rezultati su prikazani u obliku procenta ćelija koje su ispoljile ove molekule. Nađeno je da većina nezrelih MoLĆ ($84.5 \pm 7.7\%$) ispoljava Langerin (*Slika 5*) i CD1a ($91.4 \pm 2.6\%$), uz istovremeno odsustvo ekspresije CD14 molekula (*Grafikon 1*).



Slika 5. Fenotipska karakterizacija nezrelih MoLĆ imunohistohemijском metodom

Citospin preparati nezrelih MoLĆ obeleženi su anti-humanim Langerin IgG kako je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Najmanje 500 ćelija je analizirano svetlosnom mikroskopijom na svakom citospinu, nakon čega je utvrđen procenat pozitivnih ćelija. Originalno uvećanje - 600 x, graničnik odgovara 20 μm . Slajdovi tretirani TBS-om umesto primarnog antitela poslužili su kao negativna kontrola. Prikazana su reprezentativna vidna polja.



Grafikon 1. Fenotipske karakteristike nezrelih MoLĆ.

MoLĆ su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β . Ove ćelije su obeležene antitelima specifičnim za CD14 i CD1a molekul, pa zatim analizirane citofluorimetrijom. Brojevi u okviru CD14-FITC / CD1a-PE dijagrama predstavljaju procenat MoLĆ koje ekspimiraju ove markere unutar selektovane populacije (ograda je prikazana na FS / SS log dijagramu). Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog od pet nezavisnih eksperimenata.

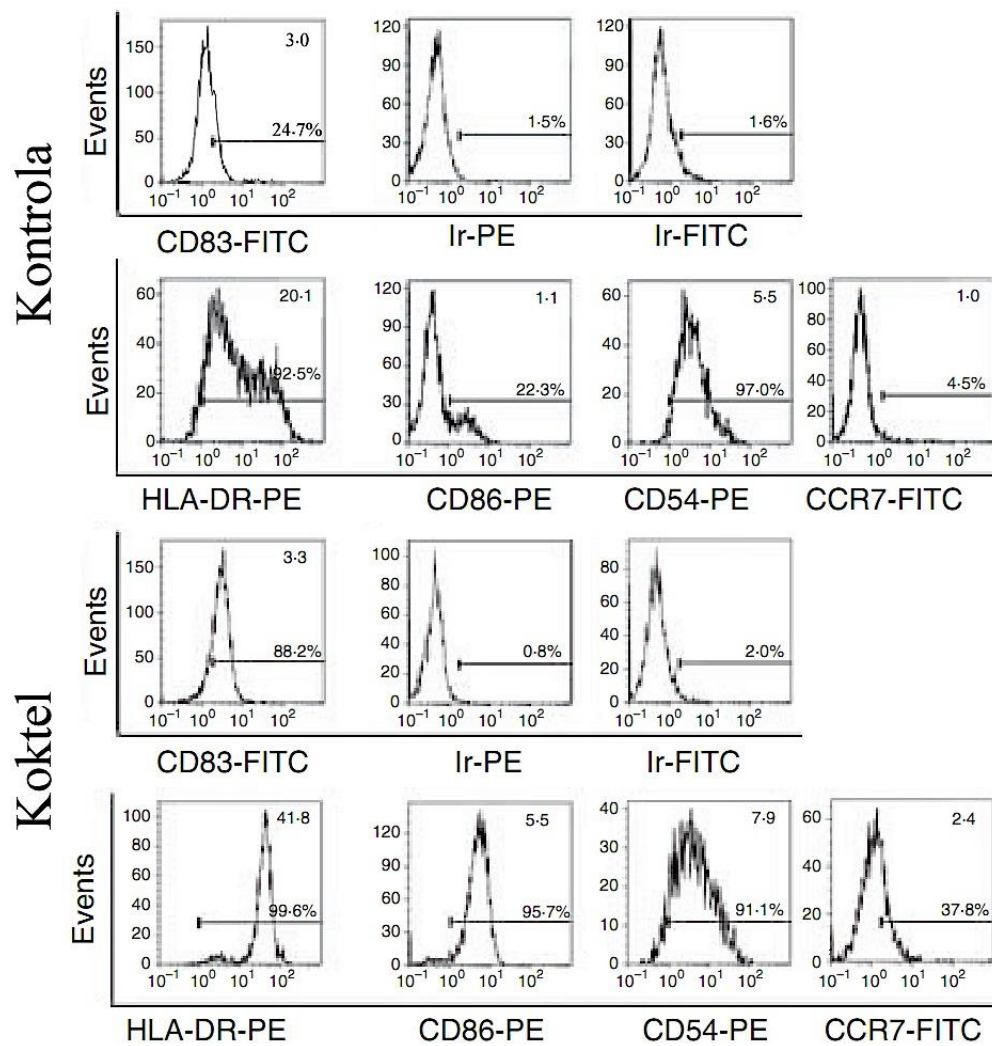
Fenotipske karakteristike MoLĆ su opisane i nakon stimulacije nezrelih MoLĆ standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i PGE₂). Vezivanje antitela usmerenih protiv površinskih molekula na ovim ćelijama analizirano je metodom citofluorimetrije. Rezultati su prikazani u obliku procenta ćelija koje su ispoljile pomenute molekule i kao srednja vrednost intenziteta njihove ekspresije. Stimulacija MoLĆ standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora je dovela do njihovog fenotipskog sazrevanja, što je potvrđeno na osnovu statistički značajnog povećanja ekspresije HLA-DR, CD83, CD86, CD54 i CCR7 u odnosu na kontrolne, nezrele MoLĆ (*Tabela 2* i *Grafikon 2*).

Tabela 2. Fenotipske karakteristike MoLĆ sazrelih u prisustvu koktela proinflamacijskih medijatora.

		<i>MoLĆ, 48h</i>	
		<i>KONTROLA</i>	<i>KOKTEL</i>
HLA-DR	<i>%± SD</i>	89.4 ± 8.4	95.9 ± 3.8
	<i>mfi± SD</i>	15.6 ± 5.6	38.5 ± 4.7 ***
CD86	<i>%± SD</i>	42.1 ± 14.5	92.8 ± 6.4 ***
	<i>mfi± SD</i>	2.7 ± 1.6	6.1 ± 0.9 **
CD83	<i>%± SD</i>	16.8 ± 9.2	82.5 ± 7.3 ***
	<i>mfi± SD</i>	2.9 ± 0.6	3.4 ± 1.4
CD54	<i>%± SD</i>	87.2 ± 9.3	81.5 ± 11.5
	<i>mfi± SD</i>	7.7 ± 2.5	11.0 ± 3.7 *
CCR7	<i>%± SD</i>	3.2 ± 0.3	29.4 ± 9.8 ***
	<i>mfi± SD</i>	1.2 ± 0.8	2.9 ± 0.7 **

MoLĆ su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β . Maturacija nezrelih MoLĆ indukovana je klasičnim koktelom proinflamacijskih medijatora u toku 48h (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i PGE₂) kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Nezrele i zrele MoLĆ obeležene su antitelima specifičnim za ključne DĆ površinske markere a zatim analizirane na protočnom citometru. Rezultati iz pet nezavisnih eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija ($\% \pm SD$) i kao srednja vrednost intenziteta ekspresije (engl. mean fluorescence intensity, *mfi* $\pm SD$).

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, u poređenju sa nezrelim MoLĆ

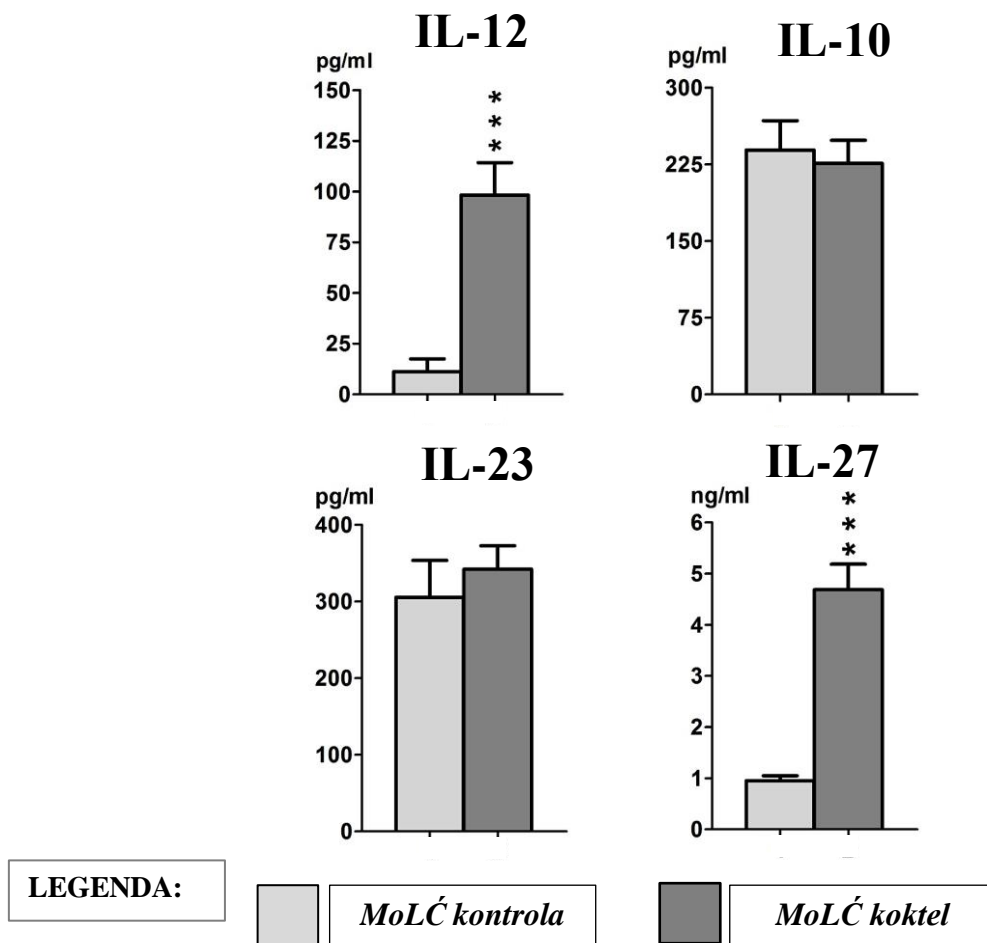


Grafikon 2. Fenotipske karakteristike MoLĆ sazrelih u prisustvu koktela proinlamacijskih medijatora.

MoLĆ su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF (100 ng/ml), IL-4 (20 ng/ml) i TGF- β (10 ng/ml). Maturacija nezrelih MoLĆ indukovana je koktelom proinlamacijskih medijatora u toku 48h (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i PGE₂) kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Nezrele i zrele MoLĆ obeležene su antitelima specifičnim za ključne DĆ površinske markere, a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Brojevi u gornjem desnom uglu pojedinačnih histograma predstavljaju prosečne vrednosti intenziteta fluorescencije unutar selektovane populacije (ogradike su prikazane na adekvatnom FS/SS log dijagramu *Grafikona 1* (za nezrele MoLĆ), odnosno *Grafikona 6* (za zrele MoLĆ)). Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog od pet nezavisnih eksperimenata. Ir-PE i Ir-FITC predstavljaju nespecifičnu fluorescenciju u prisustvu irelevantnog (Ir) mišjeg monoklonskog antitela konjugovanog određenim fluorohromom.

4.1.2. Produkcija citokina od strane MoLĆ

Na početku ispitivanja funkcionalnih karakteristika MoLĆ analizirana je produkcija citokina u supernatantima dvodnevnih kultura nezrelih i zrelih MoLĆ. Sposobnost ovih ćelija da sekretuju citokine je utvrđena ELISA testovima, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml i standardizovane za 1×10^6 MoLĆ/ml kulture. U kulturama MoLĆ stimulisanih proinflamacijskim koktelom izmerene su statistički značajno veće koncentracije IL-12 i IL-27 u odnosu na kontrolne, nezrele MoLĆ, dok nije bilo statistički značajne razlike u nivoima IL-10 i IL-23 (**Grafikon 3**). Odnos IL-12 / IL-10 je bio značajno veći u kulturi zrelih MoLĆ u poređenju sa nezrelim MoLĆ ($0,44 \pm 0,04 / 0,04 \pm 0,02$, $p < 0,001$).



Grafikon 3. Produkcija citokina od strane MoLC.

Koncentracije citokina određivane su ELISA testovima u supernatantima kontrolnih, nezrelih MoLC, odnosno MoLC indukovanih na sazrevanje u prisustvu proinflamacijskog koktela (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i PGE₂) u toku 48h (1×10^6 / ml). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD iz pet nezavisnih eksperimenata.

*** = $p < 0,001$, u poređenju sa kontrolnim, nezrelim MoLC

4.1.3. Produkcija citokina u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita i MoLC

Sledeći korak u ispitivanjima funkcionalnih karakteristika MoLC odnosio se na sposobnost usmeravanja imunskog odgovora CD4⁺ T-limfocita. U cilju proučavanja Th imunskog odgovora *in vitro*, MoLC (kontrolne, nezrele ćelije i ćelije stimulisane proinflamacijskim, maturacijskim koktelom) su kokultivisane sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima tokom 5 dana nakon čega je izmeren nivo citokina u supernatantima kokultura ELISA testovima ili metodom citofluorimetrijske

detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml.

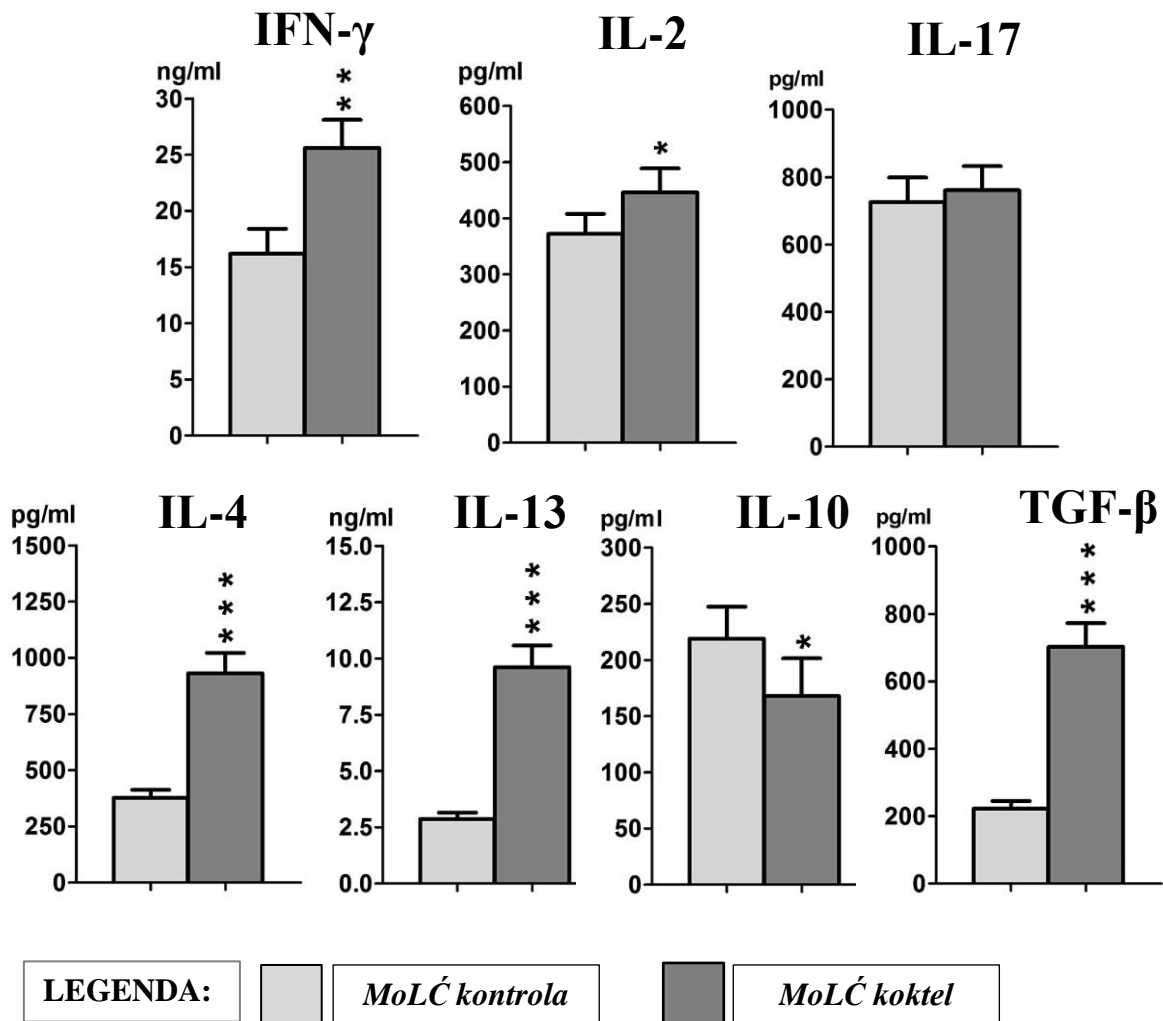
Rezultati prikazani na **Grafikonu 4** pokazuju statistički značajno veću produkciju IFN- γ IL-2, IL-4, IL-13 i TGF- β u ćelijskim kokulturama gde su kao stimulatori korišćene zrele MoLĆ u odnosu na kokulture sa kontrolnim, nezrelim MoLĆ. Nivoi IL-17 su ostali nepromenjeni, dok je produkcija IL-10 bila snižena u odnosu na kokulture sa kontrolnim, nezrelim MoLĆ.

Analizom međusobnih odnosa pojedinih citokina u okviru Th profila pokazano je da su odnosi IFN- γ / IL-4 i IFN- γ / IL-13 bili statistički značajno manji, a odnosi IFN- γ / IL-17 i IFN- γ / IL-10 bili značajno veći u kokulturi zrelih MoLĆ i CD4⁺ T-limfocita u odnosu na kokulture sa nezrelim MoLĆ (**Tabela 3**).

Tabela 3. Analiza međusobnih odnosa citokina u okviru Th profila u kokulturama alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ.

Odnos Th citokina			
<i>Citokini</i>	<i>Nezrele MoLĆ</i>	<i>Zrele MoLĆ</i>	<i>Statistička značajnost</i>
IFN-γ / IL-4	43,9 \pm 3,7	27,6 \pm 0,3	p < 0,001
IFN-γ / IL-13	5,9 \pm 0,5	2,7 \pm 0,1	p < 0,001
IFN-γ / IL-17	23,0 \pm 1,8	33,8 \pm 2,3	p < 0,001
IFN-γ / IL-10	75,4 \pm 2,0	150,4 \pm 21,1	p < 0,001

Alogeni CD4⁺ T-limfociti (1×10^5) su kultivisani 5 dana u prisustvu kontrolnih, nezrelih MoLĆ ili MoLĆ stimulisanih koktelom proinflamacijskih medijatora (TNF- α , IL-6, IL-1 β i PGE₂) u toku 2 dana (1×10^4). U kokulturu je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i jonomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h kultivacije. Vrednosti IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17 i IL-10 su izmerene ELISA testovima. Iz količnika ovih citokina, dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata, izračunate su prosečne vrednosti \pm SD.



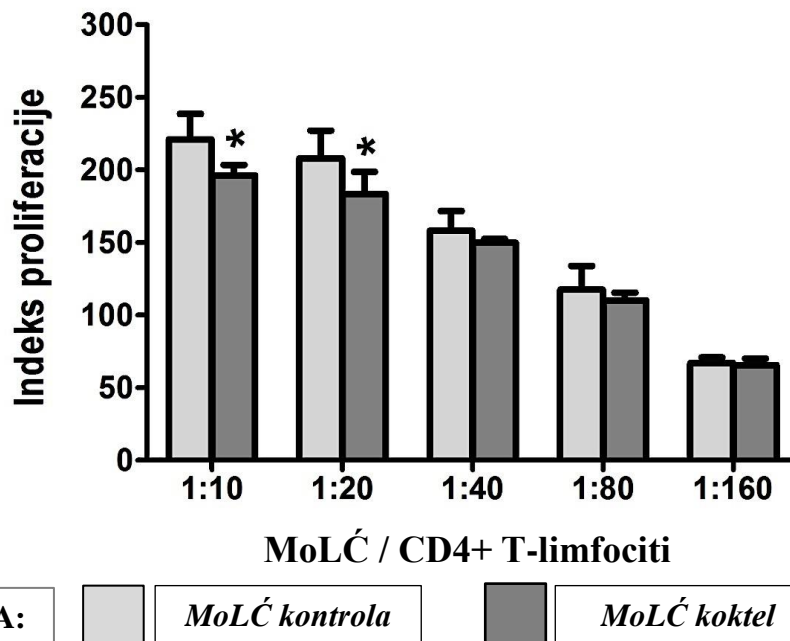
Grafikon 4. Produkcija citokina u supernatantima kokultura alogeni CD4^+ T-limfocita i MoLC.

Nezrele MoLC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β , a zatim su tretirane standardnim maturacijskim koktelom (TNF- α , IL-6, IL-1 β i PGE $_2$) tokom 2 dana. Alogeni CD4 $^+$ T-limfociti (1×10^5) su kultivisani 5 dana u prisustvu kontrolnih, nezrelih MoLC ili zrelih MoLC (1×10^4). U kokulturu je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i Jonomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h kultivacije. Vrednosti citokina izmerene su ELISA testovima (IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13, IL-10 i TGF- β) i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 11 Plex). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost koncentracije citokina iz pet nezavisnih eksperimenata \pm SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kokulturom u kojoj su bile kontrolne, nezrele MoLC

4.1.4. Potencijal alostimulacije MoLĆ

Važna funkcionalna karakteristika DĆ jeste sposobnost da stimulišu proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita. Osobina MoLĆ da u zavisnosti od tretmana standardnim koktelom proinflamacijskih medijatora indukuju proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita, procenjena je na osnovu analize ugradnje [³H]-timidina u ove limfocite. Rezultati su prikazani u obliku indeksa proliferacije koji se izračunava kao što je opisano u *Materijalima i metodama*. Proliferativni odgovor alogenih CD4⁺ T-limfocita u kokulturi sa zrelim MoLĆ bio je slabiji u odnosu na limfocite kultivisane sa nezrelim MoLĆ u višim MoLĆ:CD4⁺ T-odnosima (1:10 i 1:20) (*Grafikon 5*).



Grafikon 5. Potencijal alostimulacije MoLĆ.

Nezrele MoLĆ su dobijene iz monocita nakon šestodnevne stimulacije GM-CSF, IL-4 i TGF- β , a zatim su tretirane standardnim maturacijskim (TNF- α , IL-6, IL-1 β i PGE₂) tokom 2 dana. Nezrele i zrele MoLĆ su kultivisane u dvostruko-opadajućem broju (1×10^4 – $0,0625 \times 10^4$) sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U toku poslednjih 18h u kulture je dodat [³H]-timidin, nakon čega je radioaktivnost izmerena kao broj radioaktivnih raspada u minuti (engl. counts per minute, c.p.m.) kao što je opisano u *Materijalima i metodama*. Na grafiku su predstavljeni rezultati u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) \pm SD dobijenog iz pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule: $IP = \frac{c.p.m. (MoLĆ/CD4^+ T-limfocitna\ ko-kultura)}{[c.p.m. (sami\ CD4^+ T-limfociti) + c.p.m. (sami\ MoLĆ)]}$. Broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih CD4⁺ T-limfocita bio je 402 ± 53 c.p.m, a u kulturi samih MoLĆ nezavisno od broja i maturacionog statusa bio je 79 ± 16 c.p.m. (navedene su prosečne vrednosti, dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata).

* = $p < 0,05$, u poređenju sa kontrolnim, nezrelim MoLĆ

4.2. Poređenje fenotipskih i funkcionalnih svojstava MoDC i MoLC stimulisanih koktelom proinflamacijskih medijatora

4.2.1. Fenotipske karakteristike MoDC i MoLC

U cilju bližeg definisanja imunobiološkog potencijala MoLC izvršena je analiza i poređenje fenotipskih i funkcionalnih svojstava ovih ćelija u odnosu na MoDC istih donora, koje su diferencirane u kulturi od monocita kao i MoLC ali bez dodatka TGF- β .

Fenotipske karakteristike MoDC i MoLC su analizirane citofluorimetrijskom metodom. Rezultati vezivanja antitela usmerenih protiv površinskih molekula na ovim ćelijama su prikazani u obliku procenta ćelija koje su ispoljile pomenute molekule i kao srednja vrednost intenziteta njihove ekspresije.

Nakon diferencijacije obe ćelijske subpopulacije su stekle fenotip nezrelih DC koji se karakterisao niskom ekspresijom CD83 (*Tabela 4*), CD86 i CCR7 (*Tabela 4, Grafikon 6*). Dok je ekspresija CD14 bila gotovo nedetektibilna na obe subpopulacije DC, skoro sve MoLC i oko polovina MoDC su ispoljile CD1a (*Grafikon 6*). Nezrele MoLC su se razlikovale od nezrelih MoDC po višim forward scatter (FS) parametrima, ali i po značajno nižoj ekspresiji HLA-DR, CD54 i CCR7 (*Tabela 4, Grafikon 6*). Takođe, procenat Langerin⁺ ćelija u populaciji nezrelih MoLC (84.5 ± 7.7 %) bio je značajno veći od Langerin⁺ ćelija u populaciji MoDC (6.4 ± 2.1 %) (*rezultati nisu prikazani*).

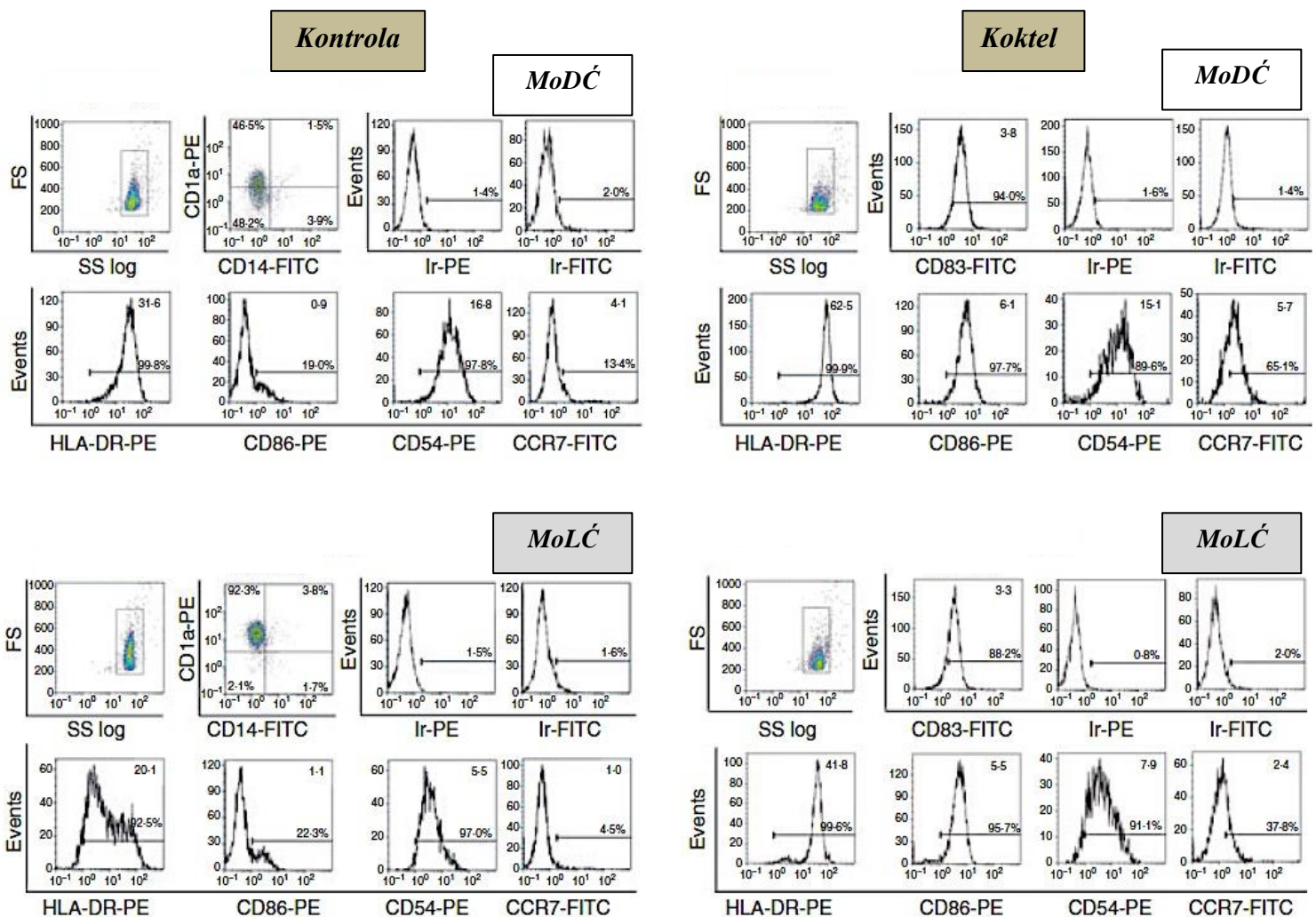
Tetman obe grupe ćelija koktelom proinflamacijskih medijatora doveo je do fenotipskog sazrevanja DC praćenog povećanjem ekspresije HLA-DR, CD83, CD86 i CCR7, uz istovremeno sniženja FS parametara. Zrele MoLC su imale slabiju ekspresiju HLA-DR, CD54 i CCR7 u poređenju sa zrelim MoDC, dok razlika u ekspresiji CD83 i CD86 nije detektovana (*Tabela 4 i Grafikon 6*).

Tabela 4. Poređenje fenotipskih karakteristika MoDC i MoLC stimulisanih u prisustvu koktela proinflamacijskih medijatora.

		<i>KONTROLA</i>		<i>KOKTEL</i>	
		MoDC	MoLC	MoDC	MoLC
CD83	<i>%±SD</i>	15,0 ± 8,2	16,8 ± 9,2	89,0 ± 6,2	82,5 ± 7,3
	<i>mfi±SD</i>	5,7 ± 1,0	2,9 ± 0,6	3,5 ± 1,7	3,4 ± 1,4
HLA-DR	<i>%±SD</i>	92,8 ± 6,0	89,4 ± 8,4	97,5 ± 2,4	95,9 ± 3,8
	<i>mfi±SD</i>	34,6 ± 4,3	15,6 ± 5,6 ***	57,5 ± 6,8	38,5 ± 4,7 ***
CD86	<i>%±SD</i>	34,1 ± 11,8	42,1 ± 14,5	91,7 ± 5,9	92,8 ± 6,4
	<i>mfi±SD</i>	2,4 ± 0,6	2,7 ± 1,6	6,4 ± 3,7	6,1 ± 0,9
CD54	<i>%±SD</i>	96,3 ± 1,9	87,2 ± 9,3	95,9 ± 2,2	81,5 ± 11,5 *
	<i>mfi±SD</i>	15,2 ± 3,7	7,7 ± 2,5 **	14,1 ± 3,5	11,0 ± 3,7
CCR7	<i>%±SD</i>	10,0 ± 2,7	3,2 ± 0,3 **	59,6 ± 6,9	29,4 ± 9,8 ***
	<i>mfi±SD</i>	3,9 ± 1,4	1,2 ± 0,8	12,1 ± 0,9	2,9 ± 0,7 **

MoDC su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF i IL-4, dok su MoLC nastale u prisustvu istog diferencijacionog koktela ali uz dodatak TGF-β. Maturacija nezrelih ćelija obe grupe indukovana je koktelom proinflamacijskih medijatora u toku 48h (TNF-α, IL-1β, IL-6 i PGE₂) kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Nezrele i zrele DC obeležene su antitelima specifičnim za ključne DC površinske markere pa zatim analizirane citofluorimetrijom. Rezultati iz pet nezavisnih eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija (% ± SD) i kao srednja vrednost intenziteta ekspresije (engl. mean fluorescence intensity, mfi ± SD).

** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa nezrelim ili zrelim MoLC



Grafikon 6. Poređenje fenotipskih karakteristika MoDC i MoLC stimuliranih u prisustvu koktela proinflamacijskih medijatora.

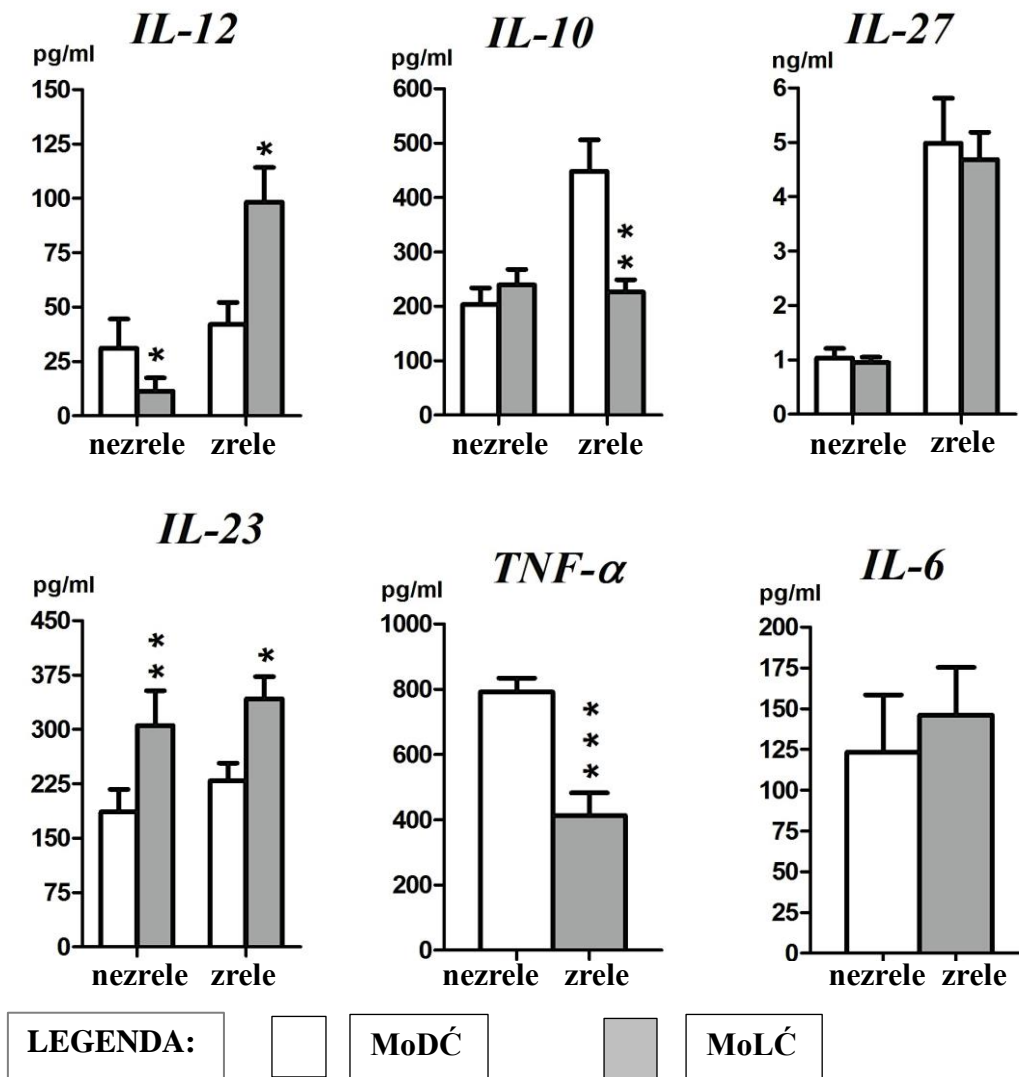
MoDC su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF i IL-4, dok su MoLC nastale u prisustvu istog diferencijacionog koktela ali uz dodatak TGF- β . Maturacija nezrelih ćelija obe grupe indukovana je koktelom proinflamacijskih medijatora u toku 48h (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i PGE₂) kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Nezrele i zrele DC obe grupe su obeležene antitelima specifičnim za ključne DC površinske markere pa zatim analizirane citofluorimetrijom. Brojevi u gornjem desnom uglu pojedinačnih histograma predstavljaju prosečne vrednosti intenziteta fluorescence unutar selektovanih populacija (ograda je prikazana na adekvatnom FS/SS log dijagramu). Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog donora od pet nezavisnih eksperimenata. Ir-PE i Ir-FITC predstavljaju nespecifične fluorescence u prisustvu irelevantnog (Ir) mišjeg monoklonskog antitela konjugovanog određenim fluorohromom.

4.2.2. Produkcija citokina od strane MoDC i MoLC

MoDC i MoLC proizvode polarizacijske citokine koji su neophodni za usmeravanje Th imunskog odgovora. Kako bi se procenila ova sposobnost, u supernatantima kultura obe subpopulacije DC izmerene su koncentracije pomenutih citokina ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml i standardizovane za 1×10^6 MoLC/ml kulture.

U supernatantima kultura nezrelih MoDC i MoLC određene su koncentracije IL-12, IL-23, IL-27, IL-10, IL-6 i TNF- α , a u supernatantima kultura MoDC i MoLC stimulisanih sa standardnim proinflamacijskim koktelom izmereni su nivoi IL-12, IL-23, IL-27 i IL-10. Međusobnim poređenjem dobijenih vrednosti pokazano je da su nezrele MoLC proizvodile znatno manje količine IL-12 i TNF- α , a znatno više IL-23 u poređenju sa nezrelim MoDC. Razlike u produkciji IL-6, IL-10 i IL-27 nisu bile statistički značajne (*Grafikon 7*). Odnos IL-12 / IL-10 je bio statistički značajno niži u kulturi nezrelih MoLC u poređenju sa nezrelim MoDC ($0,04 \pm 0,02 / 0,16 \pm 0,05$, $p < 0,001$).

U kulturama zrelih MoLC detektovane su znatno veće koncentracije IL-12 i IL-23, a znatno manje koncentracije IL-10 u poređenju sa zrelim MoDC. Nije bilo razlike u produkciji IL-27 između ove dve ćelijske subpopulacije (*Grafikon 7*). Odnos IL-12 / IL-10 je bio statistički značajno veći u kulturi zrelih MoLC u poređenju sa zrelim MoDC ($0,44 \pm 0,04 / 0,09 \pm 0,01$, $p < 0,001$).



Grafikon 7. Poređenje produkcija citokina u supernatantima kultura MoDC i MoLC.

Koncentracije citokina određivane su ELISA testovima u supernatantima MoDC i MoLC (1×10^6 / ml) kultivisanih bez ili u prisustvu proinflamacijskog koktela (TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂) u toku 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 5 različitih eksperimenata).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa nezrelim ili zrelim MoLC

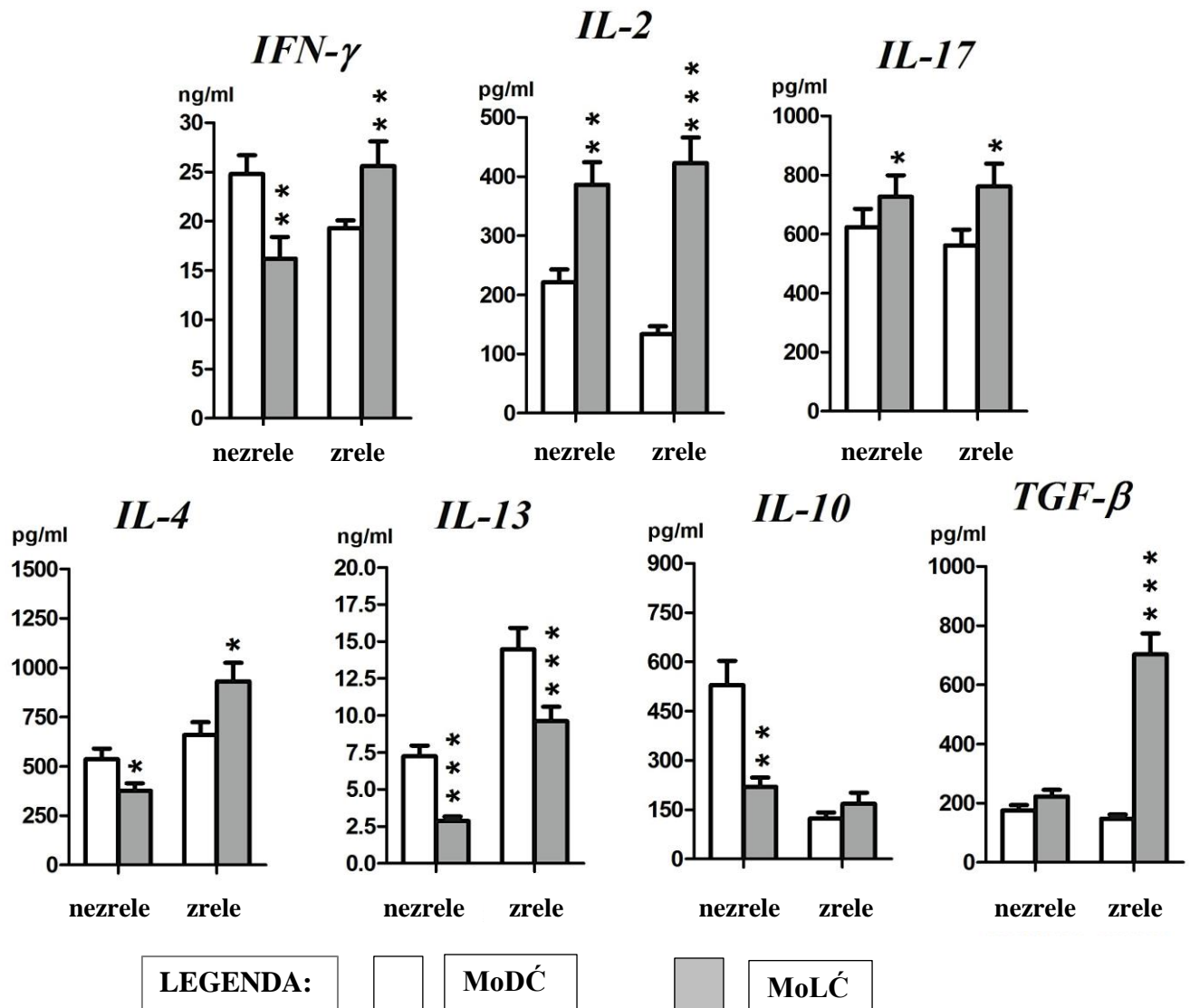
4.2.3. Produkcija citokina u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoDC⁺ ili MoLC⁺

Razlika u sposobnosti MoDC⁺ i MoLC⁺ da usmere Th imunski odgovor je testirana merenjem nivoa citokina u njihovim petodnevnim kokulturama sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Koncentracije citokina u supernatantima kokultura su određene ELISA testovima i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izraženi u pg/ml ili ng/ml kultura.

Nezrele MoLC⁺ su bili slabiji stimulatori produkcije IFN- γ , IL-4, IL-13 i IL-10, a bolji stimulatori produkcije IL-2 i IL-17 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa nezrelim MoDC⁺ (*Grafikon 8*).

Suprotno ovim nalazima, zrele MoLC⁺ su snažnije indukovale sekreciju IFN- γ , IL-2 i IL-17 u ko-kulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa zrelim MoDC⁺. Interesantan je nalaz za Th2 citokine. Nivo IL-4 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa zrelim MoLC⁺ je bio viši u poređenju sa kokulturom CD4⁺ T-limfocita i zrelim MoDC⁺. Suprotni rezultati su dobijeni za IL-13. Takođe, produkcija TGF- β u kokulturama zrelih MoLC⁺ sa CD4⁺ T-limfocitima je bila veća u poređenju sa kokulturom sa zrelim MoDC⁺ (*Grafikon 8*).

Analizom međusobnih odnosa Th polarizujućih citokina pokazano je da su odnosi IFN- γ / IL-13 bili viši u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoLC⁺ nezavisno od njihove zrelosti, u poređenju sa MoDC⁺, pri čemu se odnosi IFN- γ / IL-4 nisu razlikovali. Takođe, odnosi IFN- γ / IL-17 su bili niži, a odnosi IFN- γ / IL-10 i IL-2 / TGF- β su bili viši u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita sa nezrelim MoLC⁺, u poređenju sa nezrelim MoDC⁺. Odnos IL-2 / TGF- β je bio niži u kokulturi CD4⁺ T-limfocita i zrelih MoLC⁺, u poređenju sa zrelim MoDC⁺, dok u odnosima IFN- γ / IL-17 i IFN- γ / IL-10 nije bilo razlike između pomenutih kokultura (*Tabela 5*).



Grafikon 8. Poređenje produkcija citokina u supernatantima kokultura MoDC ili MoLC sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima.

Nezrele MoDC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLC dodatkom TGF- β ovom diferencijacijskom koktelu. Obe subpopulacije DC su potom tretirane standardnim maturacijskim koktelom (TNF- α , IL-6, IL-1 β i PGE₂) tokom 2 dana. Alogeni CD4⁺ T-limfociti (1×10^5) su kultivisani 5 dana u prisustvu nezrelih ili zrelih DC (1×10^4). U kokulturu je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i jonomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h inkubacije. Vrednosti citokina izmerene su ELISA testovima (IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13, IL-10 i TGF- β) i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 Plex). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost koncentracije citokina iz pet nezavisnih eksperimenata \pm SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kontrolnim, nezrelim MoDC ili MoLC

Tabela 5. Analiza međusobnih odnosa Th citokina u kokulturama alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ ili MoDĆ.

Citokini	Odnos Th citokina					
	NEZRELE			ZRELE		
	MoDĆ	MoLĆ	Stat. znač.	MoDĆ	MoLĆ	Stat. znač.
IFN- γ / IL-4	46,4 \pm 3,2	43,8 \pm 3,6	p > 0,05	30,0 \pm 3,8	27,6 \pm 0,3	p > 0,05
IFN- γ /IL-13	3,2 \pm 0,2	5,9 \pm 0,5	p < 0,01	1,3 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	p < 0,001
IFN- γ /IL-17	40,6 \pm 0,6	23,0 \pm 1,8	p < 0,001	34,2 \pm 3,7	33,8 \pm 2,3	p > 0,05
IFN- γ /IL-10	47,0 \pm 9,4	75,4 \pm 2,0	p < 0,001	156,8 \pm 20,6	150,4 \pm 21,0	p > 0,05
IL-2/TGF- β	1,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,7	p < 0,01	0,9 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1	p < 0,01

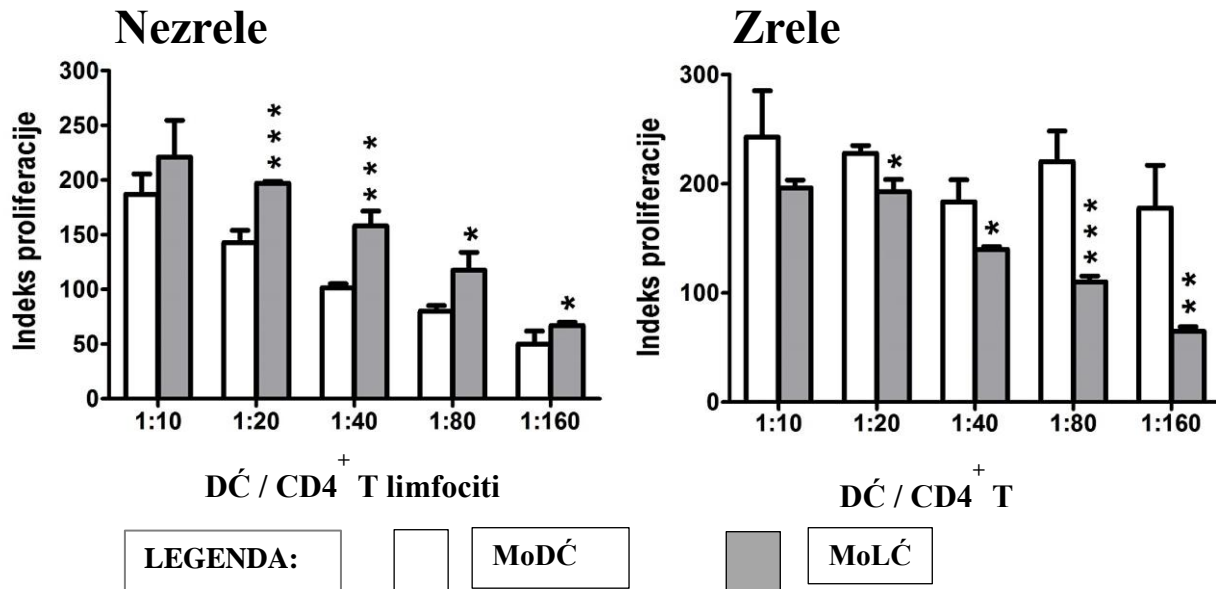
Nezrele MoDĆ su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLĆ dodatkom TGF- β ovom diferencijacijskom koktelu. Obe subpopulacije DĆ su potom tretirane standardnim maturacijskim koktelom (TNF- α , IL-6, IL-1 β i PGE₂) tokom 2 dana. Alogeni CD4⁺ T-limfociti (1 x 10⁵) su kultivisani 5 dana u prisustvu nezrelih ili zrelih DĆ (1 x 10⁴). U kokulturu DĆ i CD4⁺ T-limfocita je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i Jonomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h kultivacije. Vrednosti IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17, IL-10 i TGF- β su izmerene ELISA testovima, a IL-2 metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 11 Plex). Iz količnika ovih citokina, dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata, izračunate su prosečne vrednosti \pm SD, a potom upoređene Studentovim t-testom.

4.2.4. Potencijal alostimulacije MoDĆ i MoLĆ

Na *Grafikonu 9* je prikazana razlika u proliferaciji alogenih CD4⁺ T-limfocita u zavisnosti od toga da li su bili u kokulturi sa MoDĆ ili MoLĆ. Sposobnost proliferacije je procenjena na osnovu analize ugradnje [³H]-timidina u ove limfocite. Rezultati su predstavljeni u obliku indeksa proliferacije koji se izračunava kao što je opisano u *Materijalima i metodama*.

CD4⁺ T-limfociti stimulisani od strane nezrelih MoLĆ su snažnije proliferisali u odnosu na CD4⁺ T-limfocite stimulisane sa nezrelim MoDĆ (*Grafikon 9*).

Nakon sazrevanja u prisustvu koktela proinflamacijskih medijatora, aloreaktivni stimulatorni kapacitet se promenio u korist MoDC, tako da je aloreaktivna sposobnost zrelih MoLC bila slabija od zrelih MoDC (*Grafikon 9*).



Grafikon 9. Poređenje potencijala alostimulacije MoDC i MoLC.

Nezrele MoDC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLC dodatkom TGF- β ovom diferencijacijskom koktelu. MoDC i MoLC su sazrele nakon stimulacije koktelom proinflamacijskih medijatora (TNF- α , IL-6, IL-1 β i PGE₂) u toku 2 dana. Nezrele i zrele MoDC i MoLC su potom kultivisane u dvostruko-opadajućem broju (1×10^4 – 0.0625×10^4) sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U toku poslednjih 18h kulture je dodat [³H] timidin, nakon čega je radioaktivnost izmerena kao broj radioaktivnih raspada u minuti (engl. counts per minute, c.p.m.) kao što je opisano u *Materijalima i metodama*. Na grafiku su predstavljeni rezultati u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) \pm SD dobijenog od iz pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule: $IP = \frac{c.p.m. (MoDC(LC)/CD4^+ T\text{-limfocitna ko-kultura})}{[c.p.m. (sami CD4^+ T\text{-limfociti}) + c.p.m. (sami MoDC(LC))]}$. Spontana ugradnja [³H] timidina u kulturama samih CD4⁺ T-limfocita, odnosno samih DC oba tipa, izračunata je iz petplikata dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata. Broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih CD4⁺ T-limfocita je bio 402 ± 53 c.p.m; broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih MoDC ili MoLC, nezavisno od broja i maturanog statusa, je bio 82 ± 20 c.p.m. (odgovara nivou prirodnog fona zračenja).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kontrolnim, nezrelim MoDC ili MoLC.

4.3. Uticaj Poly(I:C) i curdlana na fenotipska svojstva i funkcije MoLĆ

U narednim ispitivanjima proučavan je uticaj pojedinačne i kombinovane primene imunomodulacijskih supstanci Poly(I:C) i curdlana na fenotipska svojstva i funkcije MoLĆ.

4.3.1. Fenotipske karakteristike MoLĆ

Fenotipske karakteristike MoLĆ su određene citofluorimetrijskom analizom vezivanja antitela usmerenih protiv površinskih molekula na ovim ćelijama. Rezultati su prikazani u obliku procenta MoLĆ koje su ispoljile pomenute molekule i kao srednja vrednost intenziteta njihove ekspresije.

Stimulacija MoLĆ sa Poly(I:C) ili curdlanom je dovela do fenotipskog sazrevanja ovih ćelija, što se može zaključiti na osnovu snažnije ekspresije HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD40, CD54 i CCR7 molekula, u poređenju sa kontrolnim, nestimulisanim MoLĆ (*Tabela 6, Grafikon 10*). Kombinovani tretman Poly(I:C) i curdlanom je doveo do povećanja ekspresije CD80, CD40 i CCR7 molekula na MoLĆ, u odnosu na ćelije koje su bile pojedinačno stimulisane Poly(I:C) ili curdlanom, dok je nivo ekspresije HLA-DR ostao nepromenjen. Kombinovana primena Poly(I:C) i curdlana je, takođe, povećala ekspresiju CD86, CD83 i CD54 molekula na MoLĆ u odnosu na tretman curdlanom, odnosno nije izmenila njihovu ekspresiju u poređenju sa samim Poly(I:C) (*Tabela 6, Grafikon 10*).

Tabela 6. Fenotipske karakteristike MoLĆ sazrelih u prisustvu Poly(I:C), curdLANa i njihove kombinacije.

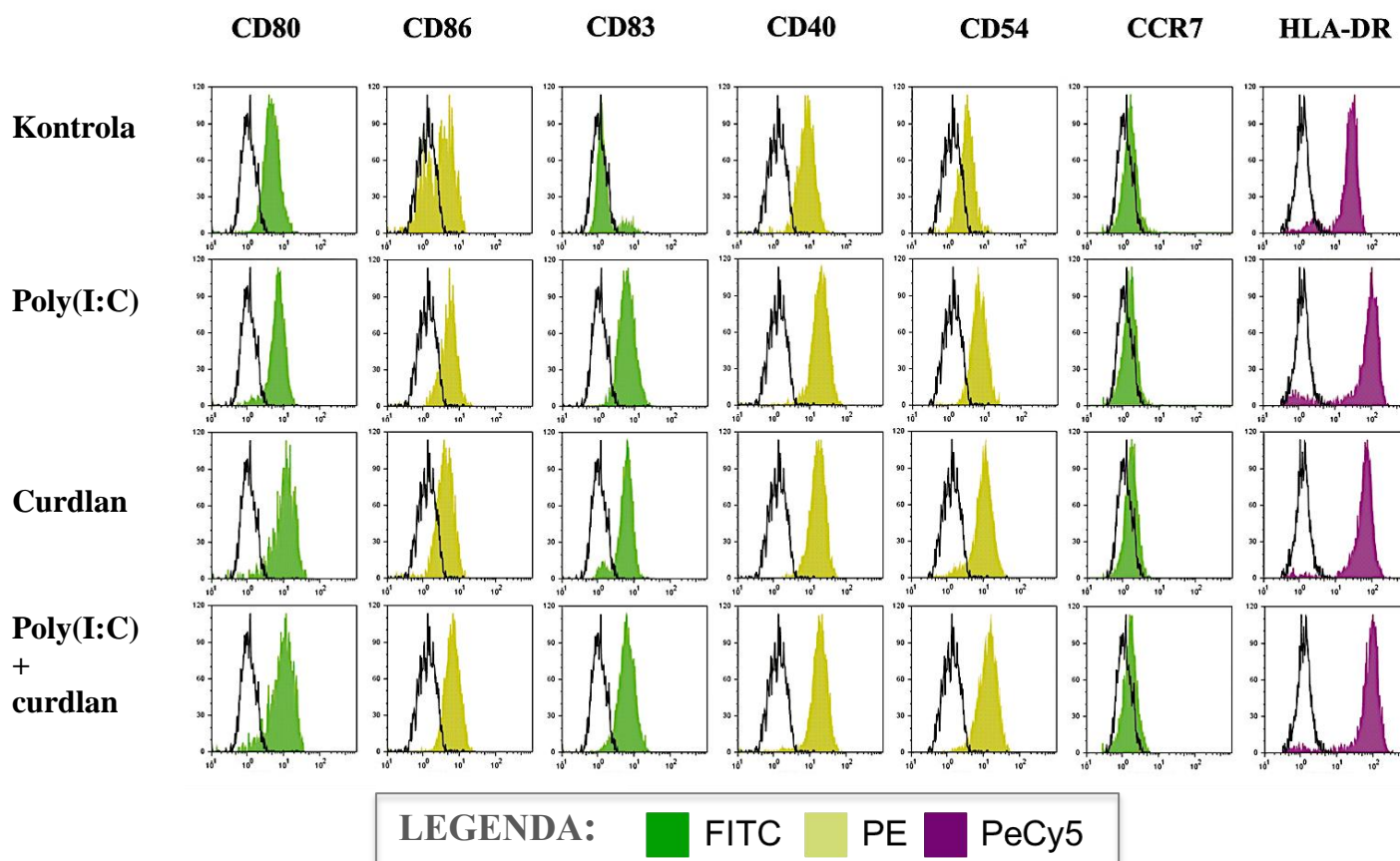
		<i>MoLĆ, 48h</i>			
		<i>Kontrola</i>	<i>Poly(I:C)</i>	<i>Curdlan</i>	<i>Poly(I:C)+Curdlan</i>
<i>HLA-DR</i>	<i>%±SD</i>	85,2 ± 5,4	89,1 ± 1,7	96,7 ± 2,5 *	94,2 ± 4,3
	<i>mfi±SD</i>	4,7 ± 3,0	22,2 ± 6,4 *	10,0 ± 2,0	11,3 ± 4,9
<i>CD86</i>	<i>%±SD</i>	39,7 ± 6,1	79,9 ± 6,7 **	65,5 ± 4,5 **	81,6 ± 7,1 ***, ^
	<i>mfi±SD</i>	4,1 ± 1,1	10,6 ± 2,5 ***	8,7 ± 2,1 **	11,6 ± 1,8 ***
<i>CD80</i>	<i>%±SD</i>	74,7 ± 4,0	89,5 ± 8,6	93,8 ± 3,2 **	88,1 ± 4,5 *
	<i>mfi±SD</i>	8,5 ± 1,8	28,0 ± 5,8 *	24,6 ± 3,6 *	41,1 ± 2,3 ***, # # #, ^ ^ ^
<i>CD40</i>	<i>%±SD</i>	87,5 ± 5,0	93,4 ± 1,8	94,1 ± 5,9	89,4 ± 6,9
	<i>mfi±SD</i>	21,8 ± 7,9	45,3 ± 2,4 **	40,4 ± 2,9 *	52,3 ± 3,5 **, #, ^
<i>CD83</i>	<i>%±SD</i>	27,4 ± 3,5	77,4 ± 2,3 ***	60,6 ± 3,1 ***	77,6 ± 3,3 ***, ^ ^
	<i>mfi±SD</i>	6,9 ± 3,1	16,8 ± 1,7 **	13,2 ± 1,1 **	13,6 ± 4,4 **
<i>CD54</i>	<i>%±SD</i>	56,8 ± 5,1	82,8 ± 2,4 ***	81,1 ± 5,4 **	83,9 ± 3,1 ***
	<i>mfi±SD</i>	4,3 ± 0,9	2,2 ± 0,6	13,1 ± 3,1 ***	4,9 ± 0,8 ^ ^ ^
<i>CCR7</i>	<i>%±SD</i>	2,8 ± 0,9	10,8 ± 1,6 ***	5,7 ± 0,7 **	13,6 ± 1,4 ***, # #, ^ ^ ^
	<i>mfi±SD</i>	2,6 ± 0,4	6,4 ± 0,5 ***	1,7 ± 0,3 *	6,2 ± 0,5 ***, ^ ^ ^

MoLĆ su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF-β. Maturacija nezrelih MoLĆ je indukovana Poly(I:C), curdLANom ili njihovom kombinacijom u toku 48h kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Nezrele i zrele MoLĆ obeležene su antitelima specifičnim za ključne DĆ površinske markere a zatim analizirane na protočnom citometru. Rezultati iz pet nezavisnih eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija (% ± SD) i kao srednja vrednost intenziteta ekspresije (engl. mean fluorescence intensity, mfi ± SD).

* = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, u poređenju sa kontrolnim, nestimulisanim MoLĆ

= p < 0,05, ## = p < 0,01, ### = p < 0,001, u poređenju sa MoLĆ stimulisanim Poly(I:C)

^ = p < 0,05, ^ ^ = p < 0,01, u poređenju sa MoLĆ stimulisanim curdLANom



Grafikon 10. Fenotipske karakteristike MoLĆ sazrelih u prisustvu Poly(I:C), curdlana i njihove kombinacije.

MoLĆ su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β . Maturacija nezrelih MoLĆ je indukovana Poly(I:C), curdlanom ili njihovom kombinacijom u toku 48h kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. MoLĆ su obeležene antitelima specifičnim za ključne DĆ površinske markere (anti-HLA-DR-PeCy5, anti-(CD80, CD83 i CCR7)-FITC i anti-(CD86, CD40 i CD54)-PE) pa zatim analizirane protočnom citofluorimetrijom. Prazni histogrami odgovaraju Ir-FITC, Ir-PE i Ir-PeCy5, i predstavljaju nespecifičnu fluorescenciju dobijenu korišćenjem irelevantnog (Ir) mišjeg monoklonskog antitela konjugovanog adekvatnim fluorohromom, koja ne reaguju sa humanim ćelijama. Prikazani su histogrami fluorescencije iz jednog reprezentativnog od pet nezavisnih eksperimenata.

4.3.2. Produkcija citokina od strane MoLĆ

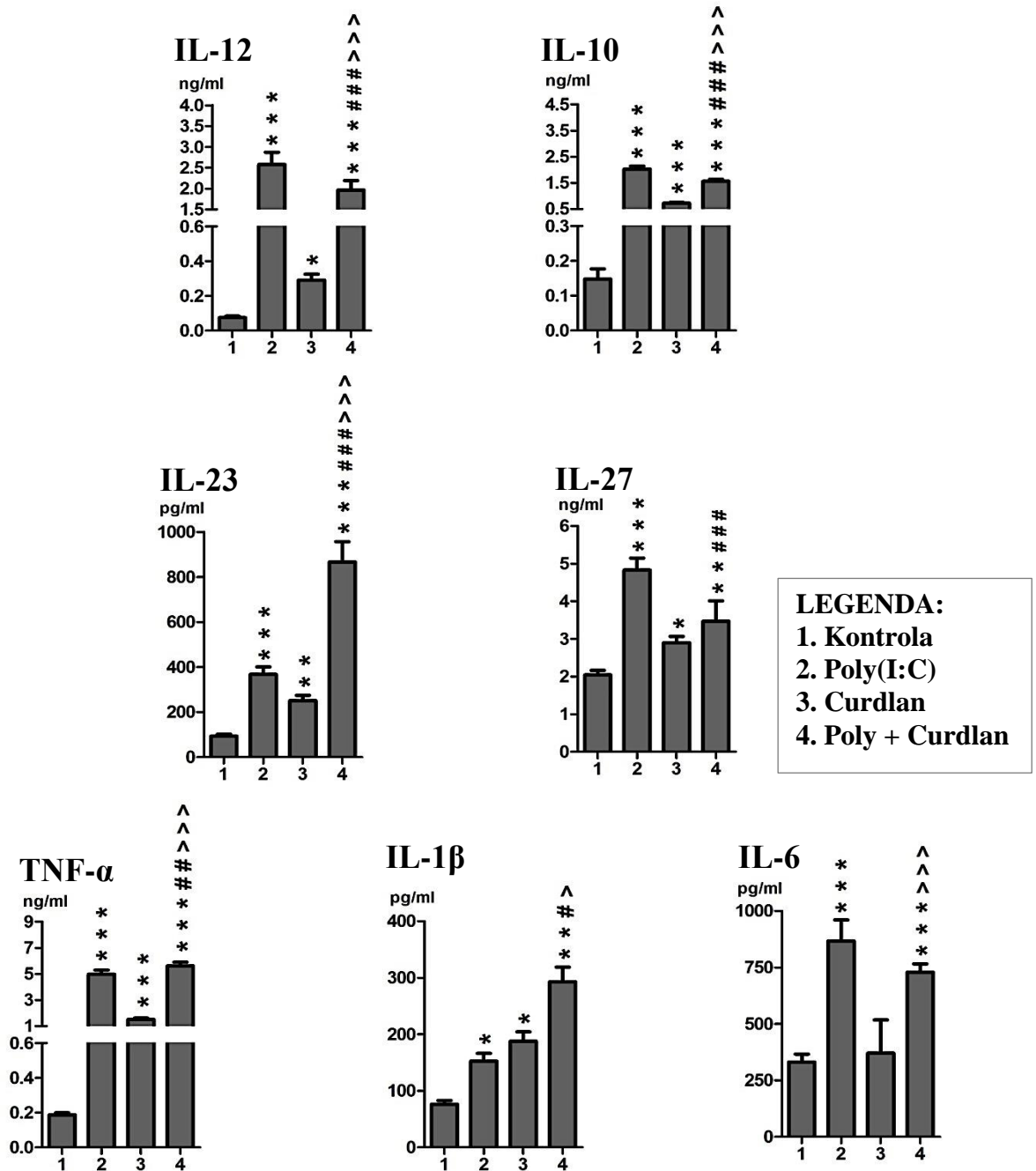
Sposobnost MoLĆ da produkuju polarizacijske citokine utvrđena je ELISA metodom u supernatantima njihovih kultura nakon dvodnevne pojedinačne ili kombinovane stimulacije Poly(I:C) i curdlanom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml kulture i standardizovane za 1×10^6 ćelija/ml kulture.

Tretman MoLĆ sa Poly(I:C) je doveo do povećanja produkcije IL-12, IL-10, IL-23, IL-27, TNF- α , IL-1 β i IL-6 u odnosu na nestimulisane, kontrolne MoLĆ (**Grafikon 11**).

Curdlan je povećao sekreciju svih navedenih citokina od strane MoLĆ, izuzev produkcije IL-6 koja je ostala nepromenjena u poređenju sa nestimulisanim MoLĆ. Nivo produkovanih citokina je bio niži nego u kulturama stimulisanim sa Poly(I:C), osim IL-1 β čija je produkcija bila slična (**Grafikon 11**).

Kombinacija Poly(I:C) i curdlana je dovela do povećanja produkcije TNF- α , IL-1 β i IL-23, a sniženja produkcije IL-12, IL-10 i IL-27, u odnosu na sam Poly(I:C), dok sekrecija IL-6 nije bila promenjena (**Grafikon 11**).

Ova kombinacija agonista je, takođe, dovela i do povećanja produkcije IL-12, IL-10, IL-23, TNF- α , IL-1 β i IL-6, i nije promenila sekreciju IL-27, u poređenju sa curdlanom (**Grafikon 11**). Odnos u produkciji IL-12 / IL-10 je bio veći u kulturi MoLĆ stimulisanih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim curdlanom ($1,35 \pm 0,12 / 0,42 \pm 0,04$, $p < 0,001$).



Grafikon 11. Produkcija citokina od strane MoLC sazrelih u prisustvu Poly(I:C), curdlana i njihove kombinacije.

Koncentracije citokina određivane su ELISA testovima u supernatantima nestimuliranih MoLC i MoLC stimuliranih Poly(I:C), curdlanom ili njihovom kombinacijom u toku 48h (1×10^6 / ml). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost iz pet nezavisnih eksperimenata \pm SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kontrolnim, nestimuliranim MoLC

= $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$, u poređenju sa MoLC stimuliranim Poly(I:C)

^ = $p < 0,05$, ^^ = $p < 0,01$, ^^ ^ = $p < 0,001$ u poređenju sa MoLC stimuliranim curdlanom

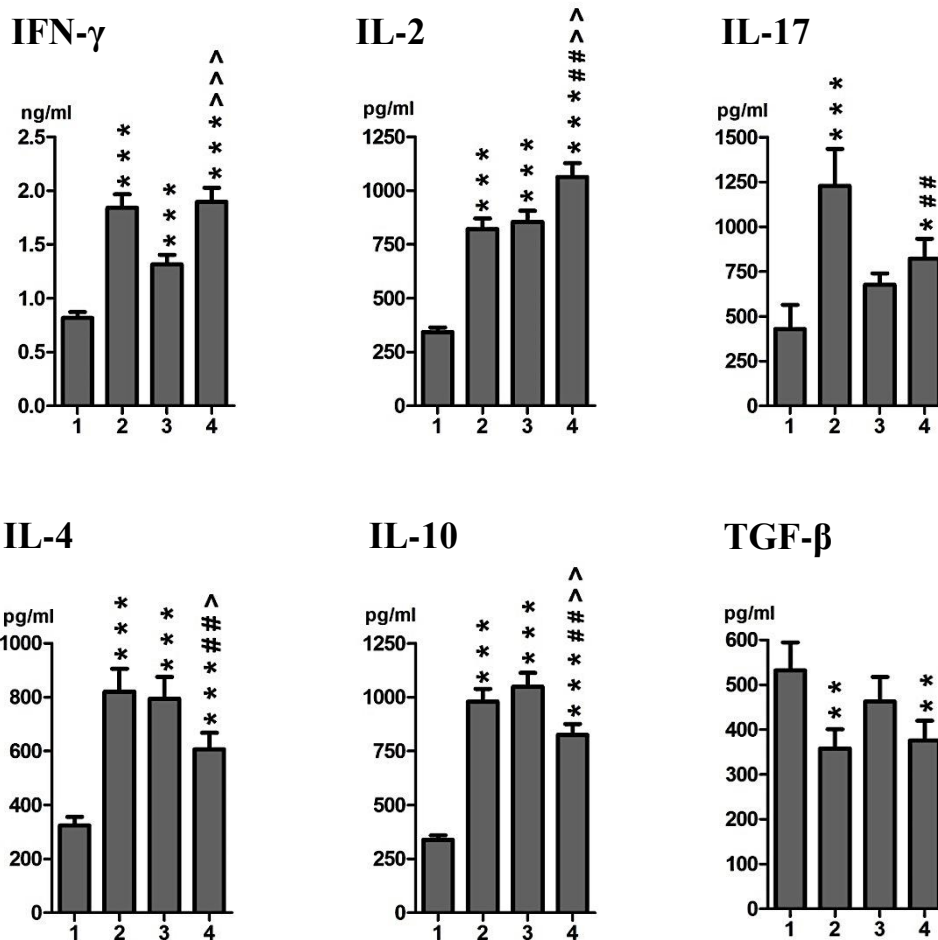
4.3.3. Produkcija citokina u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita i MoLĆ

Th imunski odgovor *in vitro* je ispitivan na osnovu nivoa produkovanih citokina u supernatantima kokultura alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ. Koncentracije citokina u supernatantima kokultura su određene ELISA testovima i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml.

MoLĆ tretirane Poly(I:C) ili curdlanom su snažnije stimulisale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-4 i IL-10 u kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa kontrolnim, nestimulisanim MoLĆ (**Grafikon 12**). Nije bilo razlike u odnosu IFN- γ / IL-4 između ko-kultura CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim Poly(I:C), u poređenju sa nestimulisanim MoLĆ ($2,54 \pm 0,22$ / $2,33 \pm 0,27$, $p \geq 0,05$). S druge strane, odnos IFN- γ / IL-4 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim curdlanom bio je niži u poređenju sa nestimulisanim MoLĆ ($2,54 \pm 0,22$ / $1,72 \pm 0,23$, $p < 0,01$).

Produkcija IL-17 je bila snažnija, a produkcija TGF- β slabija u ćelijskim kokulturama gde su kao stimulatori korišćene MoLĆ tretirane Poly(I:C), u poređenju sa kokulturama sa kontrolnim, nestimulisanim MoLĆ, dok u kokulturi sa MoLĆ tretiranim curdlanom nije bilo promene u produkciji ova dva citokina (**Grafikon 12**).

MoLĆ tretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su snažnije indukovale produkciju IL-2, slabije IL-4 i IL-10, i nisu uticale na sekreciju TGF- β , u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim Poly(I:C) ili curdlanom. MoLĆ tretirane kombinacijom ovih agonista su slabije stimulisale produkciju IL-17 i nisu uticale na produkciju IFN- γ , u odnosu na MoLĆ tretirane Poly(I:C), dok su ispoljile upravo suprotan efekat na produkciju ovih citokina u poređenju sa MoLĆ tretiranim curdlanom (**Grafikon 12**). Odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 je bio veći u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim Poly(I:C) ($3,21 \pm 0,43$ / $2,33 \pm 0,27$, $p < 0,01$) ili curdlanom ($3,21 \pm 0,43$ / $1,72 \pm 0,23$, $p < 0,001$).

**LEGENDA:**

1. Kontrola; 2. Poly(I:C); 3. Curdlan; 4. Poly(I:C) + curdlan

Grafikon 12. Produkcija citokina u supernatantima kokultura alogenih CD4⁺ T-limfocita i MoLČ.

Nezrele MoLČ su dobijene iz monocita nakon šestodnevne stimulacije GM-CSF, IL-4 i TGF-β, a zatim su bile pojedinačno ili kombinovano tretirane Poly(I:C) i curdlanom u toku 2 dana. MoLČ (1×10^4) su potom kultivisane sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U kokulturu je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i Jomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h kultivacije. Vrednosti citokina izmerene su ELISA testovima (IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-13, IL-10 i TGF-β) i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 11 Plex). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina iz pet nezavisnih eksperimenata ± SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa nestimulisanim, kontrolnim MoLČ

= $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$, u poređenju sa MoLČ tretiranim Poly(I:C)

^ = $p < 0,05$, ^ ^ = $p < 0,01$, ^ ^ ^ = $p < 0,001$, u poređenju sa MoLČ tretiranim curdlanom

4.3.4. Potencijal alostimulacije MoLĆ

Razlika u sposobnosti MoLĆ da, u zavisnosti od vrste pretretmana, stimulišu proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita, procenjena je na osnovu analize ugradnje [³H]-timidina u ove limfocite. Rezultati su prikazani u obliku indeksa proliferacije koji se izračunava kao što je opisano u *Materijalima i metodama*.

MoLĆ tretirane u prisustvu Poly(I:C) su snažnije stimulisale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u višim MoLĆ:CD4⁺ T-odnosima (1:10 - 1:40), dok su MoLĆ tretirane curdlanom snažnije stimulisale proliferaciju ovih limfocita u svim određivanim MoLĆ:CD4⁺ T-odnosima (1:10 - 1:160), u poređenju sa kontrolnim, nestimulisanim MoLĆ (*Grafikon 13*).

MoLĆ su nakon kombinovanog tretmana Poly(I:C) i curdlanom snažnije indukovale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita pri višim odnosima MoLĆ:CD4⁺ T (1:10, 1:20), u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim Poly(I:C) ili curdlanom (*Grafikon 13*).

4.4. Razlike u fenotipskim i funkcionalnim osobinama između MoDC i MoLC stimuliranih Poly(I:C) i curdlanom

U nastavku procene imunobioloških svojstava MoLC uporedili smo njihove fenotipske i funkcionalne karakteristike sa MoDC, nakon pojedinačne ili kombinovane stimulacije imunomodulacijskim supstancama, Poly(I:C) i curdlanom.

4.4.1. Fenotipske karakteristike MoDC i MoLC

Fenotipske osobine MoDC i MoLC su opisane korišćenjem kombinacije antitela usmerenih protiv površinskih molekula na ovim ćelijama. Rezultati vezivanja antitela su analizirani metodom protočne citofluorimetrije i prikazani su u obliku procenta MoDC i MoLC koje su ispoljile pomenute molekule i kao srednja vrednost intenziteta njihove ekspresije.

Kod MoLC pojedinačno tretiranih sa Poly(I:C) ili curdlanom došlo je do snažnije ekspresije CD40, niže ekspresije HLA-DR, dok ekspresija CD86 nije bila bitnije promenjena u poređenju sa MoDC (*Tabela 7*).

Tretman MoLC sa Poly(I:C) je doveo do povećanja ekspresije CD80 i CCR7 i sniženja CD83 i CD54, u odnosu na MoDC. S druge strane, MoLC su nakon stimulacije curdlanom pokazale snažniju ekspresiju CD83, a slabiju CD54 i CCR7, u poređenju sa MoDC (*Tabela 7*).

MoLC tretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su povećale ekspresiju CD86, CD80, CD40 i CCR7, snizile CD83 i CD54, i nisu promenile ekspresiju HLA-DR, u odnosu na MoDC (*Tabela 7*).

Tabela 7. Poređenje fenotipskih karakteristika između MoDĆ i MoLĆ nakon pojedinačne i kombinovane stimulacije Poly(I:C) i curdlanom.

		<i>MoDĆ 48h / MoLĆ 48h</i>							
		<i>Kontrola</i>		<i>Poly(I:C)</i>		<i>Curdlan</i>		<i>Poly(I:C)+curdlan</i>	
		<i>MoDĆ</i>	<i>MoLĆ</i>	<i>MoDĆ</i>	<i>MoLĆ</i>	<i>MoDĆ</i>	<i>MoLĆ</i>	<i>MoDĆ</i>	<i>MoLĆ</i>
HLA-DR	<i>%±SD</i>	95,1 ± 3,0	85,2 ± 5,4 ***	96,5 ± 2,7	89,1 ± 1,7 ***	97,8 ± 1,5	96,7 ± 2,5	97,1 ± 2,0	94,2 ± 4,3
	<i>mfi±SD</i>	11,8 ± 2,7	4,7 ± 3,0**	30,9 ± 6,7	22,2 ± 6,4***	22,5 ± 1,9	10,0 ± 2,0 ***	12,7 ± 2,8	11,3 ± 4,9
CD86	<i>%±SD</i>	38,8 ± 8,7	39,7 ± 6,1	78,8 ± 10,9	79,9 ± 6,7	76,7 ± 7,1	65,5 ± 4,5	73,9 ± 9,3	81,6 ± 7,1
	<i>mfi±SD</i>	6,0 ± 0,8	4,1 ± 1,1	10,4 ± 1,9	10,6 ± 2,5	9,2 ± 0,8	8,7 ± 2,1	8,9 ± 0,9	11,6 ± 1,8*
CD80	<i>%±SD</i>	87,0 ± 4,3	74,7 ± 4,0***	94,1 ± 3,7	89,5 ± 8,6	92,8 ± 6,5	93,8 ± 3,2	93,1 ± 4,0	88,1 ± 4,5
	<i>mfi±SD</i>	14,1 ± 1,6	8,5 ± 1,8 **	20,8 ± 2,8	28,0 ± 5,8 *	21,8 ± 1,2	24,6 ± 3,6	21,5 ± 1,6	41,1 ± 2,3 ***
CD40	<i>%±SD</i>	77,8 ± 5,3	87,5 ± 5,0 **	89,0 ± 2,3	93,4 ± 1,8	83,6 ± 2,8	94,1 ± 5,9 **	80,9 ± 6,3	89,4 ± 6,9*
	<i>mfi±SD</i>	28,6 ± 1,9	21,8 ± 7,9 *	35,7 ± 2,9	45,3 ± 1,4 **	42,6 ± 1,8	40,4 ± 2,9	26,3 ± 6,7	52,3 ± 3,5 ***
CD83	<i>%±SD</i>	27,8 ± 9,3	27,4 ± 3,5	85,0 ± 3,9	77,4 ± 2,3 *	48,6 ± 5,2	60,6 ± 3,1 ***	88,7 ± 3,6	77,6 ± 3,3 **
	<i>mfi±SD</i>	10,0 ± 1,7	6,9 ± 3,1*	15,7 ± 2,7	16,8 ± 1,7	11,3 ± 0,5	13,2 ± 1,1 *	14,3 ± 2,8	13,6 ± 2,4
CD54	<i>%±SD</i>	65,6 ± 2,0	56,8 ± 5,1 **	91,9 ± 3,8	82,8 ± 2,4 ***	90,0 ± 4,1	81,1 ± 5,4 **	93,2 ± 3,5	83,9 ± 3,1 **
	<i>mfi±SD</i>	2,9 ± 1,6	4,3 ± 0,9	5,3 ± 1,2	2,2 ± 0,6 **	18,0 ± 2,5	13,1 ± 1,4 ***	11,6 ± 1,3	4,9 ± 0,8 ***
CCR7	<i>%±SD</i>	3,8 ± 0,8	2,8 ± 0,9	12,5 ± 0,7	10,8 ± 1,6 *	8,1 ± 0,5	5,7 ± 0,7 **	14,6 ± 1,7	13,6 ± 1,4
	<i>mfi±SD</i>	3,0 ± 0,3	2,6 ± 0,4	4,2 ± 0,4	6,4 ± 0,5 **	5,8 ± 0,7	1,7 ± 0,3 ***	4,9 ± 0,6	6,2 ± 0,5 *

MoDĆ su dobijene nakon šestodnevne kultivacije humanih monocita u prisustvu GM-CSF i IL-4, dok su MoLĆ nastale u prisustvu istog diferencijacionog koktela ali uz dodatak TGF-β. Maturacija nezrelih MoDĆ i MoLĆ je indukovana Poly(I:C), curdlanom ili njihovom kombinacijom u toku 48h kao što je opisano u poglavlju *Materijali i metode*. Nezrele i zrele MoLĆ su obeležene antitelima specifičnim za ključne DĆ površinske markere a zatim analizirane na protočnom citometru. Rezultati iz pet nezavisnih eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija ($\% \pm SD$) i kao srednja vrednost intenziteta ekspresije (engl. mean fluorescence intensity, $mfi \pm SD$).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa nezrelim ili zrelim MoDĆ

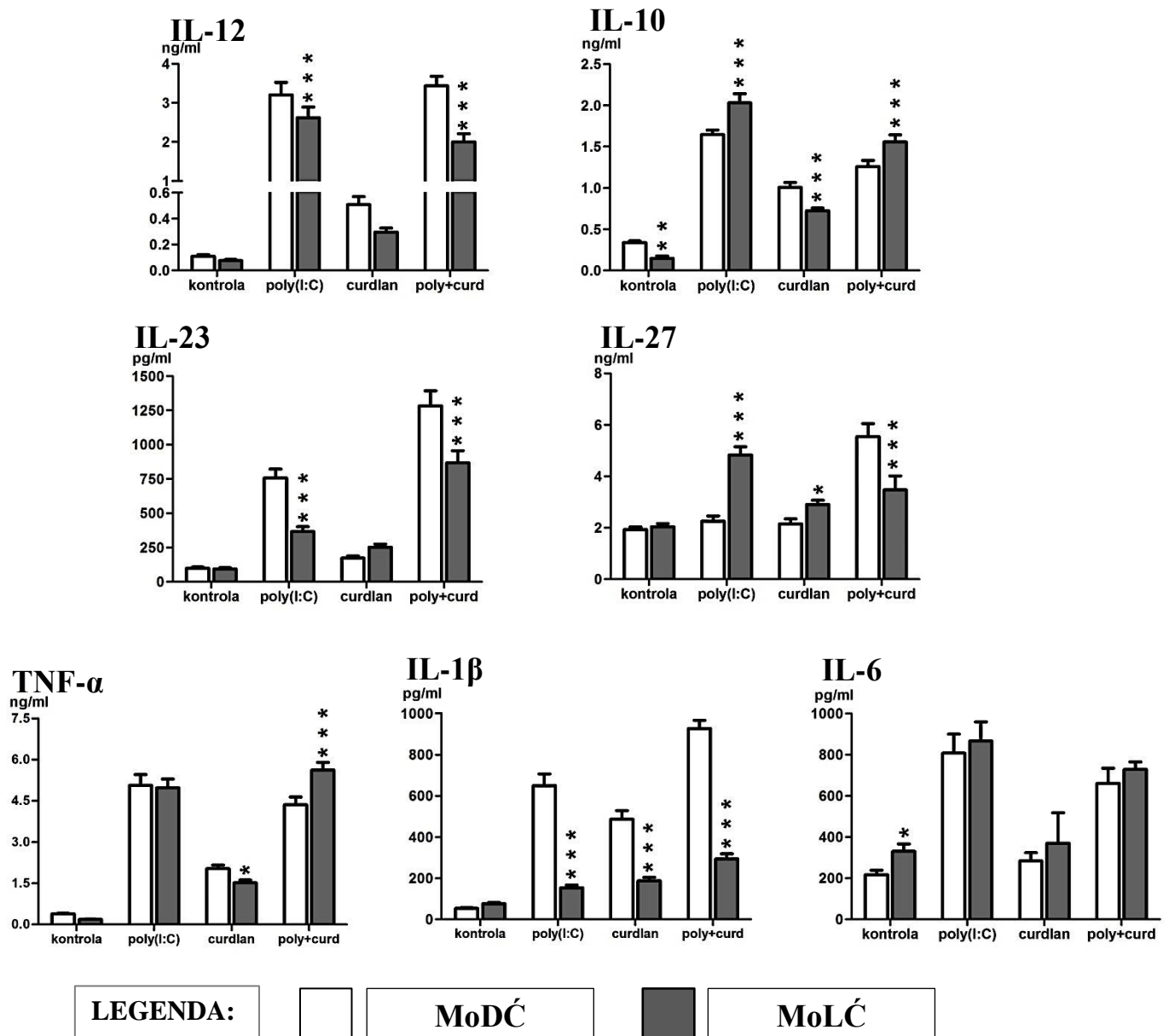
4.4.2. Produkcija citokina od strane MoDC i MoLC

Sposobnost MoDC i MoLC da proizvode citokine je određena u supernatantima njihovih dvodnevni kultura ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml i standardizovane za 1×10^6 MoLC/ml kulture.

U supernatantima kultura MoLC nakon tretmana sa Poly(I:C) je izmerena snažnija sekrecija IL-10 i IL-27, a slabija IL-12, IL-23 i IL-1 β , u poređenju sa MoDC. Nije uočena razlika u produkciji TNF- α i IL-6 između ovih subpopulacija DC (*Grafikon 14*).

U kulturama MoLC stimulisanih curdlanom je detektovana snažnija produkcija IL-27, a slabija TNF- α , IL-10 i IL-1 β , u poređenju sa MoDC. Nije bilo značajne razlike u sekreciji IL-12, IL-23, i IL-6 između ove dve grupe ćelija (*Grafikon 14*).

Kombinacija Poly(I:C) i curdlana je dovela do povećanja sekrecije IL-10 i TNF- α od strane MoLC u poređenju sa MoDC, ali je i dovela do smanjenja produkcije IL-12, IL-23, IL-27 i IL-1 β . Ove dve grupe DC se nisu bitnije razlikovale po produkciji IL-6 (*Grafikon 14*).



Grafikon 14. Razlike u produkciji citokina između MoDC i MoLC stimuliranih Poly(I:C), curdlanom i njihovom kombinacijom.

Nezrele MoDC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLC dodatkom TGF-β ovom diferencijacijskom koktelu. Koncentracije citokina određivane su ELISA testovima u supernatantima MoDC i MoLC (1×10^6 / ml) pre i nakon maturacije u prisustvu Poly(I:C), curdлана ili njihove kombinacije u toku 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n = 5 različitih eksperimenata).

* = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa nezrelim ili zrelim MoDC

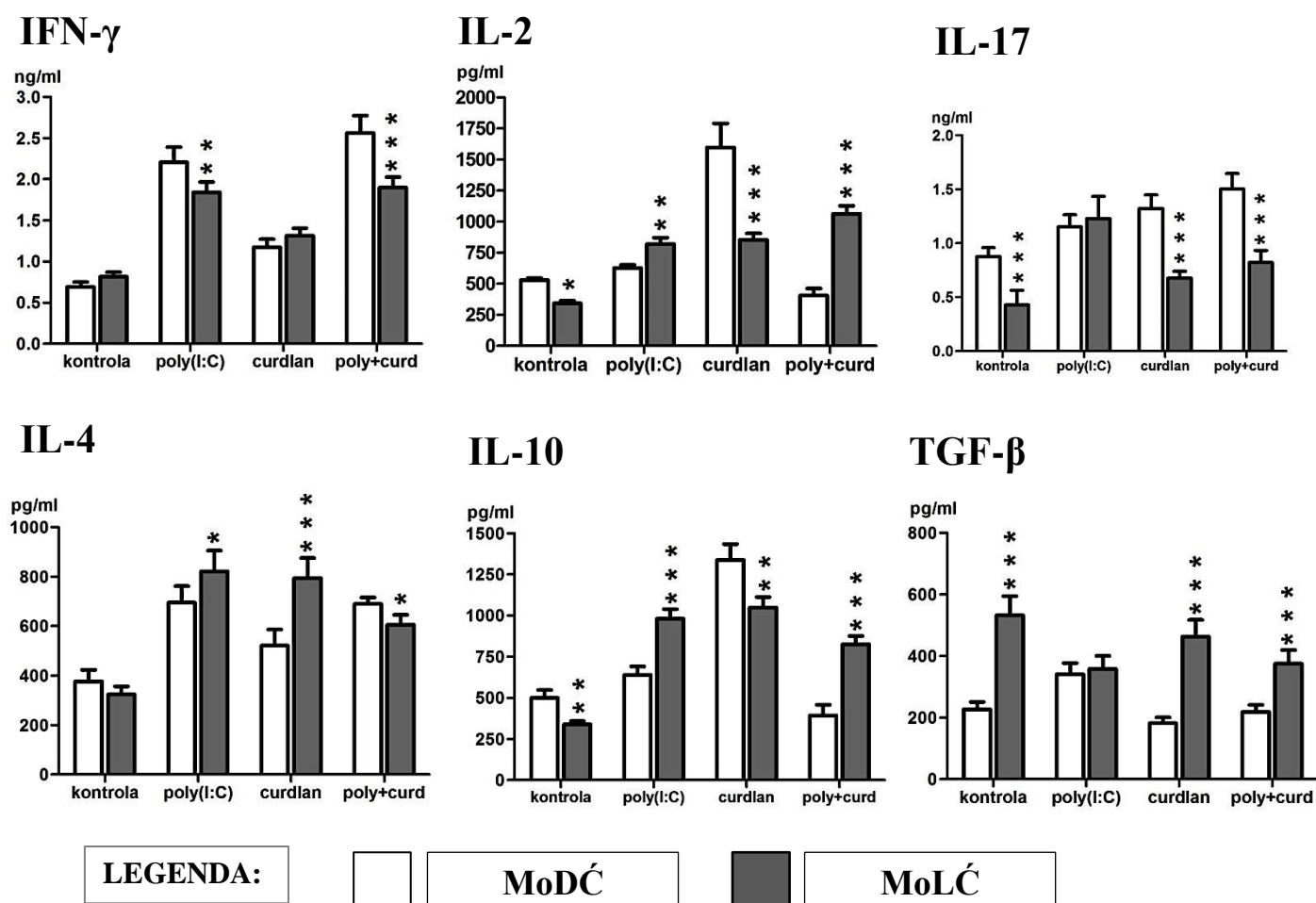
4.4.3. Produkcija citokina u kokulturama alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoDC ili MoLC

U cilju *in vitro* proučavanja sposobnosti DC da usmeravaju Th imunski odgovor, MoDC i MoLC su kokultivisane sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima tokom 5 dana. Produkcija citokina u supernatantima ovih kokultura izmerena je ELISA testovima ili metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml.

MoLC stimulisane u prisustvu Poly(I:C) su snažnije indukovale sekreciju IL-2, IL-4 i IL-10, dovele do niže produkcije IFN- γ , i nisu bitnije modifikovale produkciju IL-17 i TGF- β , u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoDC (*Grafikon 15*).

MoLC su nakon tretmana curdlanom snažnije indukovale sekreciju IL-4 i TGF- β , slabije su stimulisale produkciju IL-2, IL-17 i IL-10, dok nisu imale uticaja na sekreciju IFN- γ u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoDC (*Grafikon 15*).

MoLC tretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su snažnije indukovale produkciju IL-2, IL-10 i TGF- β , i slabije sekreciju IFN- γ , IL-4 i IL-17 u alogenoj kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoDC (*Grafikon 15*). Nije bilo razlike u odnosu IFN- γ / IL-4 između kokultura CD4⁺ T-limfocita sa MoLC stimulisanim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, u poređenju sa MoDC ($3,17 \pm 0,36$ / $3,65 \pm 0,38$, $p \geq 0,05$).



Grafikon 15. Produkcija citokina u supernatantima kokultura alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoDC ili MoLC tretiranim pojedinačno i kombinacijom Poly(I:C) i curdlana.

Nezrele MoDC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLC dodatkom TGF-β ovom diferencijacijskom koktelu. Obe subpopulacije ćelija su potom bile pojedinačno ili kombinovano stimulisane Poly(I:C) i curdlanom u toku 2 dana. Alogeni CD4⁺ T-limfociti (1×10^5) su kultivisani 5 dana u prisustvu nezrelih ili stimulisanih DC (1×10^4). U kulture je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i Jonomicin (500 ng/ml) tokom poslednjih 8h. Vrednosti citokina izmerene su ELISA testovima (IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-13, IL-10 i TGF-β) i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 11 Plex). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina izmerene u pet nezavisnih eksperimenata ± SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kokulturama CD4⁺ T-limfocita sa MoDC

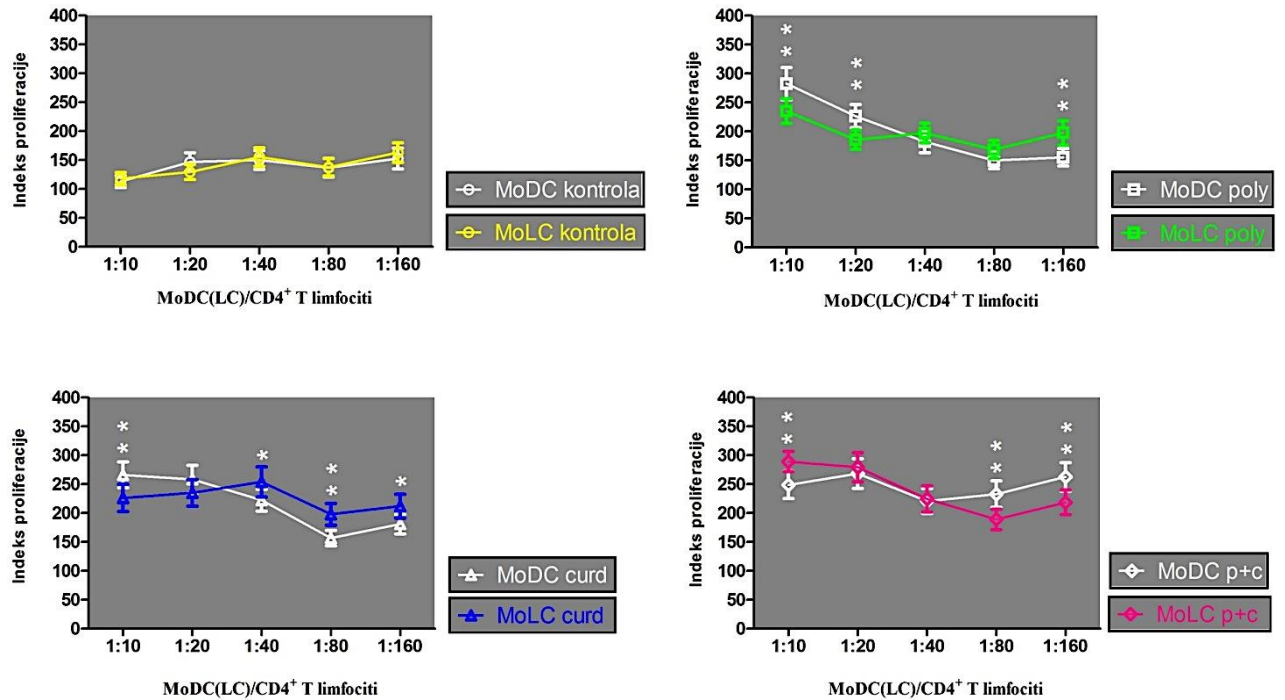
4.4.4. Potencijal alostimulacije MoDC i MoLC

Osobina DC da indukuju proliferaciju CD4⁺ T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita procenjena je na osnovu analize ugradnje [³H]-timidina u ove limfocite. Rezultati su prikazani u obliku indeksa proliferacije koji se izračunava kao što je opisano u *Materijalima i metodama*.

MoLC tretirane Poly(I:C) su slabije stimulisale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u višim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:10, 1:20), a snažnije u najnižem odnosu MoLC:CD4⁺ T (1:160) u poređenju sa MoDC (*Grafikon 16*).

MoLC stimulisane u prisustvu curdlana su slabije stimulisale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u najvišem odnosu MoLC:CD4⁺ T (1:10) a snažnije pri nižim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:40 - 1:160), u poređenju sa MoDC (*Grafikon 16*).

Potencijal alostimulacije MoLC tretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana je bio snažniji od potencijala alostimulacije MoDC pri najvišem odnosu MoLC:CD4⁺ T (1:10), dok je u nižim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:80, 1:160) bio slabiji (*Grafikon 16*).



Grafikon 16. Prikaz razlike u potencijalu alostimulacije između MoDC i MoLC tretiranih Poly(I:C), curdlanom i njihovom kombinacijom.

Nezrele MoDC su dobijene iz monocita nakon šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF i IL-4, a nezrele MoLC dodatkom TGF- β ovom diferencijacijskom koktelu. Obe subpopulacije DC su potom pojedinačno ili kombinovano stimulisane Poly(I:C) i curdlanom. Nezrele i stimulisane MoDC i MoLC su kultivisane u dvostruko-opadajućim razblaženjima ($1 \times 10^4 - 0,0625 \times 10^4$) sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U toku poslednjih 18h u kulture je dodat [³H] timidin, nakon čega je radioaktivnost izmerena kao broj radioaktivnih raspada u minuti (engl. counts per minute, c.p.m.) kao što je opisano u *Materijalima i metodama*. Na grafiku su predstavljeni rezultati u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) \pm SD dobijenog iz pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule: $IP = \text{c.p.m. (MoDC(LC)/CD4}^+ \text{T-limfocitna kokultura)} / [\text{c.p.m. (sami CD4}^+ \text{T-limfociti)} + \text{c.p.m. (sami MoDC(LC))}]$. Spontana ugradnja [³H] timidina u kulturama samih CD4⁺ T-limfocita, odnosno samih DC, izračunata je iz petoplikata dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata. Broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih CD4⁺ T-limfocita bio je 287 ± 47 c.p.m; broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih MoDC ili MoLC nezavisno od broja i maturacionog statusa je bio 80 ± 21 c.p.m.(odgovara nivou prirodnog fona zračenja).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, u poređenju sa MoDC

4.5. Uticaj ligacije CD40 molekula na fenotipske i funkcionalne karakteristike MoLĆ u zavisnosti od njihovog pretretmana

U cilju ispitivanja stabilnosti Th polarizacijskog potencijala koji su MoLĆ stekle u toku pretretmana specifičnim agonistima PRR (Poly(I:C), curdlan), analizirali smo njihove fenotipske i funkcionalne karakteristike nakon ligacije CD40 molekula pomoću sCD40L.

4.5.1. Fenotipske karakteristike MoLĆ

Fenotipske karakteristike MoLĆ stimulisanih CD40L određene su nakon citofluorimetrijske analize vezivanja antitela usmerenih protiv površinskih molekula na ovim ćelijama. Rezultati su prikazani u obliku procenta MoLĆ koje su ispoljile pomenute molekule i kao srednja vrednost intenziteta njihove ekspresije.

Ligacija CD40 molekula pomoću CD40L na kontrolnim, nezrelim MoLĆ je povećala ekspresiju CD83, CD86, CD80, CD40 i CD54 molekula, snizila ekspresiju CCR7, i nije dovela do promene HLA-DR (**Tabela 8**).

MoLĆ pretretirane Poly(I:C) su nakon tretmana sa CD40L povećale ekspresiju CD86, CD80 i CD54 molekula, snizile CD83, CD40 i CCR7, i nisu izmenile ekspresiju HLA-DR (**Tabela 8**).

Aktivacija CD40 na MoLĆ diferenciranim u prisustvu curdlana je povećala ekspresiju CD86, CD80, CD83 i CD54 molekula, i nije uticala na ispoljenost HLA-DR, CD40 i CCR7 (**Tabela 8**).

Ligacija CD40 molekula na MoLĆ stimulisanim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana je bila praćena povećanjem ekspresije CD86, CD40 i CCR7, smanjenjem CD83 i CD54, a bez bitnije promene u ispoljenosti HLA-DR i CD80 (**Tabela 8**).

MoLĆ pretretirane kombinacijom navedenih agonista su nakon aktivacije CD40 molekula povećale ekspresiju HLA-DR i CD40, snizile CD80 i CD54, i nisu izmenile ekspresiju CD83, CD86 i CCR7, u poređenju sa MoLĆ pretretiranim Poly(I:C), odnosno, povećale su ekspresiju CD40 i CCR7, snizile CD54, i nisu

promenile ekspresiju HLA-DR, CD86 i CD83, u poređenju sa MoLĆ pretretiranim curdlanom (**Tabela 8**).

Tabela 8. Uticaj ligacije CD40 molekula na fenotipska svojstva MoLĆ.

		<i>MoLĆ, 24 tretman / MoLĆ, 24h tretman + 24h rhCD40L</i>							
		<i>Kontrola</i>		<i>Poly(I:C)</i>		<i>Curdlan</i>		<i>Poly(I:C)+Curdlan</i>	
		<i>MoLĆ</i>	<i>MoLĆ + CD40L</i>	<i>MoLĆ</i>	<i>MoLĆ + CD40L</i>	<i>MoLĆ</i>	<i>MoLĆ + CD40L</i>	<i>MoLĆ</i>	<i>MoLĆ + CD40L</i>
HLA-DR	<i>%±SD</i>	77,1 ± 9,3	86,4 ± 9,3	97,6 ± 2,0	94,0 ± 4,7	96,9 ± 1,9	90,0 ± 8,7	97,2 ± 2,3	96,5 ± 2,1
	<i>mfi±SD</i>	7,2 ± 1,1	9,6 ± 1,3	5,3 ± 1,7	5,6 ± 0,4	9,6 ± 2,6	11,9 ± 2,0	8,8 ± 2,5	11,5 ± 2,0 ###
CD86	<i>%±SD</i>	6,0 ± 2,1	61,4 ± 7,5 ***	17,9 ± 3,2	82,7 ± 8,7 ***	27,1 ± 4,6	81,9 ± 9,9 ***	28,8 ± 4,7	76,9 ± 9,4 ***
	<i>mfi±SD</i>	3,6 ± 1,3	4,3 ± 0,9	6,2 ± 2,3	13,8 ± 3,0 ***	6,8 ± 1,9	12,8 ± 2,5 ***	6,6 ± 3,0	11,7 ± 3,5 ***
CD80	<i>%±SD</i>	43,2 ± 2,3	82,3 ± 12,6 ***	92,3 ± 7,2	88,0 ± 7,0	77,8 ± 10,9	92,5 ± 3,4 *	90,3 ± 7,4	85,5 ± 7,9
	<i>mfi±SD</i>	8,7 ± 1,9	11,6 ± 2,2	24,0 ± 4,9	37,7 ± 4,2 ***	15,2 ± 2,5	25,1 ± 2,0 **	22,7 ± 4,6	24,0 ± 3,9 ###
CD40	<i>%±SD</i>	78,9 ± 11,4	79,7 ± 6,7	93,0 ± 5,7	81,7 ± 7,6 *	90,4 ± 7,7	91,7 ± 5,3	91,0 ± 5,5	81,0 ± 5,0 ^
	<i>mfi±SD</i>	15,5 ± 3,7	24,1 ± 2,8 *	31,9 ± 5,3	31,5 ± 5,6	28,6 ± 3,5	24,4 ± 5,3	27,5 ± 4,7	43,1 ± 6,7 *** ## ^^^
CD83	<i>%±SD</i>	7,4 ± 2,7	58,3 ± 6,4 ***	88,5 ± 11,2	72,0 ± 11,8 *	70,3 ± 11,6	85,6 ± 6,8 *	89,8 ± 10,0	77,0 ± 7,9 *
	<i>mfi±SD</i>	9,0 ± 0,7	12,4 ± 1,9	19,9 ± 3,7	15,9 ± 2,3 *	13,3 ± 2,4	18,9 ± 3,3 **	18,1 ± 2,8	15,4 ± 2,1
CD54	<i>%±SD</i>	49,0 ± 5,7	81,2 ± 6,4 ***	80,2 ± 11,4	87,2 ± 9,0	76,8 ± 8,7	87,5 ± 7,6 *	82,1 ± 9,8	87,0 ± 7,8
	<i>mfi±SD</i>	4,6 ± 0,7	4,7 ± 0,5	5,3 ± 2,4	9,0 ± 3,1 *	9,9 ± 3,2	13,0 ± 1,6	17,5 ± 2,4	3,3 ± 0,5 *** ## # ^^^
CCR7	<i>%±SD</i>	4,1 ± 2,7	2,2 ± 0,3	14,6 ± 1,9	6,9 ± 0,8 ***	5,3 ± 1,8	3,6 ± 0,5	4,5 ± 1,9	6,4 ± 0,6 * ^^^
	<i>mfi±SD</i>	3,1 ± 0,8	1,0 ± 0,6 ***	4,9 ± 0,4	5,6 ± 0,7	3,1 ± 0,4	2,1 ± 1,0	2,6 ± 0,4	6,1 ± 1,3 *** ^^^

MoLĆ su dobijene šestodnevnom kultivacijom humanih monocita u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β , a potom su bile stimulirane Poly(I:C), curdlanom, ili njihovom kombinacijom u toku 24h. Ove MoLĆ su nakon ispiranja bile stimulirane solubilnim rhCD40L dodatnih 24h. MoLĆ su obeležene antitelima specifičnim za ključne DĆ površinske markere pa zatim analizirane citofluorimetrijski. Rezultati iz pet eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija ($\% \pm SD$) i kao srednja vrednost intenziteta ekspresije (engl. mean fluorescence intensity, $mfi \pm SD$). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa istovetno pretretiranim MoLĆ koje nisu bile stimulirane rhCD40L
= $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$, u poređenju sa MoLĆ tretiranim Poly(I:C) i rhCD40L
^ = $p < 0,05$, ^^ = $p < 0,01$, u poređenju sa MoLĆ tretiranim curdlanom i rhCD40L

4.5.2. Produkcija citokina od strane MoLĆ

Sposobnost MoLĆ da nakon vezivanja CD40 molekula produkuju citokine utvrđena je ELISA testovima u supernatantima njihovih dvodnevni kultura. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene su u pg/ml ili ng/ml i standardizovane za 1×10^6 MoLĆ/ml kulture.

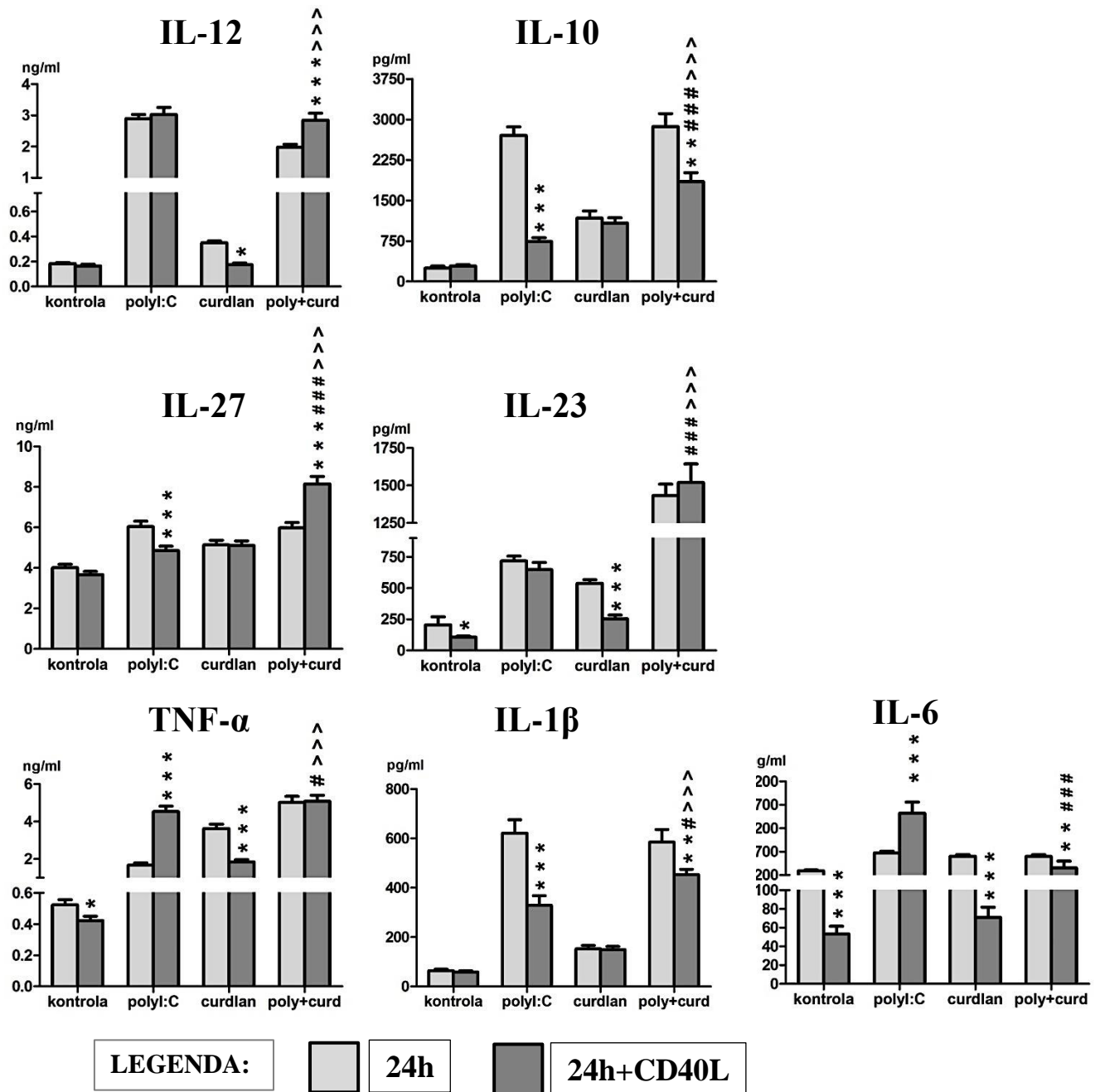
Kod nestimuliranih MoLĆ nakon aktivacije CD40 molekula došlo je do sniženja sekrecije IL-23, TNF- α i IL-6, bez bitnije modifikacije produkcije IL-12, IL-10, IL-27 i IL- β (**Grafikon 17**).

Vezivanje CD40 molekula na MoLĆ stimuliranim u prisustvu Poly(I:C) bilo je praćeno povećanjem sekrecije TNF- α i IL-6, i sniženjem sekrecije IL-10, IL-27 i IL-1 β . Nije bilo promene u produkciji IL-12 i IL-23 (**Grafikon 17**).

MoLĆ stimulirane u prisustvu curdlana su nakon aktivacije CD40 molekula smanjile produkciju IL-12, IL-23, TNF- α i IL-6, dok je u slučaju IL-10, IL-27 i IL-1 β sekrecija ostala nepromenjena (**Grafikon 17**).

Vezivanje CD40 molekula na MoLĆ stimuliranim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana je dovelo do povećanja produkcije IL-12 i IL-27 i smanjenja sekrecije IL-10, IL-1 β i IL-6. Razlike u produkciji IL-23 i TNF- α nije bilo (**Grafikon 17**). MoLĆ stimulirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su nakon aktivacije CD40 molekula povećale odnos IL-12 / IL-10 ($1,56 \pm 0,19 / 0,69 \pm 0,06$, $p < 0,001$).

MoLĆ su nakon tretmana kombinacijom Poly(I:C) i curdlana snažnije sekretovale IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-23 i IL-27, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimuliranim ovim agonistima. Kombinovano stimulirane MoLĆ su, takođe, slabije produkovale IL-6 i nisu izmenile produkciju IL-12, u poređenju sa MoLĆ stimuliranim Poly(I:C), dok je u odnosu na MoDĆ stimulirane curdlanom nađena obrnuta produkcija ovih citokina (**Grafikon 17**). U kulturi MoLĆ stimuliranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana zapažen je manji odnos IL-12 / IL-10 ($1,56 \pm 0,19 / 3,13 \pm 1,02$, $p < 0,001$) u poređenju sa MoLĆ stimuliranim Poly(I:C), a veći odnos ($1,56 \pm 0,19 / 0,16 \pm 0,02$, $p < 0,001$) u poređenju sa MoLĆ stimuliranim curdlanom.



Grafikon 17. Uticaj ligacije CD40 molekula na produkciju citokina od strane MoLC u zavisnosti od pretretmana.

Koncentracije citokina su određivane ELISA testovima u supernatantima nestimuliranih, kontrolnih MoLC ili MoLC koje su bile tretirane pojedinačno ili kombinacijom Poly(I:C) i curdlana u toku 24h. MoLC su potom stimulirane rhCD40L dodatnih 24h. Rezultati su standardizovani na 1×10^6 ćelija/ml i prikazani kao srednja vrednost iz pet eksperimenata \pm SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa istovetno pretretiranim MoLC koje nisu bili stimulirane rhCD40L

= $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$ ### = $p < 0,001$, u poređenju sa MoLC tretiranim Poly(I:C) i stimuliranim rhCD40L

^^ = $p < 0,001$ u poređenju sa MoLC tretiranim curdlanom i stimuliranim rhCD40L

4.5.3. Produkcija citokina u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita i MoLĆ

Kako bi se odredio potencijal MoLĆ da nakon stimulacije CD40L usmere Th imunski odgovor, analizirana je produkcija citokina u supernatantima njihovih kokultura sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima primenom ELISA testova ili metode citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml.

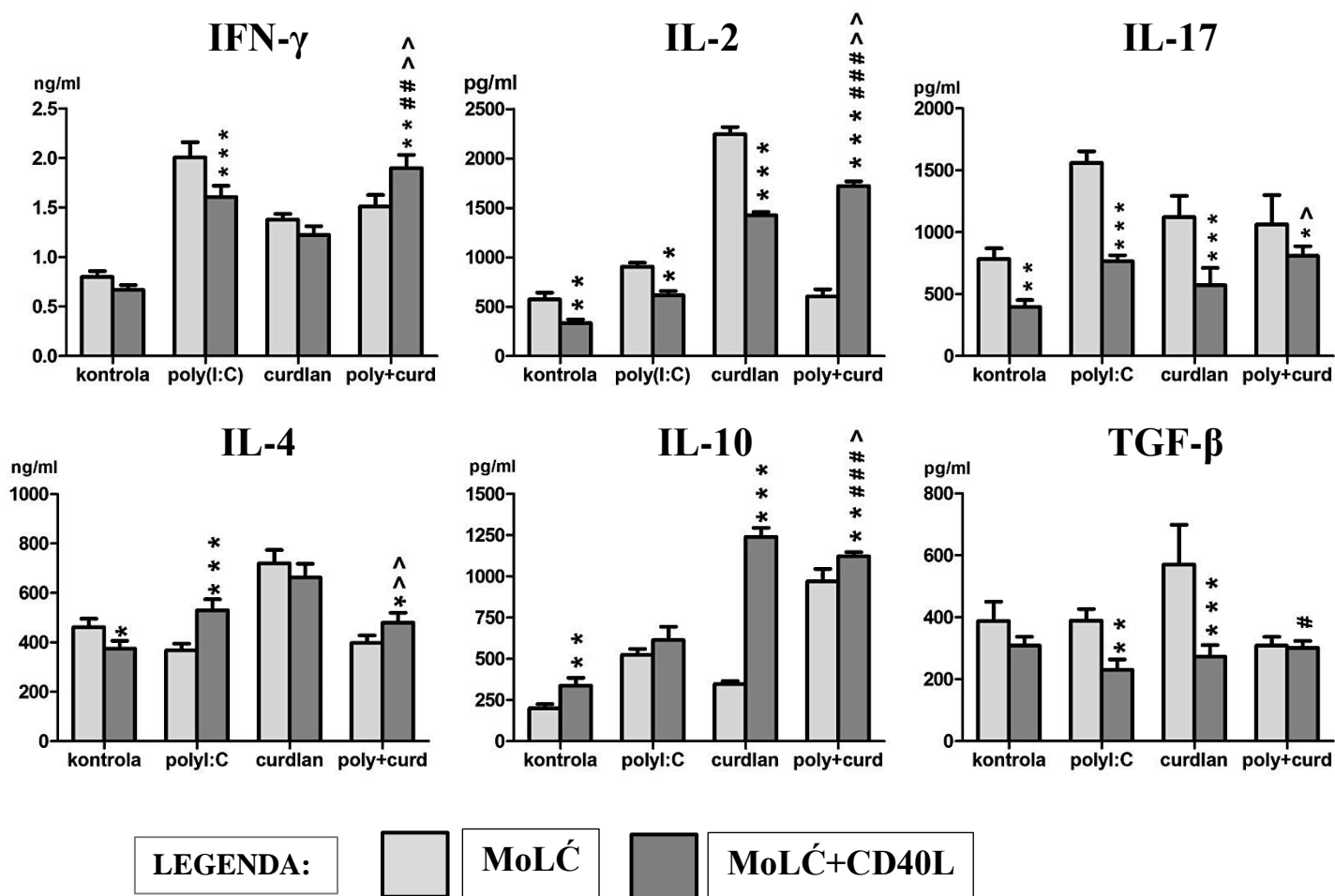
Nestimulisane, kontrolne MoLĆ su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije indukovale produkciju IL-10 u kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, slabije su indukovale sekreciju IL-2, IL-4 i IL-17, i nisu promenile sekreciju IFN- γ i TGF- β (**Grafikon 18**). Odnos između IFN- γ / IL-4 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa nestimulisanim MoLĆ se smanjio nakon aktivacije CD40 molekula na ovim MoLĆ ($1,75 \pm 0,19 / 1,23 \pm 0,18$, $p < 0,01$).

MoLĆ pojedinačno stimulisane Poly(I:C) ili curdlanom su nakon aktivacije CD40 molekula slabije indukovale sekreciju IL-2, IL-17 i TGF- β , u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. MoLĆ stimulisane Poly(I:C) su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije indukovale sekreciju IL-4 i nisu izmenile produkciju IL-10, dok su MoLĆ stimulisane curdlanom snažnije indukovale sekreciju IL-10, i nisu izmenile produkciju IFN- γ i IL-4 (**Grafikon 18**).

MoLĆ pretretirane kombinacijom ovih agonista su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije indukovale sekreciju IFN- γ , IL-2, IL-10 i IL-4, slabije su indukovale IL-17, i nisu uticale na sekreciju TGF- β , od strane alogenih CD4⁺ T-limfocita (**Grafikon 18**). Odnos između IFN- γ / IL-4 u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita stimulisanih sa MoLĆ pretretiranim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, nije se promenio nakon aktivacije CD40 molekula na ovim MoLĆ ($3,85 \pm 0,45 / 3,95 \pm 0,53$, $p \geq 0,05$). Ovaj citokinski odnos je bio u korist IFN- γ .

Nakon aktivacije CD40 molekula, MoLĆ tretirane kombinacijom pomenutih agonista su snažnije indukovale produkciju IFN- γ i IL-2, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim Poly(I:C) ili curdlanom. MoLĆ stimulisane kombinacijom

Poly(I:C) i curdlana su snažnije indukovale sekreciju IL-10 i TGF- β , i nisu uticale na produkciju IL-17 i IL-4, u poređenju sa MoLĆ tretiranim Poly(I:C). MoLĆ tretirane kombinacijom ovih agonista su snažnije indukovale sekreciju IL-17, slabije su indukovale IL-4 i IL-10, i nisu promenile produkciju TGF- β , u poređenju sa MoLĆ pretretiranim curdlanom (**Grafikon 18**). Odnos između IFN- γ / IL-4 je bio veći u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa kombinovano tretiranim MoLĆ, u poređenju sa kokulturama u kojima su bile MoLĆ stimulisane Poly(I:C) ($3,95 \pm 0,53$ / $3,11 \pm 0,42$, $p < 0,05$), ili MoLĆ stimulisane curdlanom ($3,95 \pm 0,53$ / $1,85 \pm 0,24$, $p < 0,001$).



Grafikon 18. Produkcija citokina u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita i MoLČ nakon ligacije CD40 molekula na MoLČ.

Nezrele MoLČ su dobijene iz monocita posle šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF-β, nakon čega su bile pojedinačno ili kombinovano stimulisane Poly(I:C) i curdlanom u toku 24h. Nezrele i stimulisane MoLČ su nakon ispiranja dodatno tretirane solubilnim rhCD40L tokom 24h. Ove MoLČ (1×10^4) su kultivisane 5 dana u prisustvu alogenih CD4⁺ T-limfocita (1×10^5). U kulturu je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA, 20 ng/ml) i Jonomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h inkubacije. Vrednosti citokina su izmerene ELISA testovima (IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-13, IL-10 i TGF-β) i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 11 Plex). Rezultati su predstavljani kao prosečna vrednost koncentracije citokina iz pet eksperimenata ± SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kokulturom CD4⁺ T-limfocita sa istovetno tretiranim MoLČ koje nisu bile stimulisane rhCD40L

= $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$, u poređenju sa kokulturom CD4⁺ T-limfocita sa MoLČ pretretiranim Poly(I:C) i stimulisanim rhCD40L

^ = $p < 0,05$, ^^ = $p < 0,01$ u poređenju sa kokulturom CD4⁺ T-limfocita sa MoLČ pretretiranim curdlanom i stimulisanim rhCD40L

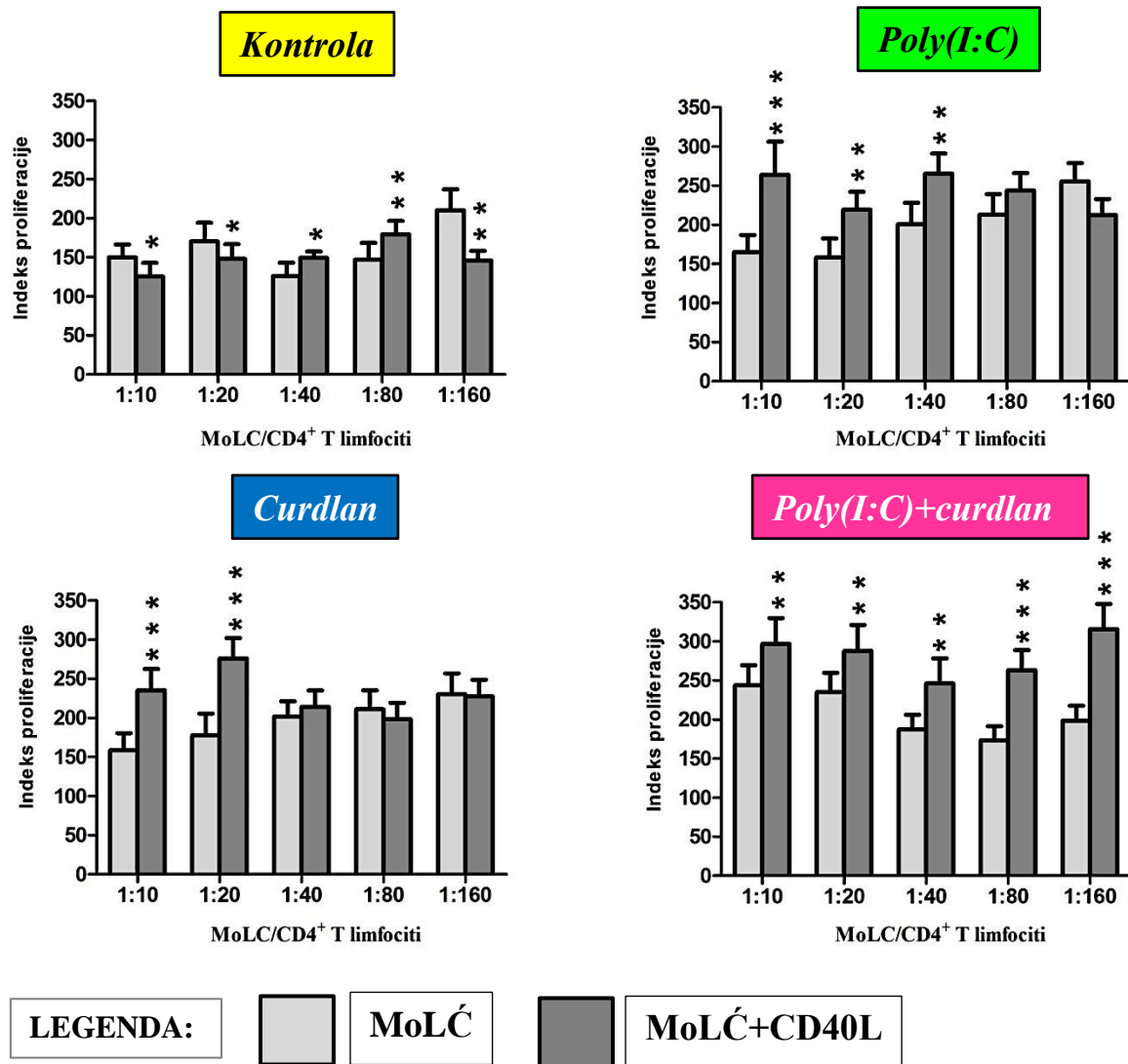
4.5.4. Potencijal alostimulacije MoLĆ

Sposobnost MoLĆ da nakon aktivacije CD40 molekula stimulišu proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u mešanoj kulturi leukocita procenjena je na osnovu analize ugradnje [³H]-timidina u ove limfocite. Rezultati su prikazani u obliku indeksa proliferacije koji se izračunava kao što je opisano u *Materijalima i metodama*.

Kontrolne, nestimulisane MoLĆ su nakon aktivacije CD40 molekula ispoljile slabiji potencijal alostimulacije, kako u višim odnosima, tako i u najnižem određivanom odnosu MoLĆ:CD4⁺ T (1:10, 1:20, 1:160), dok su u preostalim odnosima indukovale snažniju proliferaciju CD4⁺ T-limfocita (1:40, 1:80) (**Grafikon 19**).

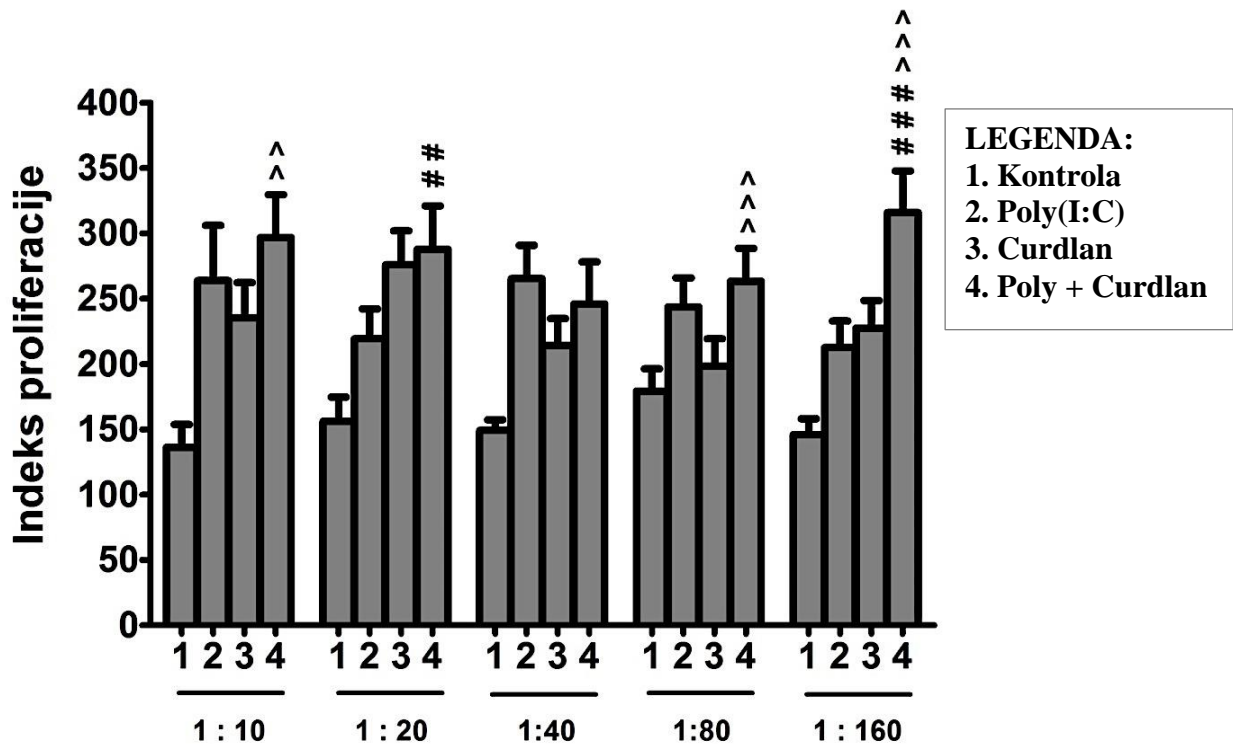
MoLĆ pojedinačno tretirane Poly(I:C) ili curdlanom su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije stimulisale proliferaciju CD4⁺ T-limfocita u najvišim odnosima MoLĆ:CD4⁺ T (1:10, 1:20), dok u ostalim odnosima njihov potencijal alostimulacije nije bio promenjen (**Grafikon 19**).

MoLĆ tretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije stimulisale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u svim određivanim brojevanim odnosima MoLĆ:CD4⁺ T (1:10 - 1:160) (**Grafikon 19**), dok su u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim ovim agonistima pokazale snažniji potencijal alostimulacije u najvišim i u najnižim odnosima MoLĆ: CD4⁺ T (1:10, 1:20, 1:80, 1:160) (**Grafikon 20**).



Grafikon 19. Uticaj ligacije CD40 molekula na potencijal alostimulacije MoLĆ u zavisnosti od njihovog pretretmana.

Nezrele MoLĆ su dobijene iz monocita posle šestodnevne diferencijacije u prisustvu GM-CSF, IL-4 i TGF- β , nakon čega su bile pojedinačno ili kombinovano stimulisane Poly(I:C) i curdlanom u toku 24h. Nezrele i stimulisane MoLĆ su nakon ispiranja dodatno tretirane solubilnim rhCD40L tokom 24h. Ove MoLĆ su kultivisane u dvostruko-opadajućim razblaženjima ($1 \times 10^4 - 0,0625 \times 10^4$) sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U toku poslednjih 18h kulture je dodat [³H]-timidin, nakon čega je radioaktivnost izmerena kao broj radioaktivnih raspada u minuti (engl. counts per minute, c.p.m.) kao što je opisano u *Materijalima i metodama*. Na grafiku su predstavljeni rezultati u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) \pm SD dobijenog od triplikata iz jednog reprezentativnog od pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule: $IP = \frac{c.p.m. (MoLĆ/CD4^+ T\text{-limfocitna kultura})}{[c.p.m. (sami CD4^+ T\text{-limfociti}) + c.p.m. (sami MoLĆ)]}$. Broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih CD4⁺ T-limfocita bio je 287 ± 47 c.p.m; broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih MoLĆ nezavisno od broja i maturacionog statusa bio je 83 ± 16 c.p.m.(odgovara nivou prirodnog fona zračenja). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kokulturom istovetno pretrtiranih MoLĆ koje nisu bile stimulisane solubilnim rhCD40L



Grafikon 20. Uticaj ligacije CD40 molekula na potencijal alostimulacije MoLĆ u zavisnosti od njihovog pretrretmana.

MoLĆ su kultivisane u dvostruko-opadajućim razblaženjima ($1 \times 10^4 - 0,0625 \times 10^4$) sa alogeniim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U toku poslednjih 18h kulture je dodat [³H]-timidin, nakon čega je radioaktivnost izmerena kao broj radioaktivnih raspada u minuti (engl. counts per minute, c.p.m.) kao što je opisano u *Materijalima i metodama*. Na grafiku su predstavljeni rezultati u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) ± SD dobijenog od triplikata iz jednog reprezentativnog od pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule: $IP = \frac{c.p.m. (MoLĆ/CD4^+ T\text{-limfocitna kultura})}{[c.p.m. (sami CD4^+ T\text{-limfociti}) + c.p.m. (sami MoLĆ)]}$. Broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih CD4⁺ T-limfocita bio je 287 ± 47 c.p.m; broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih MoLĆ nezavisno od broja i maturacionog statusa bio je 83 ± 15 c.p.m.(odgovara nivou prirodnog fona zračenja). ## = p < 0,01, ### = p < 0,001, u poređenju sa kokulturom CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim Poly(I:C) i rhCD40L
^^ = p < 0,01, ^^^ = p < 0,001 u poređenju sa kokulturom CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim curdlanom i rhCD40L

4.6. Razlike u fenotipskim i funkcionalnim osobinama između identično pretretiranih MoDC i MoLC nakon ligacije CD40 molekula

Jedan od ciljeva naše studije bilo je i proučavanje uticaja pretretmana agonistima PRR (Poly(I:C), curdlan) na fenotipske i funkcionalne karakteristike MoDC i MoLC nakon ligacije CD40 molekula pomoću solubilnog rhCD40L.

4.6.1. Fenotipske karakteristike MoDC i MoLC

Fenotipske karakteristike MoDC i MoLC nakon aktivacije CD40 molekula analizirane su citofluorimetrijskom metodom. Rezultati vezivanja antitela usmerenih protiv površinskih molekula na ovim ćelijama su prikazani u obliku procenta ćelija koje su ispoljile pomenute molekule i kao srednja vrednost intenziteta njihove ekspresije.

Kontrolne, nestimulisane MoLC su snažnije ispoljile CD86 i CD40 molekul, smanjile su CD83 i CD80, i nisu značajnije modifikovale ekspresiju HLA-DR, CD54 i CCR7, u poređenju sa MoDC (*Tabela 9*).

MoLC pretretirane Poly(I:C) su snažnije ispoljile CD86, CD80, CD40 i CCR7, a slabije HLA-DR, CD83 i CD54, u odnosu na MoDC (*Tabela 9*).

MoLC stimulisane curdlanom su snažnije eksprimirale HLA-DR, CD86 i CD83, a slabije CD80, CD40, CD54 i CCR7, u poređenju sa MoDC (*Tabela 9*).

MoLC pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su snažnije eksprimirale HLA-DR, CD40 i CCR7 molekul, smanjile ispoljenost CD83, i nisu promenile ekspresiju CD86, CD80 i CD54, u poređenju sa MoDC (*Tabela 9*).

Tabela 9. Razlike u fenotipskim karakteristikama između MoDC i MoLC pretretiranih pojedinačno i kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, nakon aktivacije CD40 molekula.

		<i>MoDC / MoLC (24h tretman+24h rhCD40L)</i>							
		<i>Kontrola</i>		<i>Poly(I:C)</i>		<i>Curdlan</i>		<i>Poly(I:C)+curdlan</i>	
		<i>MoDC</i>	<i>MoLC</i>	<i>MoDC</i>	<i>MoLC</i>	<i>MoDC</i>	<i>MoLC</i>	<i>MoDC</i>	<i>MoLC</i>
HLA-DR	<i>%±SD</i>	90,1 ± 7,2	86,4 ± 9,3	93,6 ± 5,3	94,0 ± 4,7	96,5 ± 2,2	90,0 ± 8,7	90,2 ± 5,4	96,5 ± 2,1
	<i>mfi±SD</i>	10,3 ± 2,7	9,6 ± 1,3	9,0 ± 0,8	5,6 ± 0,4 **	2,3 ± 0,7	11,9 ± 2,0 ***	7,8 ± 0,9	11,5 ± 2,0 **
CD86	<i>%±SD</i>	52,4 ± 8,2	61,4 ± 7,5 *	66,5 ± 9,1	82,7 ± 8,7 **	72,7 ± 7,2	81,9 ± 9,9 *	71,7 ± 6,9	76,9 ± 9,4
	<i>mfi±SD</i>	9,7 ± 0,6	4,3 ± 0,9 ***	16,6 ± 2,1	13,8 ± 3,0	6,8 ± 0,7	12,8 ± 2,5 ***	11,0 ± 2,9	11,7 ± 3,5
CD80	<i>%±SD</i>	75,1 ± 9,8	82,3 ± 12,6	92,6 ± 3,5	88,0 ± 7,0	81,4 ± 4,6	92,5 ± 3,4 *	96,6 ± 2,0	85,5 ± 7,9 *
	<i>mfi±SD</i>	21,7 ± 3,7	11,6 ± 2,2 ***	16,9 ± 1,3	37,7 ± 4,2 ***	50,4 ± 4,9	25,1 ± 2,0 ***	19,0 ± 1,1	24,0 ± 3,9 *
CD40	<i>%±SD</i>	64,9 ± 7,2	79,7 ± 6,7 **	75,4 ± 9,6	81,7 ± 7,6 *	86,6 ± 5,2	91,7 ± 5,3 *	73,4 ± 8,2	81,0 ± 5,0 **
	<i>mfi±SD</i>	21,1 ± 6,0	24,1 ± 2,8	25,5 ± 3,9	31,5 ± 5,6 *	31,3 ± 4,2	24,4 ± 5,3 *	27,2 ± 3,1	43,1 ± 6,7 ***
CD83	<i>%±SD</i>	68,6 ± 7,7	58,3 ± 6,4 *	87,0 ± 9,2	72,0 ± 11,8 **	74,9 ± 5,3	85,6 ± 6,8 *	89,0 ± 6,8	77,0 ± 7,9 **
	<i>mfi±SD</i>	25,4 ± 2,9	12,4 ± 1,9 ***	36,5 ± 4,2	15,9 ± 2,3 ***	18,5 ± 1,9	18,9 ± 3,3	20,7 ± 4,1	15,4 ± 2,1 *
CD54	<i>%±SD</i>	82,7 ± 9,0	81,2 ± 6,4	83,4 ± 7,7	87,2 ± 9,0	89,1 ± 5,4	87,5 ± 7,6	88,6 ± 8,3	87,0 ± 7,8
	<i>mfi±SD</i>	5,8 ± 1,0	4,7 ± 0,5	15,0 ± 2,3	9,0 ± 3,1 ***	20,0 ± 2,7	13,0 ± 1,6 ***	4,2 ± 0,9	3,3 ± 0,5
CCR7	<i>%±SD</i>	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3	5,2 ± 1,0	6,9 ± 0,8 **	6,6 ± 1,4	3,6 ± 0,5 ***	5,1 ± 0,8	6,4 ± 0,6 *
	<i>mfi±SD</i>	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,6	1,6 ± 0,3	5,6 ± 0,7 ***	3,2 ± 0,6	2,1 ± 1,0 *	2,5 ± 0,5	6,1 ± 1,3 ***

MoDC su dobijene šestodnevnom kultivacijom humanih monocita u prisustvu diferencijacionog koktela sastavljenog od GM-CSF i IL-4, a MoLC uz dodatak TGF- β ovom diferencijacionom koktelu. MoDC i MoLC su stimulirane pojedinačno ili kombinacijom Poly(I:C) i curdlana tokom 24h. Obe grupe ćelija su potom tretirane rhCD40L dodatnih 24h. MoDC i MoLC su obeležene antitelima specifičnim za ključne DC površinske markere pa zatim analizirane citofluorimetrijski. Rezultati iz pet eksperimenata prikazani su kao srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija ($\% \pm SD$) i kao srednja vrednost intenziteta ekspresije (engl. mean fluorescence intensity, $mfi \pm SD$).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa istovetno pretretiranim MoDC

4.6.2. Produkcija citokina od strane MoDC i MoLC

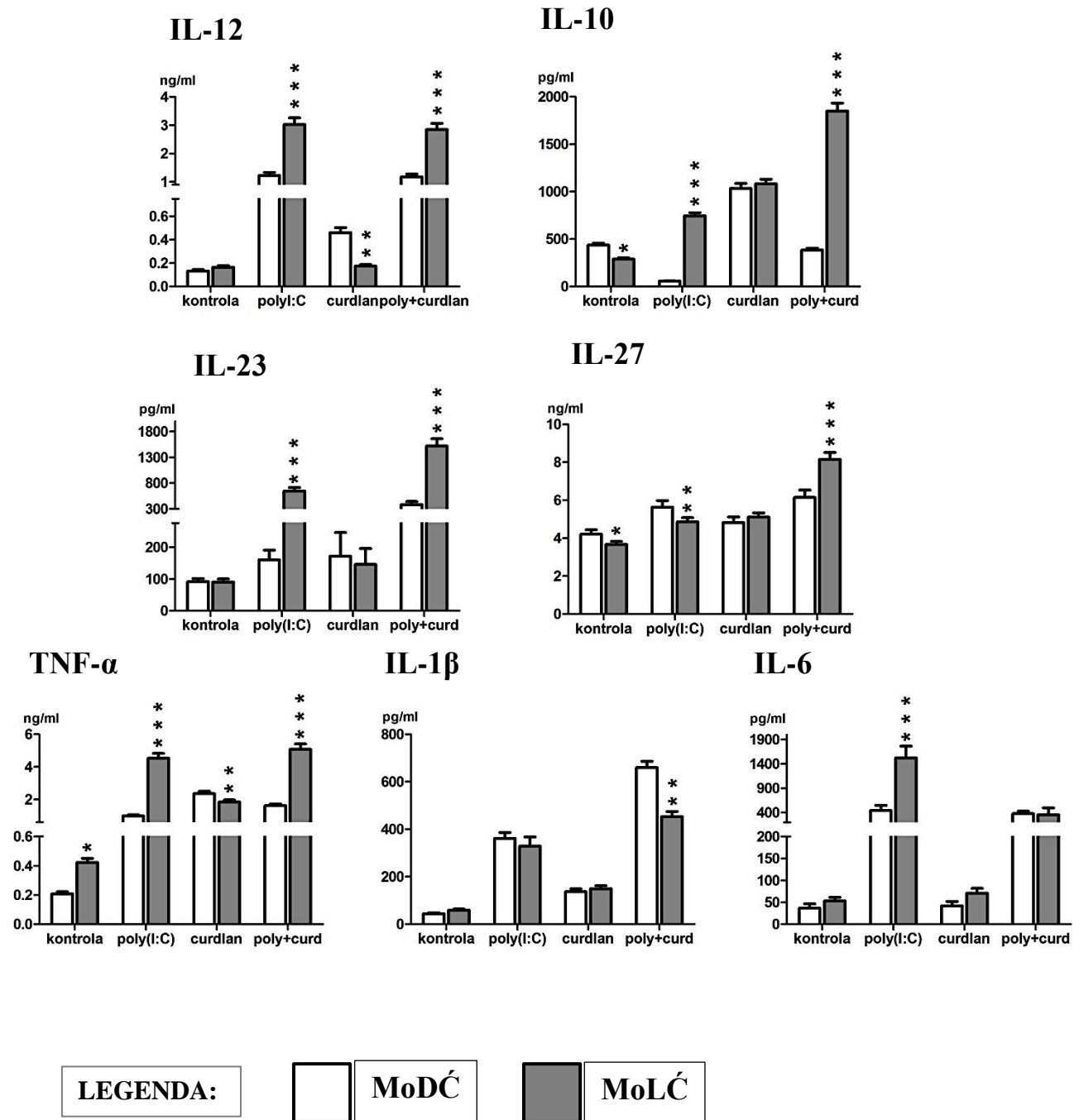
Sposobnost MoDC i MoLC da nakon stimulacije CD40L proizvode polarizacijske citokine određena je u supernatantima njihovih dvodnevnih kultura ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml i standardizovane za 1×10^6 MoLC/ml kulture.

Kontrolne, nestimulisane MoLC su snažnije proizvele TNF- α , slabije su sekretovale IL-10 i IL-27, i nisu izmenile produkciju IL-12, IL-23, IL-1 β i IL-6, u poređenju sa MoDC (**Grafikon 21**). Odnos u produkciji IL-12 / IL-10 bio je veći u kulturi kontrolnih MoLC, u poređenju sa MoDC ($0,57 \pm 0,07 / 0,31 \pm 0,04$, $p < 0,001$).

MoLC tretirane Poly(I:C) su snažnije sekretovale IL-12, IL-10, TNF- α , IL-23, IL-1 β i IL-6, slabije su proizvele IL-27, i nisu izmenile sekreciju IL-1 β , u poređenju sa MoDC (**Grafikon 21**).

MoLC stimulisane u prisustvu curdlana su slabije proizvele IL-12 i TNF- α , u poređenju sa MoDC, dok u slučaju IL-10, IL-27, IL-23, IL-1 β i IL-6 nije bilo značajne razlike u sekreciji (**Grafikon 21**).

Tretman kombinacijom Poly(I:C) i curdlana je povećao sekreciju IL-12p70, IL-10 i IL-27, IL-23 i TNF- α od strane MoLC, i snizio produkciju IL-1 β , u poređenju sa MoDC. Nije bilo razlike u produkciji IL-6 (**Grafikon 21**).



Grafikon 21. Razlike u produkciji citokina između identično pretretiranih MoDC i MoLC posle ligacije CD40 molekula.

MoDC su dobijene šestodnevnom kultivacijom humanih monocita u prisustvu diferencijacionog koktela sastavljenog od GM-CSF i IL-4, a MoLC uz dodatak TGF- β ovom diferencijacionom koktelu. MoDC i MoLC su stimulirane pojedinačno ili kombinacijom Poly(I:C) i curdlana tokom 24h. Obe grupe ćelija su potom tretirane rhCD40L dodatnih 24h. Koncentracije citokina u supernatantima MoDC i MoLC određivane su ELISA testovima. Rezultati su standardizovani na 1×10^6 ćelija/ml i prikazani kao srednja vrednost iz pet nezavisnih eksperimenata \pm SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa istovetno stimulisanim MoDC

4.6.3. Produkcija citokina u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoDC ili MoLC

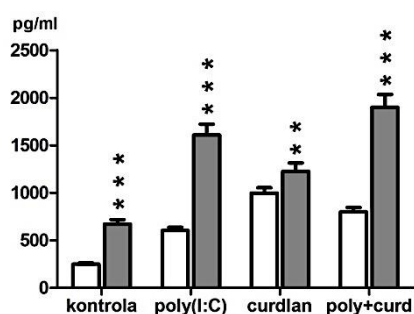
Funkcionalna karakteristika MoDC i MoLC da usmeravaju polarizaciju Th imunskog odgovora testirana je merenjem nivoa citokina u njihovim petodnevnim kulturama sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Koncentracije citokina u supernatantima ovih kultura određene su ELISA testovima i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracija citokina iz pet nezavisnih eksperimenata, izražene u pg/ml ili ng/ml.

Kontrolne, nestimulisane MoLC su indukovale povećanje sekrecije IFN- γ , sniženje produkcije IL-4 i IL-10, i nisu uticale na promenu sekrecije IL-2, IL-17 i TGF- β , u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoDC (*Grafikon 22*). Odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 bio je veći u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita sa kontrolnim MoLC, u poređenju sa MoDC ($1,23 \pm 0,18 / 0,31 \pm 0,08$, $p < 0,001$).

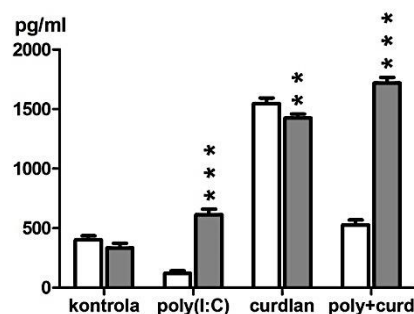
MoLC tretirane Poly(I:C) su snažnije stimulisale sekreciju IFN- γ , IL-2, IL-17 i IL-10, slabije su stimulisale produkciju IL-4, i nisu uticale na produkciju TGF- β , u odnosu na MoDC (*Grafikon 22*).

MoLC tretirane curdlanom su snažnije indukovale produkciju IFN- γ , slabije su stimulisale sekreciju IL-2 i TGF- β , i nisu izmenile produkciju IL-10, IL-4 i IL-17, u poređenju sa MoDC (*Grafikon 22*).

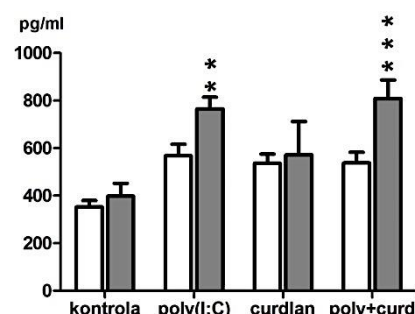
MoLC pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su snažnije indukovale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-17 i IL-10, a slabije su stimulisale sekreciju IL-4 i TGF- β , u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoDC (*Grafikon 22*). Odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa kombinovano stimulisanim MoLC bio je veći u poređenju sa MoDC ($3,95 \pm 0,53 / 0,81 \pm 0,04$, $p < 0,001$).

IFN- γ 

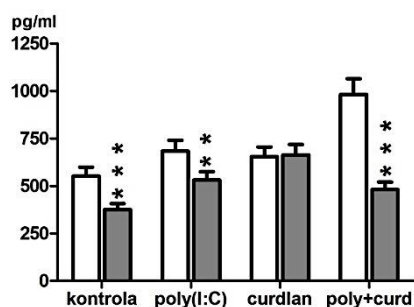
IL-2



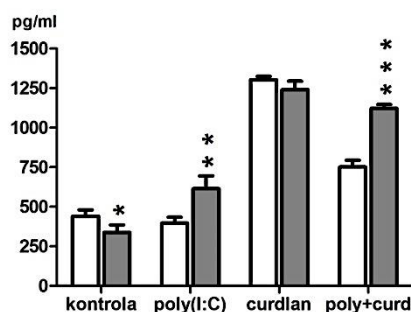
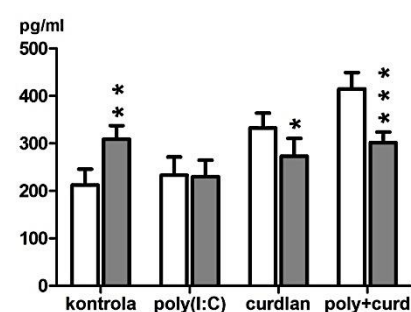
IL-17



IL-4



IL-10

TGF- β 

LEGENDA:



MoDĆ



MoLĆ

Grafikon 22. Razlika u produkciji citokina u kokultutama alogenih CD4⁺ T-limfocita sa MoDĆ ili MoLĆ, nakon ligacije CD40 molekula na DĆ.

MoDĆ su dobijene šestodnevnom kultivacijom humanih monocita u prisustvu diferencijacionog koktela sastavljenog od GM-CSF i IL-4, a MoLĆ uz dodatak TGF- β ovom diferencijacionom koktelu. MoDĆ i MoLĆ su stimulisane pojedinačno ili kombinacijom Poly(I:C) i curdlana tokom 24h. Obe grupe ćelija su potom tretirane rhCD40L dodatnih 24h. MoDĆ i MoLĆ (1×10^4) su kultivisani 5 dana sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5). U kulture je dodat forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) (20 ng/ml) i Jonomicin (500 ng/ml) u poslednjih 8h inkubacije. Vrednosti citokina su izmerene ELISA testovima (IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13, IL-10 i TGF- β) i metodom citofluorimetrijske detekcije citokina pomoću fluorescentnih kuglica obeleženih anti-IL-2 antitelima (Th1/Th2 11 Plex). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina iz pet nezavisnih eksperimenata \pm SD.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa kokulturom u kojoj su bile istovetno stimulisane MoDĆ

4.6.4. Potencijal alostimulacije MoDC i MoLC

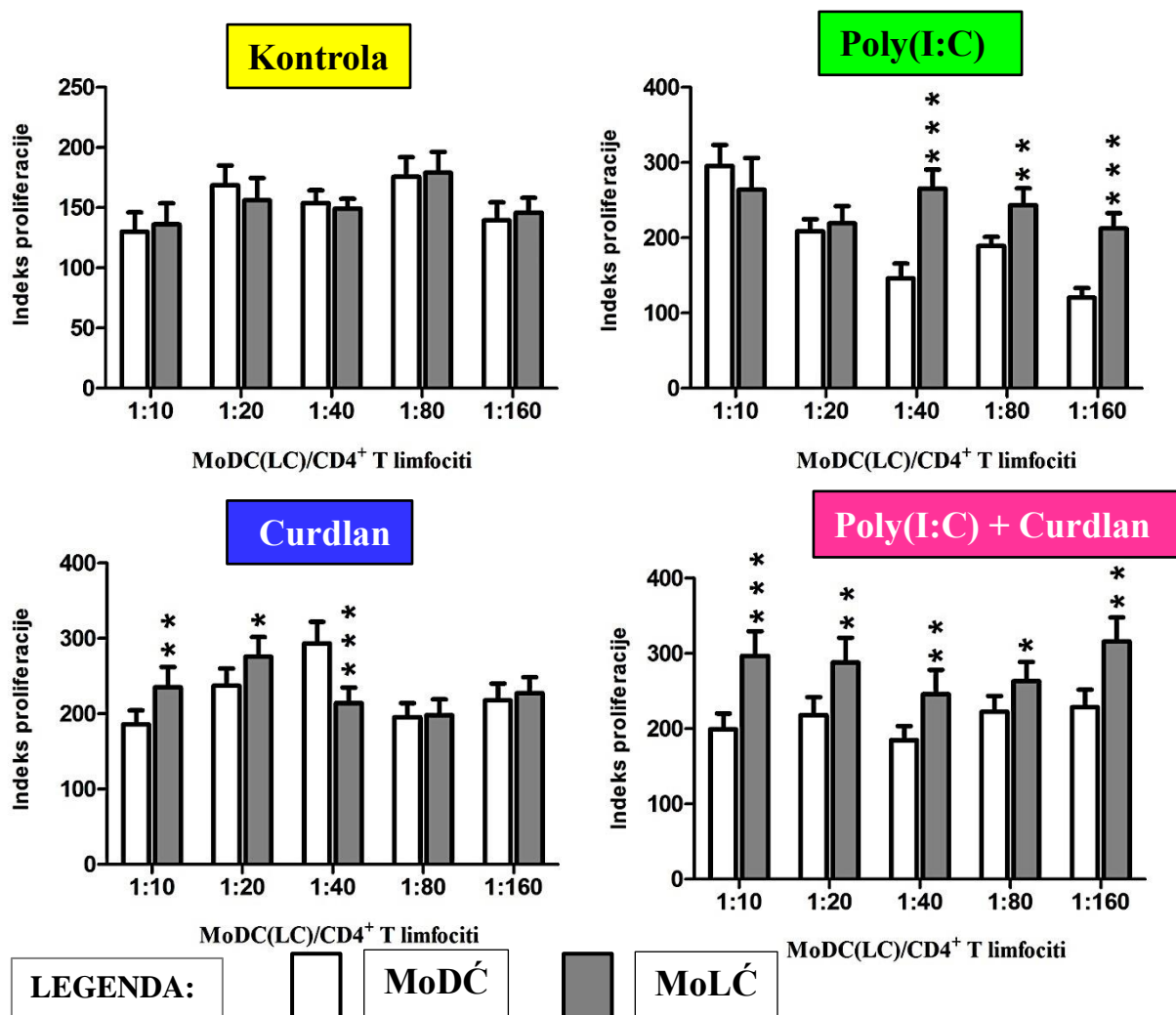
Na *Grafikonu 23* je prikazana razlika u proliferaciji alogernih CD4⁺ T-limfocita koji su bili kultivisani sa MoDC ili MoLC nakon aktivacije CD40 molekula na ovim DC. Sposobnost proliferacije CD4⁺ T-limfocita je procenjena na osnovu analize ugradnje [³H]-timidina u ove limfocite. Rezultati su predstavljeni u obliku indeksa proliferacije koji se izračunava kao što je opisano u *Materijalima i metodama*.

Nije bilo razlike u potencijalu alostimulacije između netretiranih, kontrolnih MoLC i MoDC (*Grafikon 23*).

MoLC tretirane Poly(I:C) su snažnije stimulisale proliferaciju alogernih CD4⁺ T limfocita u nižim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:40-1:160), u poređenju sa MoDC, dok u višim odnosima (1:10, 20) nije bilo razlike (*Grafikon 23*).

MoLC tretirane u prisustvu curdlana su snažnije stimulisale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita pri višim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:10, 1:20), u poređenju sa MoDC. U nižim odnosima DC:CD4⁺ T (1:80, 1:160) nije uočena razlika u proliferaciji CD4⁺ T-limfocita između kokultura sa MoDC i MoLC (*Grafikon 23*).

Potencijal alostimulacije MoLC tretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana je bio snažniji u svim određivanim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:10-1:160), u poređenju sa MoDC (*Grafikon 23*).



Grafikon 23. Prikaz razlike u potencijalu alostimulacije između identično pretretiranih MoDĆ i MoLĆ nakon ligacije CD40 molekula.

MoDĆ su dobijene šestodnevnom kultivacijom humanih monocita u prisustvu diferencijacionog koktela sastavljenog od GM-CSF i IL-4, a MoLĆ uz dodatak TGF- β ovom diferencijacionom koktelu. MoDĆ i MoLĆ su stimulisane pojedinačno ili kombinacijom Poly(I:C) i curdlana tokom 24h. Obe grupe ćelija su potom tretirane rhCD40L dodatnih 24h. MoDĆ i MoLĆ su kultivisane u dvostruko-opadajućim razblaženjima ($1 \times 10^4 - 0,0625 \times 10^4$) sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima (1×10^5) tokom 5 dana. U poslednjih 18h u kulturu je dodat [³H]-timidin, nakon čega je radioaktivnost izmerena kao broj radioaktivnih raspada u minuti (engl. counts per minute, c.p.m.) kao što je opisano u *Materijalu i metodama*. Na grafiku su predstavljeni rezultati u obliku prosečnog indeksa proliferacije (IP) \pm SD dobijenog od triplicate iz jednog reprezentativnog od pet nezavisnih eksperimenata. IP je izračunat korišćenjem sledeće formule: $IP = \frac{c.p.m. (MoDĆ(LĆ)/CD4^+ T\text{-limfocitna ko-kultura})}{[c.p.m. (sami CD4^+ T\text{-limfociti}) + c.p.m. (sami MoDĆ(LĆ))]}$. Spontana ugradnja [³H] timidina u kulturama samih CD4⁺ T-limfocita, odnosno samih DĆ oba tipa, izračunata je iz petoplikata dobijenih iz pet nezavisnih eksperimenata. Broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih CD4⁺ T-limfocita bio je 287 ± 47 c.p.m; broj β radioaktivnih raspada u kulturi samih MoDĆ i MoLĆ nezavisno od broja i matoracionog statusa bio je 80 ± 21 c.p.m.(odgovara nivou prirodnog fona zračenja).

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, u poređenju sa mešanom leukocitnom reakcijom u kojoj se nalaze istovetno stimulisani MoDĆ

5. DISKUSIJA

5.1. Uticaj koktela proinflamacijskih medijatora na sazrevanje i funkcije MoLĆ

Langerhansove ćelije koje se koriste u imunobiološkim istraživanjima najčešće se dobijaju *in vitro* od CD34⁺ hematopoetskih prekursora ili monocita periferne krvi, odnosno mogu se izolovati *ex vivo* iz kožnih eksplantata. CD34⁺ ćelije poreklom iz kostne srži ili krvi pupčanika diferentuju se u LĆ u prisustvu GM-CSF i TNF- α (Caux i sar., 1996), dok se MoLĆ najčešće dobijaju iz monocita u prisustvu diferencijacionog koktela koji čine GM-CSF, IL-4 i TGF- β (Geissmann i sar., 1998). LĆ se mogu izolovati i iz ćelijske suspenzije nakon tripsinizacije epidermisa. U tu svrhu se primenjuje tehnika selektivnog imunomagnetnog izdvajanja sa anti-CD1a antitelima ili upotreba adekvatnog gustinskog gradijenta (Tchou i sar., 2003).

Fenotipski profil MoLĆ kultivisanih u našem eksperimentu, u velikoj meri se poklopio sa rezultatima drugih *in vitro* (Geissmann i sar., 1999) i *ex vivo* (Berthier-Vergnes i sar., 2005) eksperimentalnih studija, i zavisio je od stepena maturacije. nMoLĆ su u visokom procentu ispoljavale Langerin ($84.5 \pm 7.7\%$), i snažno su ekspimirale HLA-DR i CD1a, a slabo CD83, CD86 i CCR7. Najznačajnija razlika u ekspresiji površinskih markera između naše i pomenute *ex vivo* studije bila je u snažnijoj ispoljenosti CD54 (ICAM-1) na nMoLĆ u poređenju sa epidermalnim LĆ. Uzrok tome bi mogla da bude nedovoljna sekrecija IL-10 u kulturi nMoLĆ, za koji je odranije poznato da inhibira ekspresiju CD54 u odsustvu TNF- α i IL-6 na epidermalnim LĆ (Chang i sar., 1994). Naravno, ne bi trebalo zanemariti ni potencijalni uticaj preostalih citokina sekretovanih od strane nMoLĆ kao i komponenti prisutnih u medijumu poput GM-CSF koji takođe može da poveća ekspresiju CD54 (Chang i sar., 1994, Ozawa i sar., 1999), ali ni to da ispitivane ćelije potiču iz različitih eksperimentalnih modela.

U okviru prvog cilja ovog rada ispitivan je uticaj „klasičnog“ proinflamacijskog koktela (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i PGE₂) na maturaciju MoLĆ i upoređena su njihova fenotipska i funkcionalna svojstva sa MoDĆ. Ovaj koktel se najčešće upotrebljava za sazrevanje DĆ u toku pripreme antitumorskih DĆ vakcina

(Lee i sar., 2002). DĆ u prisustvu ovog koktela povećavaju ekspresiju MHC molekula I i II klase, kao i kostimulacijskih molekula (CD40, CD80, CD86), a ovakav fenotip se pokazao najstabilnijim u poređenju sa drugim maturacijskim koktelima (Simon i sar., 2009). Takođe, ove DĆ pokazuju snažniju sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora, veći potencijal alostimulacije i migracije i bolje preživljavanje u odnosu na nDĆ (Jonuleit i sar., 1997, Morelli i Thomson, 2003). Efekti navedenog koktela proinflamacijskih medijatora na LĆ još nisu ispitani.

Tretman „klasičnim“ koktelom proinflamacijskih medijatora je povećao ekspresiju HLA-DR, CD83, CD86, CD54 i CCR7 na MoLĆ. Dobijeni rezultati odgovaraju ranije objavljenim podacima dobijenim nakon stimulacije MoLĆ sa TNF- α i IL-1 β (Geissmann i sar., 1999). Koktel je ispoljio najjači uticaj na ekspresiju CCR7 molekula, što je u skladu sa rezultatima studije koja je pokazala da PGE₂ u prisustvu TNF- α , IL-1 β i IL-6, ima odlučujuću ulogu na povećanje ekspresije CCR7 na MoDĆ, kao i na porast njihovih migracijskih sposobnosti u odgovoru na CCL19 i CCL21 posredstvom EP2 i EP4 receptora (Scandella i sar., 2002).

U kulturama nMoLĆ je zapažena umerena produkcija IL-27, niska produkcija IL-10 i IL-23, dok je IL-12 bio nedetektabilan. Odsustvo sekrecije IL-12 odgovara ranije objavljenim eksperimentalnim podacima (Geissmann i sar., 1999), dok je sekrecija IL-10 bila veća nego u drugim studijama, gde je nivo ovog citokina uglavnom bio izrazito nizak ili nedetektabilan (Peiser i sar., 2004, Furio i sar., 2009). Razlika u sekreciji IL-10 mogla bi da se objasni različitim uslovima kultivacije ili nedovoljnom osetljivošću metode za detekciju ovog citokina, a možda i genetskom specifičnošću donora. Izostanak sekrecije IL-12 uz očuvanu produkciju IL-23 može biti posledica različite regulacije u ekspresiji subjedinića IL-12-superfamilije citokina. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa podacima dobijenim na monocitima i MoDĆ koji su pokazali da IL-10 direktno inhibira ekspresiju samo p35 subjediniće, specifične za IL-12 ali ne i za IL-23 (Aste-Amezaga i sar., 1998, Corinti i sar., 2001). Do sada nisu objavljeni podaci o produkciji IL-27 od strane LĆ, zbog čega je na ovom nivou neophodno proširiti istraživanja.

Sazrevanje MoLĆ pod dejstvom koktela proinflamacijskih medijatora bilo je praćeno porastom sekrecije IL-12 i IL-27 u poređenju sa nMoLĆ, dok promene u produkciji IL-10 i IL-23 nisu zapažene. Takođe, pokazali smo da su zrele zMoLĆ snažnije indukovale produkciju IFN- γ , IL-2, IL-4 IL-13 i TGF- β , slabije su indukovale produkciju IL-10, i nisu izmenile sekreciju IL-17 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima u poređenju sa nMoLĆ. Produkcija IFN- γ i IL-10 u našoj studiji je u saglasnosti sa produkcijom ovih citokina u kokulturi CD4⁺ T-limfocita i MoDĆ stimulisanih istim koktelom proinflamacijskih medijatora (Jonuleit i sar., 1997). Za sada nema objavljenih podataka o uticaju ovog koktela na sazrevanje MoLĆ.

Trend smanjenja produkcije IL-10 od strane zMoLĆ u poređenju sa nMoLĆ mogao bi se dovesti u vezu sa smanjenjem ekspresije receptora za faktor tumorske nekroze (TNF-R) pod dejstvom TGF- β , što je inače karakteristično za ovu subpopulaciju DĆ (Geissmann i sar., 1999, Moore i sar., 2001). Zbog veće produkcije IL-12 od strane zMoLĆ bio je povećan odnos IL-12 / IL-10, što bi moglo da ukaže na slabljenje sposobnosti ovih ćelija da indukuju Th2 imunski odgovor, kako je to opisano ranije za zMoDĆ (Chang i sar., 2009). zMoLĆ u našem eksperimentu su pokazale potencijal da snažnije indukuju produkciju IFN- γ u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima u poređenju sa nMoLĆ nezavisno od nivoa produkcije IL-12 i IL-23. Opisana pojava je u skladu sa rezultatima eksperimenta koji je pokazao da epidermalne LĆ, bez obzira na maturacioni status ili prisustvo anti-IL-12p40 antitela, indukuju polarizaciju imunskog odgovora u Th1 smeru mehanizmom koji ne zavisi od IL-12 i IL-23 (Furio i sar., 2009). Povećanje sekrecije IL-27 od strane zMoLĆ moglo je da dovede do povećanja sekrecije IFN- γ u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, budući da je i na humanom (Pflanz i sar., 2002) i na mišjem modelu (Takeda i sar., 2003) pokazano da IL-27 indirektno povećava produkciju IFN- γ tako što indukuje povećanje ekspresije β 2 subjedinice receptora za IL-12 (IL-12R) na CD4⁺ T-limfocitima. Pretpostavlja se da bi IL-27, u skladu sa podacima dobijenim na mišjim DĆ, mogao i da ograniči produkciju IFN- γ tako što bi autokrinim dejstvom povećao produkciju IL-10 od strane MoLĆ (Mascanfroni i sar., 2013).

Snažnija sposobnost zMoLĆ da indukuju produkciju IL-4 i IL-13 u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita, u poređenju sa nMoLĆ, delimično bi mogla biti posledica specifičnih uslova kultivacije. MoLĆ u našoj studiji su stimulisane u prisustvu koktela proinflamacijskih medijatora koji sadrži PGE₂, za koji je pokazano da može da poveća sposobnost MoDĆ za indukciju Th2 imunskog odgovora (Morelli i Thomson, 2003). Nađeni odnos u produkciji IFN- γ / IL-4 i IFN- γ / IL-13 u kokulturi zMoLĆ i alogenih CD4⁺ T-limfocita ukazuje na potencijal ovih ćelija da indukuju Th1 imunski odgovor, dok bi smanjenje ovog odnosa nakon sazrevanja ukazivalo na to da zMoLĆ imaju slabiji potencijal da indukuju Th1 imunski odgovor u poređenju sa nMoLĆ.

Poznato je da IL-23 povećava produkciju IL-17 u mišjem *in vitro* eksperimentalnom modelu tako što podstiče preživljavanje, a ne proliferaciju ili *de novo* polarizaciju Th17 CD4⁺ T-limfocita (Stritesky i sar., 2008). Nadovezujući se na prethodno, možemo pretpostaviti da je izostanak promene u produkciji IL-23 od strane MoLĆ nakon stimulacije proinflamacijskim koktelom odgovoran za nepromenjen potencijal ovih ćelija da indukuju Th17 imunski odgovor u kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa nMoLĆ. Sposobnost zMoLĆ da snažnije indukuju sekreciju IL-2 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa nMoLĆ, takođe bi mogla da utiče na izostanak promene u njihovoj sposobnosti da indukuju Th17 imunski odgovor. Odranije je poznato da IL-2 deluje preko STAT5 kao negativni regulator promotora gena za IL-17, čime inhibira diferencijaciju mišjih Th17 CD4⁺ T-limfocita (Laurence i sar., 2007).

zMoLĆ su imale snižen alostimulacijski potencijal u poređenju sa nMoLĆ, i pored snažnije ekspresije HLA-DR, CD86 i CD54, odnosno snažnije sposobnosti da indukuju produkciju IL-2 u njihovoj kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Razlog za slabiju stimulaciju proliferacije alogenih CD4⁺ T-limfocita od strane zMoLĆ, u poređenju sa nMoLĆ, mogao bi da bude posledica istovremeno snažnije produkcije TGF- β u ovoj kokulturi. TGF- β sprečava proliferaciju aktivisanih T-limfocita tako što inhibira fosforilaciju Jak-1 i STAT 5 molekula nakon vezivanja IL-2 za IL-2 receptor (IL-2R) (Bright i sar., 1997, Malek, 2008), i podstiče njihovu

apoptozu aktivacijom proteina koji pripadaju porodici kaspaza (Chung i sar., 2000, Schuster i Krieglstein, 2002).

5.2. Poređenje fenotipskih i funkcionalnih svojstvima MoDC i MoLC stimuliranih koktelom proinflamacijskih medijatora

Međugrupno poređenje fenotipa je pokazalo da su MoLC veće i heterogenijeg oblika, kao i da znatno snažnije ispoljavaju CD1a molekul i Langerin od MoDC. Ove osobine odgovaraju opisanim razlikama između LC i IDDC dobijenih *ex vivo* izolacijom iz kožnih eksplantata (Larregina i sar., 2001, Nestle i sar., 1993). Nizak procenat MoDC (6.4 ± 2.1 %) koji je ekspresirao Langerin je najverovatnije posledica endogenog prisustva TGF- β u FCS kojim je bio obogaćen medijum za ćelijsku kultivaciju. Izmerena koncentracija TGF- β u medijumu od 63.1 ± 8.4 pg/ml je više od 100 puta manja nego što je potrebno da bi monociti *in vitro* stekli fenotip MoLC (Geissmann i sar., 1998). Zbog toga bi ova mala subpopulacija CD1a⁺CD14⁻langerin⁺ MoDC mogla da odgovara IDDC koje se razlikuju od LC u koži (Angel i sar., 2007).

Niža ekspresija HLA-DR, CD54 i CCR7 na nMoLC ukazuje na njihovu veću nezrelost u poređenju sa nMoDC. Pronađena razlika u ekspresiji HLA-DR u skladu je sa podacima drugih *in vitro* studija (Takeuchi i sar., 2003, van der Aar i sar., 2007), dok rezultati u vezi sa CD54 i CCR7 još nisu publikovani. Iako nije bilo razlike u ispoljavanju CD86 između nMoLC i nMoDC, niska ekspresija ovog ko-stimulacijskog molekula na obe subpopulacije DC je bila u skladu sa njihovim nezrelim fenotipom (van der Aar i sar., 2007). Nakon maturacije u prisustvu koktela, obe grupe ćelija su povećale ekspresiju većine testiranih površinskih markera, s tim da je njihova ispoljenost na zMoLC i dalje bila slabija u odnosu na zMoDC. Ovi rezultati odgovaraju eksperimentalnim podacima koji su pokazali da TGF- β inhibira povećanje ekspresije HLA-DR, CD83 i CD86 na DC u prisustvu proinflamacijskih citokina TNF- α i IL-1 β (Geissmann i sar., 1999).

nMoLC su slabije indukovale produkciju IFN- γ i IL-4, a snažnije IL-17 i IL-13 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa nMoDC. MoLC su,

međutim, nakon maturacije snažnije indukovale produkciju sva četiri pomenuta citokina u poređenju sa zMoDC. Nekoliko *ex vivo* studija je pokazalo da su i LC i IDDC koje su imale sposobnost da spontano migriraju iz kožnih eksplantata indukovale Th1 i Th2 polarizaciju aloreaktivnih CD4⁺ T-limfocita (Morelli i sar., 2005, Klechevsky i sar., 2008), dok su samo LC mogle da stimulišu Th17 imunski odgovor na ovim limfocitima (Mathers i sar., 2009). Jača sposobnost MoLC da indukuju Th17 imunski odgovor, nezavisno od njihovog maturacionog statusa, odgovara specifičnim *in vivo* potrebama za produkcijom IL-17 u epitelima gde LC učestvuju kao prva linija odbrane od različitih patogena (Infante-Duarte i sar., 2000, Kim i sar., 2008, Huang i sar., 2004, Kelly i sar., 2005). Sposobnost MoLC da pokrenu Th17 imunski odgovor u skladu je sa činjenicom da su tkiva nastanjena LC bogatija sa TGF- β (Hashimoto, 2000).

Niža sekrecija IFN- γ a viša IL-17 u kokulturi alogenih CD4⁺ T-limfocita sa nMoLC, u poređenju sa njihovom kokulturom sa nMoDC, odgovara slabijoj produkciji IL-12 i TNF- α a snažnijoj IL-23 od strane nMoLC, u odnosu na nMoDC. Iako je i odnos u produkciji IL-12 / IL-10 bio niži u kulturi nMoLC, u poređenju sa nMoDC, odnos u produkciji IFN- γ / IL-13 je bio viši u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, što bi ukazivalo na snažniju sposobnost nMoLC da indukuju Th1 imunski odgovor, u poređenju sa nMoDC. U tom kontekstu bi smanjenje produkcije IL-12 pri nepromenjenoj sekreciji IL-10 od strane nMoLC, u poređenju sa nMoDC, zapravo moglo da ukaže na snažniju kontrolu, a ne na snažniju sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora od strane nMoLC, u poređenju sa nMoDC (Langenkamp i sar., 2000).

Veća koncentracija IL-12 i niža IL-10, odnosno snažnija produkcija IL-23 u kulturama zMoLC mogle bi da budu razlog zašto ove ćelije snažnije indukuju produkciju IFN- γ i IL-17 u poređenju sa zMoDC. U skladu sa prethodnim je i veći odnos između IL-12 / IL-10 u kulturi zMoLC, kao i veći odnos IFN- γ / IL-13 u njihovoj kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa kulturama zMoDC.

zMoLC su imale snažniju sposobnost da indukuju produkciju IFN- γ i IL-4, a slabiju IL-13, u poređenju sa zMoDC. Ovakav odnos u sekreciji pomenutih citokina

bi mogao da se objasni specifičnošću u dinamici produkcije Th2 citokina u kokulturi DĆ sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Naime, na mišjem modelu je pokazano da produkcija IL-13 od strane CD4⁺CD45RO⁺ T-limfocita u kokulturi sa DĆ vremenski prethodi sekreciji IL-4 (Webb i sar., 2007). Biološki značaj ovog otkrića bi, ipak, morao da bude dodatno procenjen, uzevši u obzir i činjenicu da je IL-13 snažniji inhibitor produkcije IFN- γ u poređenju sa IL-4 ne samo kod miševa, već i u humanom sistemu (de Vries, 1998).

Sposobnost proliferacije alogenih CD4⁺ T-limfocita stimulisanih sa nMoLĆ bila je snažnija u odnosu na limfocite kultivisane sa nMoDĆ, a koincidirala je i sa snažnijom produkcijom IL-2. Uzroci ovakvog proliferacijskog odgovora, i pored toga, nisu u potpunosti jasni, pošto je ekspresija CD83 i CD86 na nMoLĆ bila slična, a HLA-DR i CD54 čak i snižena u odnosu na nMoDĆ. Ostaje da se ispita kako se menja ispoljenost ovih molekula ali i drugog kostimulacijskog molekula, CD80 na MoLĆ, nakon uspostavljanja kontakta sa CD4⁺ T-limfocitima, gde ključnu ulogu ima interakcija između CD40 liganda (CD4⁺ T-limfociti) i CD40 (DĆ) (van Kooten i Banchereau, 2000). Od ranije je poznato da MoLĆ stimulisane CD40L povećavaju ekspresiju CD83, CD86, CD80, HLA-DR i CD54, kao i sekreciju IL-12 i IL-10 u poređenju sa nMoLĆ. Aktivacija CD40 molekula povećava i sposobnost MoLĆ da stimulišu proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita (Peiser i sar., 2004). Takođe, nije u potpunosti jasno ni da li uzrok izmerene razlike u sekreciji IL-2 između kokultura deluje pre ili nakon aktivacije CD4⁺ T-limfocita. Naime, već je ustanovljeno da IL-10 inhibira produkciju IL-2 na nivou signalnih puteva uključenih u sintezu samog molekula, ali bez promene ekspresije ili funkcije IL-2R (de Waal Malefyt i sar., 1993). U tom kontekstu, niža produkcija IL-10 u kokulturi nMoLĆ sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa kokulturom sa nMoDĆ, bi mogla biti od značaja za objašnjenje ove pojave, pošto na nivou kultura DĆ nije bilo razlike u produkciji IL-10 između nMoLĆ i nMoDĆ. Zbog toga se može pretpostaviti da IL-10 u našoj MLR sa nMoLĆ nije mogao da inhibira efekte već izlučenog IL-2, koji je ključni faktor proliferacije, diferencijacije i preživljavanja T-limfocita (Nelson i Willerford, 1998).

Maturacijski koktel je smanjio sposobnost proliferacije CD4⁺ T-limfocita kokultivisanih sa zMoLĆ, u poređenju sa zMoDĆ, uprkos višoj produkciji IL-2. Ovaj rezultat bi mogao da se objasni veličinom ekspresije HLA-DR i CD54 na zMoLĆ u odnosu na zMoDĆ, ali i razlikom u odnosu IL-2 / TGF-β između njihovih kokultura. Niža ekspresija HLA-DR i CD54 na zMoLĆ u poređenju sa zMoDĆ odgovara ranije objavljenim podacima da su LĆ, koje su imale nižu antigen-prezentujuću funkciju i smanjenu sposobnost za uspostavljanje kontakta sa CD4⁺ T-limfocitima, snažnije inhibirale njihovu proliferaciju, u poređenju sa IDDC (Morelli i sar., 2005). S druge strane, niži odnos IL-2 / TGF-β u kokulturi CD4⁺ T-limfocita i zMoLĆ, u poređenju sa zMoDĆ, bi doveo do snažnije modulacije intraćelijskih efekata IL-2 pod uticajem TGF-β u ovoj kokulturi. Naime, poznato je da TGF-β inhibira ekspresiju IL-2R, kao i prenos signala preko ovog receptora posredovanog Jak-Stat signalnim putem (Grundstrom i sar., 2000, Campbell i sar., 2001, Bright i sar., 1997).



Protokoli za pripremu antitumorskih vakcina su u poslednjih nekoliko godina bili skoro isključivo utemeljeni na zMoDĆ koje indukuju Th1 polarizacijski odgovor CD4⁺ T-limfocita (Mailliard i sar., 2004). Pa ipak, nedavni *in vivo* eksperimenti na miševima obolelim od malignog melanoma su potvrdili da i Th17 CD4⁺ T-limfociti ispoljavaju antitumorsku aktivnost zbog jedinstvene sposobnosti da putem IL-17 privuku u tumor CD8α⁺ DĆ koje mogu da aktiviraju CD8⁺ T-limfocite (Martin-Orozco i sar., 2009). Osim toga, na sličnom modelu je pokazano da Th17 T-limfociti u prisustvu IL-12, a u odsustvu TGF-β mogu da započnu produkciju IFN-γ (Muranski i sar., 2008, Lee i sar., 2009). Kako su zMoLĆ u našoj studiji snažnije indukovale i Th1 i Th17 imunski odgovor u poređenju sa zMoDĆ, kao i da su Th17 CD4⁺ T-limfociti prisutni u različitim humanim tumorima, pretpostavljamo da bi zMoLĆ mogle da budu od koristi u budućim vakcinalnim protokolima usmerenim makar protiv kožnih i epitelnih tumora (Muranski i sar., 2008, Zhang i sar., 2008, Sfanos i sar., 2008, Miyahara i sar., 2008). Treba, međutim, naglasiti da su zMoLĆ snažnije indukovale i produkciju IL-4 u odnosu na zMoDĆ, što bi moglo

potencijalno da umanjuje intenzitet Th1/Th17 odgovora (de Jong i sar., 2005). Kako MoLĆ ovu osobenost stiču nakon maturacije, bilo bi razumno testirati i neke dodatne maturacijske protokole kako bi se odredio najoptimalniji način za ispoljavanje njihovih antitumorskih karakteristika. Ova pretpostavka je utemeljena na ranijim studijama koje su pokazale da je maturacijski koktel koji smo i mi koristili (Jonuleit i sar., 1997) doveo do aktivacije regulatornih T-limfocita (Banerjee i sar., 2006), dok je PGE₂ dodatno stimulisao produkciju IL-10, inhibirao produkciju IL-12 i indukovao usmerenje imunskog odgovora ka Th2 od strane DĆ (Luft i sar., 2002, Morelli i Thomson, 2003).

5.3. Uticaj Poly(I:C) i curdlana na fenotipska svojstva i funkcije MoLĆ

Iako je za sazrevanje DĆ često dovoljna stimulacija samo jednim TLR ili CLR agonistom, fenotipski stabilniji i funkcionalno potentniji imunski odgovor će se najčešće dobiti tek njihovom kombinovanom primenom koja je posledica specifične integracije različitih, međusobno nezavisnih, unutarćelijskih signala. U našoj studiji prvo smo analizirali pojedinačne efekte agonista TLR3 (Poly(I:C)) i dectin-1/Langerin (curdlan) na nezrele MoLĆ, a potom ih uporedili sa MoLĆ koje su bile stimulisane kombinacijom ovih agonista.

5.3.1. Poly(I:C)

Povećana ekspresija HLA-DR, CD86, CD80, CD40, CD83, CD54 i CCR7 na MoLĆ nakon stimulacije Poly(I:C) odgovarala je podacima dobijenim u studiji na *ex vivo* izolovanim LĆ koje su bile stimulisane istom koncentracijom Poly(I:C) (Furio i sar., 2009). Takođe, naši rezultati su bili u skladu i sa podacima objavljenim u *in vitro* studiji na MoDĆ, koja ne samo što je pokazala isti profil, već i sličan nivo ekspresije ovih markera na MoDĆ nakon stimulacije Poly(I:C) (Dragicevic i sar., 2012).

MoLĆ stimulisane Poly(I:C) su snažnije stimulisale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u višim odnosima MoLĆ:CD4⁺ T (1:10-1:40), u odnosu na nezrele

MoLĆ. Snažnija proliferacija CD4⁺ T-limfocita pri najvišem odnosu sa MoLĆ u našoj studiji mogla bi biti uslovljena jačom ekspresijom HLA-DR, CD54 i CD86 na MoLĆ koje su stimulisane Poly(I:C), ali i jačom produkcijom IL-2, a slabijom TGF-β u kokulturi sa ovim limfocitima. Uticaj pokazanog odnosa između IL-2 i TGF-β na proliferaciju limfocita, u skladu je sa podacima *in vitro* studije koja je pokazala da TGF-β inhibira autokrini efekat IL-2 na povećanje ekspresije IL-2R na aktivisanim CD4⁺ T-limfocitima, kao i njegovu signalizaciju preko Jak-1 kinaze i STAT 5 transkripcionog faktora (Bright i sar., 1997, Das i Levine, 2008).

MoLĆ su nakon tretmana Poly(I:C) snažnije produkovale IL-12, IL-10, IL-23, IL-27, TNF-α, IL-1β i IL-6 u poređenju sa netretiranim ćelijama. Ovaj citokinski profil uglavnom se podudara sa rezultatima *in vitro* studije na MoDĆ koje su stimulisane pod identičnim uslovima, izuzev u slučaju IL-10 koji je bio snižen (Dragicevic i sar., 2012). Razlika u sekreciji IL-10 je najverovatnije posledica donorske specifičnosti i uslova kultivacije, pošto je ranije pokazano da MoLĆ diferencirane u kultivacionom medijumu koji sadrži TGF-β slabo produkuj IL-10 (Geissmann i sar., 1999). MoLĆ tretirane Poly(I:C) su snažnije indukovale sekreciju sva tri citokina karakterističnih za Th1, Th17 i Th2 imunski profil, IFN-γ, IL-17 i IL-4, u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, a u poređenju sa nezrelim MoLĆ. Nije bilo razlike u odnosu IFN-γ / IL-4 između kokultura CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim Poly(I:C), u poređenju sa nezrelim MoLĆ, što bi moglo da ukaže na sličan potencijal usmeravanja imunskog odgovora u Th1 smeru.

Pokazani rezultati proliferacije i produkcije citokina u našoj studiji odgovaraju podacima dobijenim na *ex vivo* izolovanim LĆ, koje su nakon stimulacije Poly(I:C) ispoljile snažniji alostimulacijski potencijal u poređenju sa nestimulisanim ćelijama i indukovale snažniju produkciju IFN-γ uprkos većoj produkciji IL-10 od strane alogenih CD4⁺ T-limfocita u kokulturi (Furio i sar., 2009).

5.3.2. Curdlan

MoLĆ su nakon stimulacije curdlanom snažnije eksprimirale HLA-DR, CD86, CD80, CD40, CD83 i CD54, u poređenju sa netretiranim MoLĆ. U slučaju

ekspresije CCR7 molekula, tretman curdlanom je povećao njegovu procentualnu zastupljenost na MoLĆ uz istovremeno sniženje intenziteta ekspresije. Procenat ispoljenosti ovih markera u našoj studiji bio je u skladu sa podacima dobijenim nakon stimulacije MoDĆ sa istom koncentracijom curdlana, ali uz nižu ekspresiju (Dragicevic i sar., 2012). Ova nepodudarnost može biti posledica različitih uslova kultivacije ćelija i zahteva dodatnu evaluaciju. Spomenute MoLĆ su snažnije indukovale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u svim testiranim odnosima MoLĆ:CD4⁺ T (1:10-1:160), u poređenju sa netretiranim MoLĆ. Njihov alostimulacijski potencijal u najvišem odnosu MoLĆ:CD4⁺ T-limfocita (1:10) mogao bi biti posledica snažnije ekspresije HLA-DR, CD86, CD80 i CD54 molekula.

MoLĆ su nakon stimulacije curdlanom proizvele više nivoa IL-12, IL-10, IL-23, IL-TNF- α , IL-1 β i IL-6, dok je produkcija IL-27 ostala nepromenjena. Takođe, u kokulturama ovih ćelija sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima nađena je snažnija produkcija IFN- γ , IL-2, IL-4 i IL-10, a bez bitnije promene u produkciji IL-17 i TGF- β . Opisani profil sekrecije citokina se u znatnoj meri podudara sa rezultatima dobijenim na identično stimulisanim MoDĆ, osim što MoDĆ nakon stimulacije curdlanom nisu značajnije izmenile produkciju TNF- α , IL-10 i IL-6, odnosno snažnije su indukovale produkciju IL-17, u poređenju sa nestimulisanim ćelijama (Dragicevic i sar., 2012). Niži odnos IFN- γ / IL-4 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimulisanim curdlanom mogao bi da ukaže na njihov slabiji potencijal da usmere imunski odgovor u Th1 smeru, u poređenju sa nezrelim MoLĆ.

5.3.3. Kombinovana stimulacija Poly(I:C) i curdlanom

Studija Dragičevićeve i saradnika (Dragicevic i sar., 2012) je pokazala da koligacija Poly(I:C) i curdlana dovodi do fenotipske maturacije MoDĆ sa povećanjem ekspresije CD83, HLA-DR, CD86, CD40 i CD54, koja po svemu podseća na efekat Poly(I:C), izuzev dodatnog povećanja ekspresije CCR7. MoDĆ stimulisane sa oba liganda povećavaju produkciju IL-12, IL-23 i IL-10 u odnosu na sam Poly(I:C). MoDĆ stimulisane curdlanom snažnije indukuju Th17, a slabije Th1 imunski odgovor u poređenju sa onima koje su tretirane Poly(I:C). Kada se ovi

agonisti kombinuju, dodatno se potencira sposobnost MoDC da podstaknu produkciju IFN- γ , pre svega od strane naivnih CD4⁺ T-limfocita, odnosno IL-17 od strane memorijskih CD4⁺ T-limfocita. Dosad nije bilo objavljenih podataka o efektima koligacije ova dva agonista na LC.

MoLC u našoj studiji su nakon stimulacije kombinacijom Poly(I:C) i curdlana snažnije ispoljile CD80 i CD40 molekul u poređenju sa MoLC pojedinačno stimulisanim Poly(I:C) ili curdlanom, i pokazale snažniju alostimulacijsku sposobnost u kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima gde su jače indukovale produkciju IL-2, a slabije produkciju IL-10. Snažnija ekspresija CD40 molekula na MoLC stimulisanim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana mogla je da putem interakcije sa CD40L na CD4⁺ T-limfocitima poveća intenzitet njihove proliferacije u odnosu na MoLC pojedinačno tretirane ovim agonistima. Odranije je poznato da spomenuta interakcija dovodi do povećanja produkcije IL-2, najvažnijeg faktora rasta T-limfocita u kokulturama MoDC i CD4⁺ T-limfocita (Ma i Clark, 2009).

Ipak, nije sasvim jasno kako je povećanje ekspresije CD80 molekula i njegova snažnija ispoljenost u odnosu na CD86 na MoLC stimulisanim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, inače karakteristično za fenotip tolerogenih MoLC (Sansom i sar., 2003), moglo da doprinese snažnijoj stimulaciji proliferacije alogenh CD4⁺ T-limfocita, u poređenju sa MoLC pojedinačno tretiranim Poly(I:C) ili curdlanom. Možemo pretpostaviti da se nakon kontakta kombinovano stimulisanih MoLC sa CD4⁺ T-limfocitima odigrao naknadni porast ekspresije CD86 u odnosu na CD80 putem CD40:CD40L interakcije (Cella i sar., 1996, Shibaki i Katz, 2001).

Snažnija produkcija TNF- α od strane MoLC stimulisanih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana nije izmenila sekreciju IFN- γ u poređenju sa MoLC stimulisanim Poly(I:C) iako je poznato da TNF- α usmerava imunski odgovor CD4⁺ T-limfocita u Th1 smeru (Mootoo i sar., 2009). Razlog za izostanak povećanja produkcije IFN- γ u našoj studiji mogao bi da bude posledica slabije produkcije IL-12 od strane MoLC stimulisanih kombinacijom agonista, budući da je pokazano kako je za povećanje sekrecije IFN- γ od strane CD4⁺ T-limfocita neophodno povećanje ekspresije IL-12R na ovim ćelijama pod sinergijskim uticajem TNF- α i

IL-12 (Ahlers i sar., 2001). Ova pretpostavka bi bila u skladu i sa *in vivo* eksperimentalnim podacima koji su pokazali da su TNF^{-/-} miševi sa očuvanom produkcijom IL-12 nakon infekcije mikobakterijama razvili prejak Th1 imunski odgovor koji je doveo do destrukcije plućnog parenhima, dok kod IL-12^{-/-} miševa sa očuvanom produkcijom TNF- α nije bila uočena slična pojava (Zganiacz i sar., 2004). Snižena sekrecija IL-10 od strane MoLĆ stimuliranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana bila je u skladu sa sniženjem produkcije IL-4 u njihovoj kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u odnosu na MoLĆ stimulirane Poly(I:C), budući da je poznato kako DĆ koje proizvode IL-10 usmeravaju imunski odgovor CD4⁺ T-limfocita u Th2 smeru (Langenkamp i sar., 2000, Corinti i sar., 2001). Izostanak promene u produkciji IFN- γ i snižena sekrecija IL-4 u kokulturama CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimuliranim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, mogli bi da ukažu na skretanje imunskog odgovora u Th1 smeru u poređenju sa kokulturama sa MoLĆ pojedinačno tretiranim Poly(I:C).

Statistički snižena produkcija IL-1 β i tendencija ka smanjenoj produkciji IL-6 od strane MoLĆ stimuliranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, mogle bi da budu razlog snižene produkcije IL-17 u njihovoj kokulturi sa CD4⁺ T limfocitima, u poređenju sa MoLĆ tretiranim Poly(I:C). Prisustvo IL-1 β i IL-6 se pokazalo ključnim za diferencijaciju naivnih humanih T-limfocita u Th17 limfocite nakon stimulacije anti-CD3 i anti-CD28 antitelom *in vitro* (Acosta-Rodriguez i sar., 2007). Snažnija produkcija IL-2 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa MoLĆ stimuliranih kombinacijom agonista, u odnosu na MoLĆ pojedinačno stimulirane Poly(I:C), mogla je, takođe, da dovede do slabije produkcije IL-17. Navedena činjenica je u skladu sa rezultatima kombinovane *in vitro* i *in vivo* studije na miševima koja je pokazala da IL-2 inhibira formiranje RoR γ t, pozitivnog regulatora Th17 polarizacije, putem STAT5 molekula (Liao i sar., 2011).

Snažnija produkcija IL-12 i TNF- α od strane MoLĆ stimuliranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana u našoj studiji bila je u skladu sa snažnijom produkcijom IFN- γ u alogenoj kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoLĆ stimuliranim curdlanom (Ahlers i sar., 2001). Iako su kombinovano stimulirane MoLĆ snažnije proizvele IL-10, statistički veći odnos između IL-12 /

IL-10 u kulturi, kao i između IFN- γ / IL-4 u kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, ukazuje na njihovu snažniju sposobnost da usmeravaju imunski odgovor u Th1 smeru, u odnosu na MoLĆ tretirane curdlanom (Langenkamp i sar., 2000). Trend povećanja sekrecije IL-17 u kokulturi MoLĆ stimulisanih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoLĆ tretiranim curdlanom, u skladu je sa snažnijom produkcijom pro-Th17 citokina, IL-1 β , IL-6 i IL-23, od strane kombinovano stimulisanih MoLĆ u našoj studiji (Acosta-Rodriguez i sar., 2007, Stritesky i sar., 2008).

5.4. Razlike u fenotipskim i funkcionalnim osobinama između MoDĆ i MoLĆ stimulisanih Poly(I:C) i curdlanom

MoLĆ su nakon stimulacije kombinacijom Poly(I:C) i curdlana povećale ekspresiju CD86, CD80, CD40 i CCR7, a snizile CD83 i CD54 u poređenju sa istovetno tretiranim MoDĆ. MoLĆ su ispoljile snažniju alostimulacijsku sposobnost u najvišem odnosu MoLĆ:CD4⁺ T (1:10), a slabiju u nižim odnosima (1:80, 1:160), u odnosu na MoDĆ. Snažnija proliferacija alogenih CD4⁺ T-limfocita u kokulturi sa najvišim odnosom MoLĆ:CD4⁺ T (1:10) bila je u skladu sa povećanom ekspresijom CD86, CD80 i CD40 na ovim MoLĆ i izmerenim povećanjem koncentracije IL-2. Nije, međutim, jasno zašto je izostao inhibitoryni efekat na proliferaciju CD4⁺ T-limfocita pod uticajem povećane produkcije IL-10 i TGF- β u istim kokulturama. Razlog za ovu pojavu bi mogao da bude posledica neadekvatne dinamike u sekreciji spomenutih citokina, budući da je poznato kako IL-10 i TGF- β u određenim situacijama ispoljavaju inhibitoryni efekat na proliferaciju T-limfocita isključivo ako deluju sinergistički. Sveže aktivirani T-limfociti mogu, na primer, da izbegnu inhibitoryni efekat TGF- β *in vitro* tako što, isključivo u odsustvu produkcije IL-10, snižavaju ekspresiju TGF- β receptora II tipa (TGF- β RII) na ovim ćelijama (Cottrez i Groux, 2001).

Slabija produkcija IL-12 i snažnija produkcija IL-10 od strane MoLĆ, kao i slabija sekrecija IL-27, neophodnog za uspostavljanje reaktivnosti CD4⁺ T-limfocita na IL-12 u toku rane faze uspostavljanja Th1 imunskog odgovora, bile su u skladu sa sniženom produkcijom IFN- γ u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u

poređenju sa MoDC (Langenkamp i sar., 2000, Lucas i sar., 2003). MoLC su slabije stimulisale i produkciju IL-4 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Nije uočena razlika u odnosu IFN- γ / IL-4 između kokultura CD4⁺ T-limfocita sa MoLC, u poređenju sa MoDC, što bi moglo da ukaže na sličan potencijal obe vrste ćelija da usmere imunski odgovor u Th1 smeru.

Slabija sekrecija IL-1 β od strane MoLC, ključnog pro-Th17 citokina u humanom sistemu, kao i IL-27, neophodnog za održavanje *de novo* uspostavljene populacije Th17 limfocita, i IL-23, potrebnog za preživljavanje stabilno formiranih CD4⁺ T-limfocita, odgovarale su sniženoj produkciji IL-17 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoDC (Acosta-Rodriguez i sar., 2007, El-behi i sar., 2009, Stritesky i sar., 2008).

Snažnija proliferacija slabije polarizovanih alogenih CD4⁺ T-limfocita stimulisanih sa MoLC u našoj studiji, mogla bi da bude posledica snažnije produkcije TGF- β u kokulturi. Izneta pretpostavka bi bila u skladu sa pokazanim *in vitro* efektom TGF- β koji, mehanizmom nezavisnim od IL-2, inhibira apoptozu i podstiče proliferaciju naivnih CD4⁺ T-limfocita, aktiviranih anti-CD3 i anti-CD28 antitelom (Sung i sar., 2003).

5.5. Uticaj ligacije CD40 molekula na fenotipske i funkcionalne karakteristike MoLC u zavisnosti od njihovog pretretmana

Vezivanje CD40 molekula na DC indukuje njihovu maturaciju, tako što, između ostalog, povećava ekspresiju MHC molekula II klase, kostimulacijskih (CD80, CD86) i adhezivnih molekula (CD54), kao i sposobnost produkcije IL-12, čime doprinosi snažnijoj APC, sposobnosti polarizacije imunskog odgovora CD4⁺ T-limfocita u Th1 smeru, pokretanju CTL odgovora i povećanju proliferacije T-limfocita (Ma i Clark, 2009). Mi smo, međutim, pokazali da aktivacija CD40 molekula na nestimulisanim, nMoLC izaziva oprečne efekte.

5.5.1. MoLĆ u prisustvu CD40L

Ligacija CD40 molekula pomoću CD40L na nMoLĆ je povećala ekspresiju CD86, CD80, CD40, CD83 i CD54, snizila CCR7, i nije uticala na ekspresiju HLA-DR. Ispoljenost CD83 i CD86 molekula je i nakon vezivanja CD40 molekula ostala niska. Slaba ekspresija CD83 molekula na MoLĆ u našoj studiji mogla je da bude uzrok niske ekspresije CD86 molekula pod uticajem IL-10. Ova pretpostavka bi bila u skladu sa podacima iz *ex vivo* studije na mišjim DĆ koja je pokazala da IL-10 preko transmembranskog regiona CD83 pokreće inhibiciju MARCH1-posredovanu ubikvitinaciju i degradaciju CD86 molekula (Tze i sar., 2011). Fenotip MoLĆ posle aktivacije CD40 molekula u našoj studiji odgovara rezultatima dobijenim na slično kultivisanim LĆ, koje su nakon 18h aktivacije sa CD40L-transfektovanim J558 ćelijama povećale ekspresiju CD83, CD80, CD86, CD54 i CD40, i nisu promenile ekspresiju HLA-DR (Peiser i sar., 2004).

nMoLĆ su nakon 24h aktivacije CD40 molekula slabije proizvele IL-6, IL-23 i TNF- α , i nisu izmenile IL-12, IL-10, IL-27 i IL-1 β . Dobijeni rezultati delimično odgovaraju podacima dobijenim u *in vitro* studiji gde MoDĆ nakon 24h stimulacije rhCD40L nisu značajnije promenile produkciju IL-12, IL-10, TNF- α i IL-6 (Megiovanni i sar., 2004). Nađena nepodudarnost u sekreciji TNF- α i IL-6 je verovatno posledica razlike u eksperimentalnom modelu. Slabija sekrecija IL-6 i TNF- α , uz nepromenjenu, nisku produkciju IL-1 β od strane MoLĆ nakon aktivacije CD40 molekula, mogla je da bude razlog smanjenja sekrecije IL-2 u ko-kulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Izneti pretpostavka je u skladu sa rezultatima dobijenim na ksenogenom modelu MLR između mišjih splenocita i humanih CD4⁺ T-limfocita koji su pokazali da IL-6 i TNF- α indukuju sekreciju / ekspresiju IL-2 / IL-2R pod uticajem IL-1 β (Panzer i sar., 1993, Kimber i sar., 2000).

MoLĆ su nakon stimulacije rhCD40L slabije indukovale produkciju IL-17 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, i nisu promenile sekreciju IFN- γ i IL-4. Smanjena sekrecija IL-6 i IL-23 bez značajnije promene IL-1 β od strane MoLĆ nakon aktivacije CD40 molekula, ukazuje na njihovu smanjenu sposobnost indukcije Th17 imunskog odgovora. Naši rezultati su u suprotnosti sa podacima iz *ex vivo*

studije koja je pokazala da CD40^{-/-} mišje DĆ nakon imunizacije Gram-pozitivnim bakterijama ne uspostavljaju Th17 imunski odgovor zbog odsustva sekrecije IL-6 (Perona-Wright i sar., 2009). Pokazane razlike u polarizaciji Th17 imunskog odgovora verovatno su posledica razlike u eksperimentalnom modelu.

MoLĆ su nakon vezivanja CD40 molekula pokazale slabiji alostimulacijski potencijal u višim odnosima, kao i u najnižem odnosu MoLĆ:CD4⁺ T (1:10, 1:20, 1:160), a snažniji u preostalim odnosima (1:40, 1:80). Slabija proliferacija alogenih CD4⁺ T-limfocita pri najvišem MoLĆ:CD4⁺ T odnosu u našoj studiji u skladu je sa analiziranim fenotipom, kao i produkcijom citokina u kulturi MoLĆ, odnosno kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Nađena snažnija ekspresija CD80 u odnosu na CD86 na MoLĆ se može povezati sa inhibicijom proliferacije alogenih CD4⁺ T-limfocita putem negativne kostimulacije preko CD152 (CTLA-4) eksprimiranog na ovim limfocitima. Ova pretpostavka bi bila u skladu sa ranije pokazanim većim afinitetom i aviditetom CD152 za CD80 u poređenju sa CD86 (Bhatia i sar., 2006) kao i sa ponovnim uspostavljanjem proliferacijskog potencijala mišjih CD28^{-/-} CD8⁺ T-limfocita nakon dodavanja anti-CD80 i anti-CTLA-4 monoklonskih antitela u njihovu kulturu sa ćelijama tumorske P815 linije (mastocitom) (Fallarino i sar., 1998, Alegre i sar., 2001). Aktivacija CD40 molekula na nMoLĆ pomoću rhCD40L, mogla je, takođe, da doprinese inhibiciji proliferacije alogenih CD4⁺ T-limfocita tako što bi povećala ekspresiju FasL (CD95L/APO-1L) na nMoLĆ u uslovima niže produkcije IFN- γ , kao što je to bio slučaj u našem eksperimentu. FasL, eksprimiran na MoLĆ, može pokrenuti apoptozu alogenih CD4⁺ T-limfocita mehanizmom aktivacije AICD nakon vezivanja za Fas molekule ispoljene na njihovoj površini. Izneta pretpostavka poklapa se sa rezultatima *ex vivo* studije koja je pokazala da se apoptoza Jurkat ćelija nakon kostimulacije epidermalnim LĆ, koje su pre toga bile stimulisane anti-CD40-antitelom, može u potpunosti inhibirati samo nakon dodavanja anti-FasL antitela, mehanizmom nezavisnim od prisustva IFN- γ ili LPS (Shibaki i Katz, 2001). Snižena produkcija IL-2 i povećana sekrecija IL-10 u kokulturi nMoLĆ aktiviranog CD40 molekula sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, bila je u skladu sa smanjenjem proliferacije limfocita u najvišem MoLĆ:CD4⁺ T (1:10) odnosu. Ova tvrdnja odgovara eksperimentalnim podacima dobijenim na humanom i mišjem modelu, da inhibicija proliferacije T-

limfocita nakon stimulacije egzogenim IL-10 nije posledica promene ekspresije ili afiniteta IL-2R, T-ćelijskog receptora (TCR)-CD3, CD2, CD28 ili LFA-1 molekula, već inhibicije sinteze i sekrecije IL-2 na nivou mRNA (de Waal Malefyt i sar., 1993, Busse i sar., 2010, Moore i sar., 2001).

Fenotipske i funkcionalne promene MoLĆ uslovljene aktivacijom CD40 molekula u našoj studiji u skladu su sa rezultatima druge slične *in vitro* studije, osim što su MoLĆ u našem eksperimentu snažnije produkovale IL-10 i pokazale slabiji alostimulacijski potencijal u MLR (Peiser i sar., 2004). Nađeni nesklad u produkciji IL-10 može biti posledica razlike u načinu aktivacije CD40 molekula, pošto su u pomenutoj studiji kao responderi korišćeni CD40L⁺ mišji fibroblasti. Povećanje produkcije IL-10 od strane ovih MoLĆ je doprinelo smanjenju njihovog alostimulacijskog potencijala. Slabljenje alostimulacijskog potencijala MoDĆ nakon aktivacije CD40 pod uticajem autokrinog dejstva IL-10 odranije je poznat fenomen (Corinti i sar., 2001).

Polazeći od upravo iznetih rezultata, a uzevši u obzir i podatke iz *in vitro* studije da TGF- β ne može da blokira maturaciju MoLĆ u prisustvu TNF- α i IL-1 β nakon aktivacije CD40 molekula (Geissmann i sar., 1999), mogli bismo da pretpostavimo kako konačni efekat aktivacije CD40 na LĆ *in vivo* ipak prevashodno zavisi od citokinskog sastava lokalne mikrosredine. U tom smislu, možda je upravo interakcija između CD40 molekula na LĆ i CD40L na lokalnim epitelnim ćelijama u mikrosredini bogatoj TGF- β jedan od potencijalnih mehanizama kojima se LĆ održavaju u inaktivnom stanju u odsustvu stimulacije agonistima PRR i proinflamacijskim medijatorima *in vivo*. Radi potvrde ove hipoteze ispitali smo posledice aktivacije CD40 molekula na MoLĆ koje su prethodno bile stimulisane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, a potom ih uporedili sa MoLĆ koje su bile pojedinačno pretretirane ovim PRR agonistima.

5.5.2. MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana

Vezivanje CD40 molekula na MoLĆ pretretiranim Poly(I:C) i curdlanom, povećalo je ekspresiju CD86, CD40 i CCR7, snizilo CD83 i CD54, i nije promenilo ispoljenost HLA-DR i CD80. Ove MoLĆ su i snažnije indukovale proliferaciju

alogenih CD4⁺ T-limfocita u svim analiziranim odnosima MoLĆ: CD4⁺ T (1:10-1:160), u poređenju sa MoLĆ stimulisanim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana.

Opisana fenotipska ekspresija i alostimulacijski potencijal MoLĆ nakon stimulacije rhCD40L u našoj studiji, uglavnom su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima. *Ex vivo* dobijene LĆ, izolovane iz kožnih biopsija, koje su nakon 48h kultivacije sa CD40L-transfektovanim J558 ćelijama povećale ekspresiju CD83, CD54 i CD86, a nisu promenile HLA-DR i CD80, ispoljile su snažniji alostimulacijski potencijal u poređenju sa netretiranom kontrolom (Peguet-Navarro i sar., 1995). Odstupanje u ekspresiji CD83 i CD54 na našim MoLĆ u poređenju sa navedenom studijom moglo bi da bude posledica razlike u terminima stimulacije, ali i u vrsti eksperimentalnog modela i načinu stimulacije, budući da smo mi koristili *in vitro* dobijene MoLĆ koje su pre stimulacije rhCD40L bile pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana. Ne može se, takođe, isključiti ni mogućnost dodatnog povećanja ekspresije ovih markera nakon uspostavljanja kontakta između MoLĆ i alogernih CD4⁺ T-limfocita, budući da je odranije poznato da se posle vezivanja CD40 molekula na DĆ sa CD40L na CD4⁺ T-limfocitu, između ostalog, povećava ekspresija HLA-DR, CD54, CD86/CD80 na DĆ čime se osnažuje njihova sposobnost antigenske prezentacije i kostimulacije (Ma i Clark, 2009).

Osim opisane ekspresije površinskih markera, snažnijem alostimulacijskom potencijalu MoLĆ u najvišem odnosu prema alogernim CD4⁺ T-limfocitima (1:10) u našoj studiji, mogla je da doprinese i snažnija produkcija IL-2 u njihovoj kokulturi, poznatog faktora rasta (Smith, 1988). Izgleda da povećanje sekrecije IL-10 nije bilo dovoljno kako bi uz nepromenjenu produkciju TGF-β dovelo do inhibicije proliferacije alogernih CD4⁺ T-limfocita, što bi moglo biti posledica neadekvatne ekspresije ili signalizacije preko IL-10R. Poznato je, naime, da inhibitorni efekat TGF-β na aktiviranim CD4⁺ T-limfocitima delimično zavisi i od IL-10 koji reguliše ekspresiju TGF-βIR (Cottrez i Groux, 2001, Moore i sar., 2001).

MoLĆ, pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, nakon stimulacije rhCD40L snažnije su sekretovale IL-12, a slabije IL-10, što je dovelo do povećanja odnosa IL-12 / IL-10. Ove MoLĆ su u kokulturi sa alogernim CD4⁺ T-limfocitima snažnije indukovale sekreciju IFN-γ i IL-4 pri čemu nisu izmenile odnos IFN-γ / IL-

4 koji je ostao u korist IFN- γ . U skladu sa prethodnim, a uzevši u obzir i da je analiza kinetike citokinske produkcije pokazala kako povećanje sekrecije IL-12 vremenski prethodi povećanju sekrecije IFN- γ (Langenkamp i sar., 2000), mogli bismo da pretpostavimo kako su MoLĆ u našoj studiji ipak ispoljile snažniji potencijal za indukciju Th1 imunskog odgovora. Slabija produkcija IL-10, i snažnija sekrecija IL-12 od strane spomenutih MoLĆ, kao i njihova snažnija sposobnost da indukuju produkciju IFN- γ , u skladu je sa rezultatima *in vitro* studije u kojoj dodavanje anti-IL-10 neutrališućih antitela u kulturu MoDĆ povećava sekreciju IL-12, kao i njihovu sposobnost da indukuju Th1 imunski odgovor (Corinti i sar., 2001).

Slabija sekrecija IL-1 β i IL-6 od strane MoLĆ u našem eksperimentu, mogla je da doprinese slabijoj produkciji IL-17 u njihovoj kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Nađeni rezultati odgovaraju ranije objavljenim podacima da su IL-1 β i IL-6 ključni citokini koji u humanom *in vitro* sistemu indukuju nastanak CD4⁺Th17 ćelija (Benwell i Lee, 2010).

Osim što bi doprinela slabljenju produkcije IL-17, snažnija sekrecija IL-2 u našoj kulturi je mogla da stimuliše alogene CD4⁺ T-limfocite da sekretuju IL-4. Izneta pretpostavka je u skladu sa rezultatima kombinovanih *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnih istraživanja koja su na mišjem sistemu pokazala da neutralizacija IL-2 anti-IL-2-blokirajućim antitelom dovodi do smanjenja produkcije IL-4 bez uticaja na proliferaciju CD4⁺ T-limfocita (Cote-Sierra i sar., 2004), kao i da dodavanje visokih koncentracija IL-2 u citokinskom okruženju koje favorizuje Th17 imunski odgovor indukuje nastanak Treg (Laurence i sar., 2007).

Kako dosad nije bilo studija koje su ispitivale efekte aktivacije CD40 molekula na DĆ pretretiranim kombinacijom agonista, rezultati dobijeni u našem eksperimentu zahtevaju dodatnu procenu.

Rezultate dobijene nakon aktivacije CD40 molekula na MoLĆ pretretiranim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana uporedili smo sa eksperimentalnim podacima na MoLĆ koje su bile pojedinačno stimulisane ovim agonistima.

5.5.2.1. Poređenje između MoLĆ pretretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana i MoLĆ pretretiranih Poly(I:C)

MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, nakon aktivacije CD40 molekula snažnije su ispoljile HLA-DR i CD40 molekul, slabije CD80 i CD54, i nisu izmenile ekspresiju CD86, CD83 i CCR7, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim Poly(I:C). Ove MoLĆ su snažnije indukovale proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u višem (1:20), ali i u najnižem određivanom odnosu MoLĆ:CD4⁺ T (1:160), u poređenju sa prethodno spomenutom kontrolom. Nije bilo značajne razlike u proliferaciji ovih ćelija u preostalim odnosima MoLĆ: CD4⁺ T (1:10, 1:40, 1:80), iako je u najvišem odnosu (1:10) uočljiva snažnija tendencija proliferacije alogenih CD4⁺ T-limfocita.

Snažnija ekspresija CD40 na MoLĆ pretretiranim kombinacijom agonista nakon stimulacije rhCD40L, mogla je da doprinese jačanju proliferacije alogenih CD4⁺ T-limfocita tako što bi produžila preživljavanje MoLĆ. Naime, na *ex vivo* izolovanim mišjim DĆ, pokazano je da visoka ekspresija CD40 molekula smanjuje apoptozu ovih ćelija pokrenutu interakcijom MHC molekula II klase / TCR nakon uspostavljanja kontakta sa T-limfocitima (McLellan i sar., 2000a). Nadovezujući se na prethodno, a uzimajući u obzir i da je poznato kako su zrele DĆ uglavnom otporne na apoptozu posredovanu ligacijom Fas molekula (McLellan i sar., 2000b), mogli bismo da pretpostavimo kako bi MoLĆ tretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, nakon aktivacije CD40 molekula obezbedile dužu stimulaciju CD4⁺ T-limfocita u odnosu na MoLĆ pojedinačno stimulisane Poly(I:C). U prilog produženog preživljavanja CD4⁺ T-limfocita koji su bili u kokulturi sa kombinovano stimulisanim MoLĆ, bile bi i snažnija sposobnost sekrecije TNF- α od strane ovih LĆ, za koji je pokazano da ima antiapoptotski autokrini efekat na DĆ (Lehner i sar., 2012), slabija ekspresija CD80 molekula na površini MoLĆ, koji nakon vezivanja za CD152 na T-limfocitima doprinosi, između ostalog i slabljenju njihove proliferacije (Sansom i sar., 2003), kao i snažnija produkcija IL-2 u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima. Snažnija produkcija IL-10 i TGF- β u alogenoj kokulturi sa kombinovano tretiranim MoLĆ mogla bi biti značajan faktor regulacije kojim bi se

regulisao intenzitet Th1 i Th17 imunskog odgovora indukovano od strane ovih ćelija (Kubo i Motomura, 2012).

MoLĆ stimulirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije sekretovale IL-27 i TNF- α , što bi i pored nepromenjene produkcije IL-12 a snažnije produkcije IL-10, mogao da bude razlog povećane produkcije IFN- γ u kokulturi sa alogenim CD4⁺ T-limfocitima, u odnosu na MoLĆ pretretirane sa Poly(I:C). Prethodna pretpostavka je u skladu sa sposobnošću IL-27 i TNF- α da povećaju ekspresiju IL-12R na naivnim CD4⁺ T-limfocitima, čime potenciraju Th1 polarizacioni efekat IL-12 (Ahlers i sar., 2001, Lucas i sar., 2003). Pored toga, uzevši u obzir da je i pored snažnije produkcije IL-4 u kokulturi CD4⁺ T-limfocita sa kombinovano stimuliranim MoLĆ, odnos IFN- γ / IL-4 bio veći u poređenju sa kokulturom u kojoj su bile MoLĆ stimulirane samo sa Poly(I:C), možemo pretpostaviti da je niži odnos IL-12 / IL-10 u kulturi kombinovano stimuliranih MoLĆ bio posledica specifične dinamike u sekreciji. Opisana dinamika u citokinskoj produkciji mogla bi da odgovara vremenskom periodu kada se nakon naglog porasta produkcije IL-12 od strane MoDĆ, koji je doprineo uspostavljanju Th1 imunskog odgovora, njegova produkcija naglo vraća na niske vrednosti, dok sekrecija IL-10, za to vreme, postepeno raste i zadržava se u plato-fazi u dužem vremenskom periodu (Langenkamp i sar., 2000).

5.5.2.2. Poređenje između MoLĆ pretretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana i MoLĆ pretretiranih curdlanom

MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije ekspimirale CD40 i CCR7, slabije CD54, i nisu izmenile HLA-DR, CD86, CD80 i CD83, u odnosu na MoLĆ pojedinačno tretirane curdlanom. MoLĆ tretirane kombinacijom agonista su nakon aktivacije CD40 molekula indukovale snažniju proliferaciju alogenih CD4⁺ T-limfocita u najvišem (1:10), ali i u najnižim odnosima MoLĆ: CD4⁺ T (1:80, 1:160), u poređenju sa MoLĆ koje su bile pretretirane samo curdlanom. Nije bilo značajne razlike u proliferaciji ovih limfocita u preostalim odnosima MoLĆ: CD4⁺ T (1:20, 1:40).

Sposobnost MoLĆ stimuliranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana u našem eksperimentu, da nakon vezivanja CD40 molekula, indukuju snažniju proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u najvišem odnosu MoLĆ:CD4⁺ T (1:10), u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimuliranim curdlanom, mogla bi biti posledica snažnije produkcije IL-2, a slabije IL-10 u njihovoj kokulturi pri istom odnosu.

Snažnija produkcija IL-12, IL-27 i TNF- α od strane kombinovano tretiranih MoLĆ nakon aktivacije CD40 molekula, bila je u skladu sa povećanom sposobnošću indukcije IFN- γ a slabije IL-4 u kokulturi sa alogernim CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimuliranim sa curdlanom. Sposobnost IL-27 i TNF- α da indukuju povećanje ekspresije IL-12R na CD4⁺ T-limfocitima, kao i da na taj način indirektno indukuju povećanje produkciju IFN- γ , poznata je od ranije (Ahlers i sar., 2001, Lucas i sar., 2003). MoLĆ koje su bile stimulirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana u našoj studiji, pokazale su potencijal da nakon aktivacije CD40 molekula snažnije indukuju Th1 imunski odgovor u poređenju sa MoLĆ stimuliranim sa curdlanom, na šta ukazuje i veći odnos IFN- γ / IL-4 u njihovoj kokulturi sa alogernim CD4⁺ T-limfocitima. Opisane funkcionalne karakteristike kombinovano tretiranih MoLĆ u našoj studiji poklapaju se sa podacima dobijenim u drugoj *in vitro* studiji gde su MoLĆ nakon aktivacije CD40 molekula i pored snažnije produkcije IL-10, snažnije indukovale Th1 imunski odgovor (Peiser i sar., 2004). Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima *in vitro* studija koje su pokazale da porast produkcije IL-12 od strane MoDĆ, nakon stimulacije CD40L, prethodi porastu sekrecije IL-10, što bi mogao da bude način za regulisanje intenziteta Th1 polarizacijskog odgovora (Cella i sar., 1996, Kalinski i sar., 1999, O'Garra i Robinson, 2004). Veći odnos IL-12 / IL-10 u kulturama MoLĆ tretiranih kombinacijom agonista nakon aktivacije CD40 molekula, takođe, ukazuje na njihov snažniji potencijal da indukuju Th1 imunski odgovor, u poređenju sa MoLĆ stimuliranim curdlanom.

Snažnija sekrecija IL-1 β i IL-23 nakon vezivanja CD40 molekula od strane MoLĆ pretretiranih kombinacijom Poly(I:C) i curdlana, odgovarala bi snažnijoj produkciji IL-17 u alogenoj kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima, u poređenju sa MoLĆ pojedinačno stimuliranim curdlanom. Izložena pretpostavka je u skladu sa

rezultatima *in vitro* studije u kojoj su naivni CD4⁺ T-limfociti, stimulisani anti-CD3 i anti-CD28 antitelom, najsnažnije sekretovali IL-17 u prisustvu IL-1 β i TGF- β , nezavisno od prisustva IL-6 (Benwell i Lee, 2010). Na sličnom eksperimentalnom modelu je nešto ranije pokazano da IL-23 nema uticaja na indukciju, već samo na održavanje populacije Th17 limfocita, iz čega proizilazi da bi snažnija produkcija IL-23 mogla da doprinese stabilnijem Th17 imunskom odgovoru u našoj studiji (Stritesky i sar., 2008).

5.6. Razlike u fenotipskim i funkcionalnim osobinama između identično pretretiranih MoDC i MoLC nakon ligacije CD40 molekula

Na MoLC pretretiranim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana je nakon vezivanja CD40 molekula došlo do povećanja ekspresije HLA-DR, CD40 i CCR7 molekula, i nije bilo promene CD86, C80 i CD54, u poređenju sa MoDC. Ove MoLC su snažnije indukovale proliferaciju alogernih CD4⁺ T-limfocita u svim određivanim odnosima MoLC:CD4⁺ T (1:10-1:160), u poređenju sa MoDC. Snažnija proliferacija alogernih CD4⁺ T-limfocita stimulisanih sa MoLC u najvišem odnosu MoLC:CD4⁺ T (1:10), mogla bi da bude posledica povećane ekspresije HLA-DR i CD40 na ovim MoLC, kao i snažnije produkcije TNF- α od strane ovih ćelija. Izneti podaci bi bili u skladu sa rezultatima studije koja je pokazala da aktivacija CD40 molekula produžava preživljavanje mišjih DC tako što smanjuje njihovu apoptozu pod uticajem signala koji potiče od HLA-DR:TCR kompleksa, aktiviranog nakon uspostavljanja kontakta između CD40 molekula na DC sa CD40L na T-limfocitu (McLellan i sar., 2000a). Povećano vezivanje CD40 molekula moglo bi, takođe, da doprinese produženom preživljavanju MoLC podsticanjem autokrinog efekta TNF- α , za koji je poznato da, između ostalog, podstiče sintezu antiapoptotskog BAK molekula u prisustvu FLIP_L u DC (Lehner i sar., 2012).

MoLC stimulisane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su nakon aktivacije CD40 molekula snažnije produkovale IL-12, IL-27 i TNF- α , što je odgovaralo povećanju produkcije IFN- γ i IL-2 a smanjenoj IL-4, u kokulturi sa alogernim CD4⁺ T-limfocitima. U skladu sa ranijim studijama možemo da pretpostavimo kako su ove

MoLĆ imale snažniji potencijal da indukuju Th1 imunski odgovor od MoDĆ (Ahlers i sar., 2001, Lucas i sar., 2003).

Povećana sekrecija IL-23 od strane kombinovano stimulisanih MoLĆ odgovarala je nađenom povećanju sekrecije IL-17 u alogenoj kokulturi sa CD4⁺ T-limfocitima (Stritesky i sar., 2008). Možemo pretpostaviti da su MoLĆ u našoj studiji ipak mogle da ispolje snažniju sposobnost indukcije Th17 imunskog odgovora u poređenju sa MoDĆ, i pored snažnije produkcije IL-27, za koji je pokazano da inhibira Th17 polarizacioni efekat IL-23 (Yoshimura i sar., 2006). Razlog za snažniju polarizaciju Th17 imunskog odgovora, i pored visoke produkcije IL-27, mogao bi da bude posledica dominacije stabilno diferenciranih Th17 limfocita u našoj studiji, budući da IL-27 ovaj efekat ostvaruje preko STAT3 transkripcionog faktora koji postoji samo u *de novo* indukovanim Th17 limfocitima (El-behi i sar., 2009).



Kvalitet maturacijskih protokola koji bi obezbedili zrele DĆ za antitumorsku ili antiinfektivnu terapiju vrednuje se na osnovu sposobnosti DĆ da nakon kontakta sa antigen-specifičnim T-limfocitima *in vivo* proizvode IL-12. U skladu sa prethodnim, mi smo u cilju *in vitro* imitacije ovih uslova aktivirali CD40 molekul na MoLĆ, koje su prethodno bile tretirane agonistima PRR, pomoću rhCD40L.

Da bi DĆ mogle da se koriste u obliku autolognih vakcina za antiinfektivnu i antikancersku terapiju, one bi morale da poseduju barem tri bitne karakteristike (Palucka i Banchereau, 2012):

- visoku ekspresiju CCR7 molekula, koja bi im obezbedila sposobnost migracije u smeru visoke koncentracije hemokina CCL19 i CCL21, sekretovanih u sekundarnim limfnim organima
- visok i stabilan nivo ekspresije MHC molekula I i II klase i kostimulacijskih molekula (CD86, CD80, CD54), koji su neophodni za specifičnu aktivaciju T-limfocita,

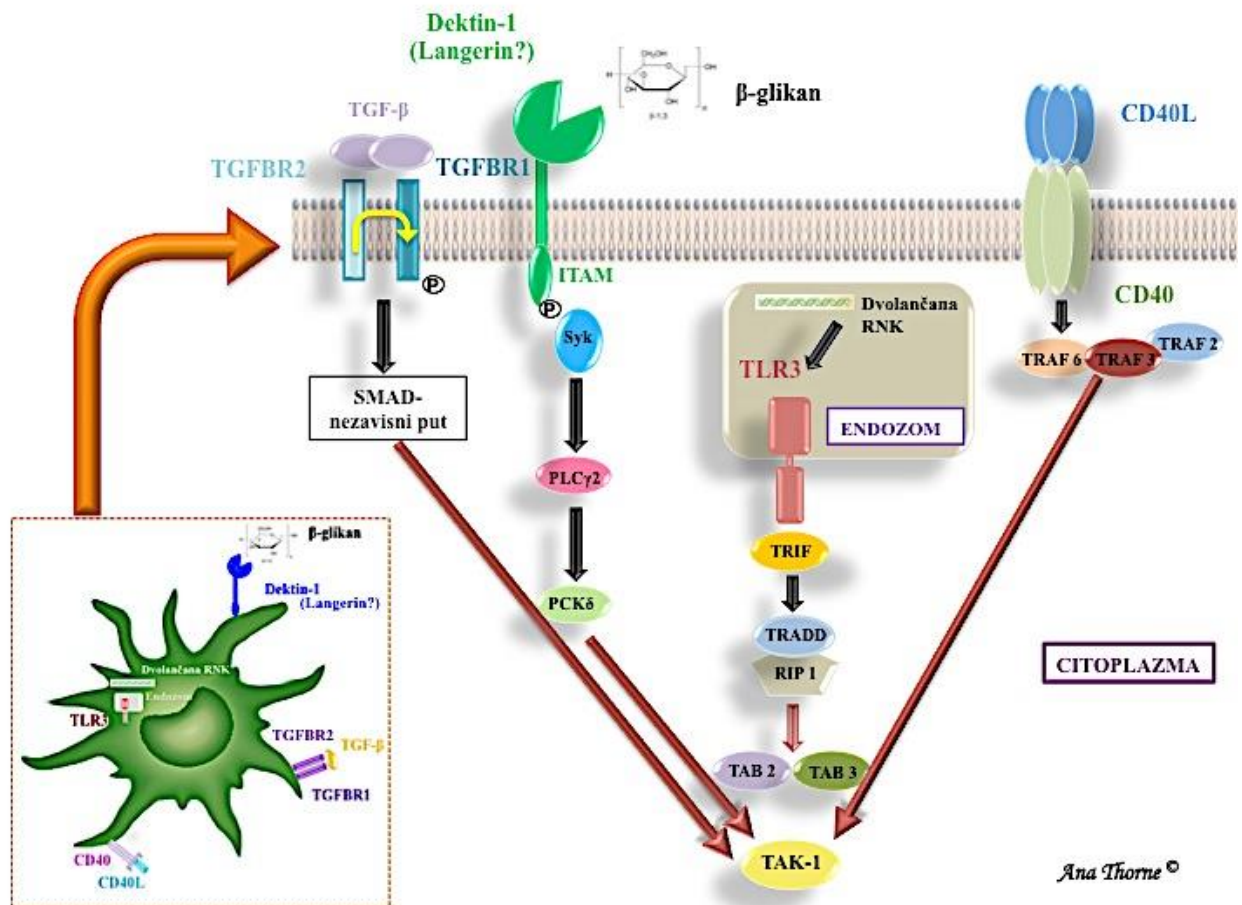
- i značajnu sekundarnu produkciju IL-12 nakon CD40:CD40L interakcije sa aktivisanim T-limfocitima, što je neophodno da bi se imunski odgovor CD4⁺ T-limfocita polarizovao u Th1 smeru, a CD8⁺ T-limfociti ispoljili citotoksičnu efektorsku funkciju.

Moglo bi se očekivati da će MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana nakon aktivacije CD40 molekula ispoljiti snažniji antitumorski i antiinfektivni potencijal u poređenju, kako sa MoLĆ pojedinačno stimulisanim ovim agonistima, tako i sa identično stimulisanim MoDĆ. Ove MoLĆ su snažnije produkovale IL-12, ispoljile snažniju sposobnost indukcije Th1 i Th17 a slabiju sposobnost indukcije Th2 imunskog odgovora, i pokazale snažniji alostimulacijski potencijal CD4⁺ T-limfocita u odnosu na prethodno spomenute kontrole.

Ekspresija CCR7 molekula na DĆ nakon aktivacije CD40 molekula od manjeg je suštinskog značaja za procenu njihovog migracijskog potencijala *in vivo*, budući da se odigrala nakon aktivacije CD40 molekula, kada ove ćelije i inače prestaju da migriraju pošto su uspostavile kontakt sa T-limfocitima. Pravi značaj, međutim, ekspresija CCR7 molekula na DĆ nakon vezivanja CD40 molekula dobija tek kada je potrebno proceniti njihov migracijski potencijal u sastavu *ex vivo* dobijenih vakcina koje su bazirane na DĆ. U našoj studiji, MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana su nakon stimulacije rhCD40L snažnije ekspimirale CCR7 molekul i tako pokazale snažniji migracijski potencijal, u poređenju sa identično tretiranim MoDĆ i MoLĆ pojedinačno tretiranim curdlanom, dok u odnosu na MoLĆ pretretirane Poly(I:C) nije bilo razlike u ekspresiji ovog molekula.

Opisane fenotipske i funkcionalne promene na MoLĆ mogle bi biti posledica integracije receptorskih signala koje pokreću TGF-β, prisutan u medijumu za kultivaciju, agonisti PRR, Poly(I:C) i curdlan, kao i formiranje CD40:CD40L kompleksa. Izneta pretpostavka bi se mogla poklopiti sa funkcijom Tak-1 (eng. *Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1*) iz familije MAP kinaza. Aktivnost Tak-1, kao jedne od najvažnijih signalnih kontrolnih tačaka u životnom ciklusu DĆ, modulirana je pokretanjem signala sa TLR3 (Jiang i sar., 2003), dectin-1 receptora (Gorjestani i sar., 2012), SMAD-nezavisnim mehanizmom sa TGF-β

receptora (Yamashita i sar., 2008) i CD40:TRAF6 kompleksom (Pype i sar., 2000). Tak-1 reguliše preživljavanje DC, njihov alostimulatorni potencijal i sposobnost indukcije IFN- γ i IL-2 modifikacijom aktivnosti NF- κ B i ACT/Foxo signalnog puta (Wang i sar., 2012) (*Slika 6*).



Slika 6. Pretpostavljeni mehanizam kooperacije signalnih puteva u Langerhansovim ćelijama

Dosad nije bilo objavljenih podataka koji bi ukazali na posledice stimulacije MoL \acute{C} kombinacijom agonista PRR, niti onih koji bi ih uporedili sa konvencionalnim MoD \acute{C} . Analiza rezultata dobijenih u našem istraživanju ukazuje na značajnu fenotipsku i funkcionalnu plastičnost ovih ćelija koja bi omogućila uključivanje MoL \acute{C} u razvoj protokola za dobijanje vakcina baziranih na D \acute{C} .

Budući da smo pokazali kako MoLĆ, u zavisnosti od vrste tretmana, mogu da ispolje imunoregulacijski potencijal, njihova terapijska primena bi, osim od vrste bolesti, zavisila i od faze bolesti, odnosno morala bi da se individualno prilagodi svakom pacijentu u zavisnosti od nivoa aktivacije imunskog sistema i stepena inflamacije određenih kliničkim stadijumom bolesti. U tom slučaju bi presudni uslovi za primenu MoLĆ umesto MoDĆ kao ćelijskih adjuvansa u vakcinama bili vremenska i prostorna stabilnost terapijski povoljnih fenotipskih i funkcionalnih karakteristika MoLĆ *in vivo*.

6. ZAKLJUČCI

-
- Tretman MoLĆ koktelom proinflamacijskih medijatora povećava fenotipsko sazrevanje i ekspresiju CCR7 molekula na ovim ćelijama, stimuliše Th1 i Th2 imunski odgovor, ali snižava njihov potencijal alostimulacije.
 - Tretman MoDĆ koktelom proinflamacijskih medijatora povećava fenotipsko sazrevanje, potencijal alostimulacije i sposobnost indukcije Th2 imunskog odgovora.
 - MoLĆ tretirane koktelom proinflamacijskih medijatora pokazuju snažniju sposobnost indukcije Th1 i Th17 imunskog odgovora, ali i slabiji potencijal alostimulacije i slabiju ekspresiju CCR7 molekula u odnosu na MoDĆ.
 - MoLĆ stimulisane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana ispoljavaju snažniji potencijal alostimulacije, kao i snažniju sposobnost indukcije Th1 imunskog odgovora, a slabije indukuju produkciju IL-10, u poređenju sa MoLĆ koje su stimulisane pojedinačnim agonistima.
 - MoLĆ tretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana ispoljavaju snažniji potencijal alostimulacije i snažniju indukciju IL-10 i TGF- β , a slabiju sposobnost indukcije Th17 imunskog odgovora u odnosu na MoDĆ.
 - Ligacija CD40 molekula na nezrelim MoLĆ dovodi do fenotipskog sazrevanja ovih ćelija praćenog sniženjem potencijala alostimulacije i smanjenom sposobnošću indukcije Th17 imunskog odgovora alogenih CD4⁺ T-limfocita, u odnosu na nestimulisane MoLĆ.
-

- Nezrele MoLĆ nakon tretmana CD40L ispoljavaju niži potencijal alostimulacije i slabiji potencijal za indukciju Th17 imunskog odgovora, a jaču sposobnost da indukuju Th1 imunski odgovor u poređenju sa MoDĆ.

- MoLĆ pretretirane kombinacijom Poly(I:C) i curdlana nakon aktivacije CD40 molekula ispoljavaju snažniji potencijal alostimulacije i indukcije Th1 imunskog odgovora u poređenju sa MoLĆ pojedinačno pretretiranim Poly(I:C) ili curdlanom.

- Vezivanje CD40 molekula na MoLĆ pretretiranim kombinacijom Poly(I:C) i curdlana dovodi do povećanja njihove sposobnosti alostimulacije i potencijala za indukciju Th1 i Th17 imunskog odgovora, ali i produkcije IL-10, u poređenju sa MoDĆ.

7. LITERATURA

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V., NAPOLITANI, G., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 8, 942-9.
- ADAMS, M., NAVABI, H., JASANI, B., MAN, S., FIANDER, A., EVANS, A. S., DONNINGER, C. & MASON, M. 2003. Dendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]:poly [C(12)U] (Ampligen R). *Vaccine*, 21, 787-90.
- AHLERS, J. D., BELYAKOV, I. M., MATSUI, S. & BERZOFSKY, J. A. 2001. Signals delivered through TCR instruct IL-12 receptor (IL-12R) expression: IL-12 and tumor necrosis factor-alpha synergize for IL-12R expression at low antigen dose. *Int Immunol*, 13, 1433-42.
- AKIRA, S. 2006. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 311, 1-16.
- ALEGRE, M. L., FRAUWIRTH, K. A. & THOMPSON, C. B. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*, 1, 220-8.
- ANGEL, C. E., LALA, A., CHEN, C. J., EDGAR, S. G., OSTROVSKY, L. L. & DUNBAR, P. R. 2007. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int Immunol*, 19, 1271-9.
- ARDAVIN, C., MARTINEZ DEL HOYO, G., MARTIN, P., ANJUERE, F., ARIAS, C. F., MARIN, A. R., RUIZ, S., PARRILLAS, V. & HERNANDEZ, H. 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*, 22, 691-700.
- ASTE-AMEZAGA, M., MA, X., SARTORI, A. & TRINCHIERI, G. 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol*, 160, 5936-44.
- BAFICA, A., SCANGA, C. A., FENG, C. G., LEIFER, C., CHEEVER, A. & SHER, A. 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med*, 202, 1715-24.
- BAN, E., DUPRE, L., HERMANN, E., ROHN, W., VENDEVILLE, C., QUATANNENS, B., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., CAPRON, A. & RIVEAU, G. 2000. CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo. *Int Immunol*, 12, 737-45.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BANERJEE, D. K., DHODAPKAR, M. V., MATAYEVA, E., STEINMAN, R. M. & DHODAPKAR, K. M. 2006. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood*, 108, 2655-61.
- BECHETOILLE, N., ANDRE, V., VALLADEAU, J., PERRIER, E. & DEZUTTER-DAMBUYANT, C. 2006. Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*, 80, 45-58.
- BEIGNON, A. S., BRIAND, J. P., MULLER, S. & PARTIDOS, C. D. 2001. Immunization onto bare skin with heat-labile enterotoxin of Escherichia coli

- enhances immune responses to coadministered protein and peptide antigens and protects mice against lethal toxin challenge. *Immunology*, 102, 344-51.
- BELYAKOV, I. M., HAMMOND, S. A., AHLERS, J. D., GLENN, G. M. & BERZOFKY, J. A. 2004. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest*, 113, 998-1007.
- BENWELL, R. K. & LEE, D. R. 2010. Essential and synergistic roles of IL1 and IL6 in human Th17 differentiation directed by TLR ligand-activated dendritic cells. *Clin Immunol*, 134, 178-87.
- BERTHIER-VERGNES, O., BERMOND, F., FLACHER, V., MASSACRIER, C., SCHMITT, D. & PEGUET-NAVARRO, J. 2005. TNF-alpha enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Lett*, 579, 3660-8.
- BHATIA, S., EDIDIN, M., ALMO, S. C. & NATHENSON, S. G. 2006. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett*, 104, 70-5.
- BJORCK, P., BANCHEREAU, J. & FLORES-ROMO, L. 1997. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol*, 9, 365-72.
- BOHNENKAMP, H. R., PAPAISIS, K. T., BURCHELL, J. M. & TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. 2007. Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses. *Cell Immunol*, 247, 72-84.
- BONIFAZ, L., BONNYAY, D., MAHNKE, K., RIVERA, M., NUSSENZWEIG, M. C. & STEINMAN, R. M. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*, 196, 1627-38.
- BONIFAZ, L. C., BONNYAY, D. P., CHARALAMBOUS, A., DARGUSTE, D. I., FUJII, S., SOARES, H., BRIMNES, M. K., MOLTEDO, B., MORAN, T. M. & STEINMAN, R. M. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*, 199, 815-24.
- BOSCARDIN, S. B., HAFALLA, J. C., MASILAMANI, R. F., KAMPHORST, A. O., ZEBROSKI, H. A., RAI, U., MORROT, A., ZAVALA, F., STEINMAN, R. M., NUSSENZWEIG, R. S. & NUSSENZWEIG, M. C. 2006. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med*, 203, 599-606.
- BOZZACCO, L., TRUMPFHELLER, C., SIEGAL, F. P., MEHANDRU, S., MARKOWITZ, M., CARRINGTON, M., NUSSENZWEIG, M. C., PIPERNO, A. G. & STEINMAN, R. M. 2007. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 1289-94.
- BRAATHEN, L. R., BERLE, E., MOBECH-HANSSSEN, U. & THORSBY, E. 1980. Studies on human epidermal Langerhans' cells: II. Activation of human T lymphocytes to herpes simplex virus. *Acta Derm Venereol*, 60, 381-7.

- BRAATHEN, L. R. & THORSBY, E. 1980. Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scand J Immunol*, 11, 401-8.
- BRIGHT, J. J., KERR, L. D. & SRIRAM, S. 1997. TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J Immunol*, 159, 175-83.
- BROWN, G. D., HERRE, J., WILLIAMS, D. L., WILLMENT, J. A., MARSHALL, A. S. & GORDON, S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197, 1119-24.
- BUSSE, D., DE LA ROSA, M., HOBIGER, K., THURLEY, K., FLOSSDORF, M., SCHEFFOLD, A. & HOFER, T. 2010. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3058-63.
- CAMINSCHI, I., LAHOUD, M. H. & SHORTMAN, K. 2009. Enhancing immune responses by targeting antigen to DC. *Eur J Immunol*, 39, 931-8.
- CAMPBELL, J. D., COOK, G., ROBERTSON, S. E., FRASER, A., BOYD, K. S., GRACIE, J. A. & FRANKLIN, I. M. 2001. Suppression of IL-2-induced T cell proliferation and phosphorylation of STAT3 and STAT5 by tumor-derived TGF beta is reversed by IL-15. *J Immunol*, 167, 553-61.
- CAUX, C., VANBERVLIET, B., MASSACRIER, C., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., DE SAINT-VIS, B., JACQUET, C., YONEDA, K., IMAMURA, S., SCHMITT, D. & BANCHEREAU, J. 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*, 184, 695-706.
- CELLA, M., SALIO, M., SAKAKIBARA, Y., LANGEN, H., JULKUNEN, I. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*, 189, 821-9.
- CELLA, M., SCHEIDEGGER, D., PALMER-LEHMANN, K., LANE, P., LANZAVECCHIA, A. & ALBER, G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184, 747-52.
- CHANG, C. H., FURUE, M. & TAMAKI, K. 1994. Selective regulation of ICAM-1 and major histocompatibility complex class I and II molecule expression on epidermal Langerhans cells by some of the cytokines released by keratinocytes and T cells. *Eur J Immunol*, 24, 2889-95.
- CHANG, J., KUNKEL, S. L. & CHANG, C. H. 2009. Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18327-32.
- CHOE, J., KELKER, M. S. & WILSON, I. A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309, 581-5.
- CHORRO, L., SARDE, A., LI, M., WOOLLARD, K. J., CHAMBON, P., MALISSEN, B., KISSENFENNIG, A., BARBAROUX, J. B., GROVES, R. & GEISSMANN, F. 2009. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*, 206, 3089-100.
- CHUNG, E. J., CHOI, S. H., SHIM, Y. H., BANG, Y. J., HUR, K. C. & KIM, C. W. 2000. Transforming growth factor-beta induces apoptosis in activated murine T

- cells through the activation of caspase 1-like protease. *Cell Immunol*, 204, 46-54.
- CLARK, R. A., CHONG, B. F., MIRCHANDANI, N., YAMANAKA, K., MURPHY, G. F., DOWGIERT, R. K. & KUPPER, T. S. 2006. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol*, 126, 1059-70.
- CLARK, R. A., WATANABE, R., TEAGUE, J. E., SCHLAPBACH, C., TAWA, M. C., ADAMS, N., DOROSARIO, A. A., CHANEY, K. S., CUTLER, C. S., LEBOEUF, N. R., CARTER, J. B., FISHER, D. C. & KUPPER, T. S. 2012. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med*, 4, 117ra7.
- COLE, A. M., GANZ, T., LIESE, A. M., BURDICK, M. D., LIU, L. & STRIETER, R. M. 2001. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol*, 167, 623-7.
- COLVIN, R. A., CAMPANELLA, G. S., SUN, J. & LUSTER, A. D. 2004. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem*, 279, 30219-27.
- CONZELMANN, K. K. 2005. Transcriptional activation of alpha/beta interferon genes: interference by nonsegmented negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 79, 5241-8.
- CORINTI, S., ALBANESI, C., LA SALA, A., PASTORE, S. & GIROLOMONI, G. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol*, 166, 4312-8.
- COTE-SIERRA, J., FOUCRAS, G., GUO, L., CHIODETTI, L., YOUNG, H. A., HULLI, J., ZHU, J. & PAUL, W. E. 2004. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3880-5.
- COTTREZ, F. & GROUX, H. 2001. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol*, 167, 773-8.
- DAS, L. & LEVINE, A. D. 2008. TGF-beta inhibits IL-2 production and promotes cell cycle arrest in TCR-activated effector/memory T cells in the presence of sustained TCR signal transduction. *J Immunol*, 180, 1490-8.
- DE JONG, E. C., SMITS, H. H. & KAPSENBERG, M. L. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*, 26, 289-307.
- DE JONG, M. A., DE WITTE, L. & GEIJTENBEEK, T. B. 2010a. Isolation of Immature Primary Langerhans Cells from Human Epidermal Skin. In: NAIK, S. H. (ed.) *Dendritic Cell Protocols*. Second ed. New York: Humana Press.
- DE JONG, M. A., VRIEND, L. E., THEELEN, B., TAYLOR, M. E., FLUITSMA, D., BOEKHOUT, T. & GEIJTENBEEK, T. B. 2010b. C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Mol Immunol*, 47, 1216-25.
- DE VRIES, J. E. 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol*, 102, 165-9.
- DE WAAL MALEFYT, R., YSSEL, H. & DE VRIES, J. E. 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol*, 150, 4754-65.
- DE WITTE, L., NABATOV, A., PION, M., FLUITSMA, D., DE JONG, M. A., DE GRUIJL, T., PIGUET, V., VAN KOOYK, Y. & GEIJTENBEEK, T. B. 2007. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*, 13, 367-71.

- DIEHL, S. & RINCON, M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*, 39, 531-6.
- DRAGICEVIC, A., DZOPALIC, T., VASILIJIC, S., VUCEVIC, D., BOZIC, B., MAJSTOROVIC, I., BALINT, B. & COLIC, M. 2011. The influence of CD40 ligation and interferon-gamma on functional properties of human monocyte-derived dendritic cells activated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Vojnosanit Pregl*, 68, 301-8.
- DRAGICEVIC, A., DZOPALIC, T., VASILIJIC, S., VUCEVIC, D., TOMIC, S., BOZIC, B. & COLIC, M. 2012. Signaling through Toll-like receptor 3 and Dectin-1 potentiates the capability of human monocyte-derived dendritic cells to promote T-helper 1 and T-helper 17 immune responses. *Cytotherapy*, 14, 598-607.
- DUHEN, T., GEIGER, R., JARROSSAY, D., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*, 10, 857-63.
- EBNER, S., EHAMMER, Z., HOLZMANN, S., SCHWINGSHACKL, P., FORSTNER, M., STOITZNER, P., HUEMER, G. M., FRITSCH, P. & ROMANI, N. 2004. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol*, 16, 877-87.
- EL-BEHI, M., CIRIC, B., YU, S., ZHANG, G. X., FITZGERALD, D. C. & ROSTAMI, A. 2009. Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. *J Immunol*, 183, 4957-67.
- ENK, A. H. & KATZ, S. I. 1992. Early events in the induction phase of contact sensitivity. *J Invest Dermatol*, 99, 39S-41S.
- FALLARINO, F., FIELDS, P. E. & GAJEWSKI, T. F. 1998. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J Exp Med*, 188, 205-10.
- FARBER, J. M. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 61, 246-57.
- FIGDOR, C. G., VAN KOOYK, Y. & ADEMA, G. J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*, 2, 77-84.
- FLACHER, V., BOUSCHBACHER, M., VERRONESE, E., MASSACRIER, C., SISIRAK, V., BERTHIER-VERGNES, O., DE SAINT-VIS, B., CAUX, C., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., LEBECQUE, S. & VALLADEAU, J. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol*, 177, 7959-67.
- FLACHER, V., SPARBER, F., TRIPP, C. H., ROMANI, N. & STOITZNER, P. 2009. Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 58, 1137-47.
- FLACHER, V., TRIPP, C. H., STOITZNER, P., HAID, B., EBNER, S., DEL FRARI, B., KOCH, F., PARK, C. G., STEINMAN, R. M., IDOYAGA, J. & ROMANI, N. 2010. Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J Invest Dermatol*, 130, 755-62.
- FRANK, M. O., KAUFMAN, J., TIAN, S., SUAREZ-FARINAS, M., PARVEEN, S., BLACHER, N. E., MORRIS, M. J., SLOVIN, S., SCHER, H. I., ALBERT, M.

- L. & DARNELL, R. B. 2010. Harnessing naturally occurring tumor immunity: a clinical vaccine trial in prostate cancer. *PLoS One*, 5.
- FRECH, S. A., DUPONT, H. L., BOURGEOIS, A. L., MCKENZIE, R., BELKINDGERSON, J., FIGUEROA, J. F., OKHUYSEN, P. C., GUERRERO, N. H., MARTINEZ-SANDOVAL, F. G., MELENDEZ-ROMERO, J. H., JIANG, Z. D., ASTURIAS, E. J., HALPERN, J., TORRES, O. R., HOFFMAN, A. S., VILLAR, C. P., KASSEM, R. N., FLYER, D. C., ANDERSEN, B. H., KAZEMPOUR, K., BREISCH, S. A. & GLENN, G. M. 2008. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet*, 371, 2019-25.
- FUJITA, H., NOGRALES, K. E., KIKUCHI, T., GONZALEZ, J., CARUCCI, J. A. & KRUEGER, J. G. 2009. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4⁺ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 21795-800.
- FURIO, L., BILLARD, H., VALLADEAU, J., PEGUET-NAVARRO, J. & BERTHIER-VERGNES, O. 2009. Poly(I:C)-Treated human langerhans cells promote the differentiation of CD4⁺ T cells producing IFN-gamma and IL-10. *J Invest Dermatol*, 129, 1963-71.
- FURIO, L., BRIOTET, I., JOURNEAUX, A., BILLARD, H. & PEGUET-NAVARRO, J. 2010. Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol*, 130, 1345-54.
- GAUZZI, M. C., DEL CORNO, M. & GESSANI, S. 2010. Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells. *Immunobiology*, 215, 713-23.
- GEIJTENBEEK, T. B. & GRINGHUIS, S. I. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9, 465-79.
- GEISSMANN, F., DIEU-NOSJEAN, M. C., DEZUTTER, C., VALLADEAU, J., KAYAL, S., LEBORGNE, M., BROUSSE, N., SAELAND, S. & DAVOUST, J. 2002. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med*, 196, 417-30.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327, 656-61.
- GEISSMANN, F., PROST, C., MONNET, J. P., DY, M., BROUSSE, N. & HERMINE, O. 1998. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*, 187, 961-6.
- GEISSMANN, F., REVY, P., REGNAULT, A., LEPELLETIER, Y., DY, M., BROUSSE, N., AMIGORENA, S., HERMINE, O. & DURANDY, A. 1999. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*, 162, 4567-75.
- GERLACH, A. M., STEIMLE, A., KRAMPEN, L., WITTMANN, A., GRONBACH, K., GEISEL, J., AUTENRIETH, I. B. & FRICK, J. S. 2012. Role of CD40 ligation in dendritic cell semimaturation. *BMC Immunol*, 13, 22.
- GINHOUX, F., COLLIN, M. P., BOGUNOVIC, M., ABEL, M., LEBOEUF, M., HELFT, J., OCHANDO, J., KISSENPENNIG, A., MALISSEN, B.,

- GRISOTTO, M., SNOECK, H., RANDOLPH, G. & MERAD, M. 2007. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*, 204, 3133-46.
- GINHOUX, F., TACKE, F., ANGELI, V., BOGUNOVIC, M., LOUBEAU, M., DAI, X. M., STANLEY, E. R., RANDOLPH, G. J. & MERAD, M. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*, 7, 265-73.
- GIROLOMONI, G., CAUX, C., LEBECQUE, S., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2002. Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends Immunol*, 23, 6-8.
- GLENN, G. M., SCHARTON-KERSTEN, T., VASSELL, R., MALLETT, C. P., HALE, T. L. & ALVING, C. R. 1998. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol*, 161, 3211-4.
- GOODRIDGE, H. S., WOLF, A. J. & UNDERHILL, D. M. 2009. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*, 230, 38-50.
- GORIELY, S., MOLLE, C., NGUYEN, M., ALBARANI, V., HADDOU, N. O., LIN, R., DE WIT, D., FLAMAND, V., WILLEMS, F. & GOLDMAN, M. 2006. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood*, 107, 1078-84.
- GORJESTANI, S., DARNAY, B. G. & LIN, X. 2012. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) and TGFbeta-activated kinase 1 (TAK1) play essential roles in the C-type lectin receptor signaling in response to *Candida albicans* infection. *J Biol Chem*, 287, 44143-50.
- GRAYSON, M. H., RAMOS, M. S., ROHLFING, M. M., KITCHENS, R., WANG, H. D., GOULD, A., AGAPOV, E. & HOLTZMAN, M. J. 2007. Controls for lung dendritic cell maturation and migration during respiratory viral infection. *J Immunol*, 179, 1438-48.
- GRUNDSTROM, S., DOHLSTEN, M. & SUNDSTEDT, A. 2000. IL-2 unresponsiveness in anergic CD4+ T cells is due to defective signaling through the common gamma-chain of the IL-2 receptor. *J Immunol*, 164, 1175-84.
- GRUNIG, G., BANZ, A. & DE WAAL MALEFYT, R. 2005. Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacol Ther*, 106, 75-96.
- HANIFFA, M., SHIN, A., BIGLEY, V., MCGOVERN, N., TEO, P., SEE, P., WASAN, P. S., WANG, X. N., MALINARICH, F., MALLERET, B., LARBI, A., TAN, P., ZHAO, H., POIDINGER, M., PAGAN, S., COOKSON, S., DICKINSON, R., DIMMICK, I., JARRETT, R. F., RENIA, L., TAM, J., SONG, C., CONNOLLY, J., CHAN, J. K., GEHRING, A., BERTOLETTI, A., COLLIN, M. & GINHOUX, F. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*, 37, 60-73.
- HASHIMOTO, K. 2000. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci*, 24 Suppl 1, S46-50.
- HAWIGER, D., INABA, K., DORSETT, Y., GUO, M., MAHNKE, K., RIVERA, M., RAVETCH, J. V., STEINMAN, R. M. & NUSSENZWEIG, M. C. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*, 194, 769-79.

- HEGDE, S., PAHNE, J. & SMOLA-HESS, S. 2004. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB J*, 18, 1439-41.
- HEMMI, H., YOSHINO, M., YAMAZAKI, H., NAITO, M., IYODA, T., OMATSU, Y., SHIMOYAMA, S., LETTERIO, J. J., NAKABAYASHI, T., TAGAYA, H., YAMANE, T., OGAWA, M., NISHIKAWA, S., RYOKE, K., INABA, K., HAYASHI, S. & KUNISADA, T. 2001. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int Immunol*, 13, 695-704.
- HOLT, P. G., HAINING, S., NELSON, D. J. & SEDGWICK, J. D. 1994. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol*, 153, 256-61.
- HUANG, F. P., PLATT, N., WYKES, M., MAJOR, J. R., POWELL, T. J., JENKINS, C. D. & MACPHERSON, G. G. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med*, 191, 435-44.
- HUANG, W., NA, L., FIDEL, P. L. & SCHWARZENBERGER, P. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis*, 190, 624-31.
- HUNGER, R. E., SIELING, P. A., OCHOA, M. T., SUGAYA, M., BURDICK, A. E., REA, T. H., BRENNAN, P. J., BELISLE, J. T., BLAUVELT, A., PORCELLI, S. A. & MODLIN, R. L. 2004. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest*, 113, 701-8.
- IGYARTO, B. Z. & KAPLAN, D. H. 2013. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol*, 25, 115-9.
- IJIMA, N., LINEHAN, M. M., SAELAND, S. & IWASAKI, A. 2007. Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19061-6.
- IMHOF, B. A. & AURRAND-LIONS, M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, 4, 432-44.
- INFANTE-DUARTE, C., HORTON, H. F., BYRNE, M. C. & KAMRADT, T. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*, 165, 6107-15.
- ITO, T., INABA, M., INABA, K., TOKI, J., SOGO, S., IGUCHI, T., ADACHI, Y., YAMAGUCHI, K., AMAKAWA, R., VALLADEAU, J., SAELAND, S., FUKUHARA, S. & IKEHARA, S. 1999. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*, 163, 1409-19.
- JAKSITS, S., KRIEHLER, E., CHARBONNIER, A. S., RAPPERSBERGER, K., STINGL, G. & MAURER, D. 1999. CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J Immunol*, 163, 4869-77.
- JANIKASHVILI, N., LARMONIER, N. & KATSANIS, E. 2010. Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. *Immunotherapy*, 2, 57-68.
- JANKOVIC, D., KULLBERG, M. C., FENG, C. G., GOLDSZMID, R. S., COLLAZO, C. M., WILSON, M., WYNN, T. A., KAMANAKA, M., FLAVELL, R. A. & SHER, A. 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source

- of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med*, 204, 273-83.
- JIANG, Z., ZAMANIAN-DARYOUSH, M., NIE, H., SILVA, A. M., WILLIAMS, B. R. & LI, X. 2003. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem*, 278, 16713-9.
- JIN, M. S. & LEE, J. O. 2008. Structures of TLR-ligand complexes. *Curr Opin Immunol*, 20, 414-9.
- JOFFRE, O. P., SEGURA, E., SAVINA, A. & AMIGORENA, S. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 12, 557-69.
- JOHNSEN, I. B., NGUYEN, T. T., RINGDAL, M., TRYGGESTAD, A. M., BAKKE, O., LIEN, E., ESPEVIK, T. & ANTHONSEN, M. W. 2006. Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *EMBO J*, 25, 3335-46.
- JONULEIT, H., KUHN, U., MULLER, G., STEINBRINK, K., PARAGNIK, L., SCHMITT, E., KNOP, J. & ENK, A. H. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*, 27, 3135-42.
- KADOWAKI, N., HO, S., ANTONENKO, S., MALEFYT, R. W., KASTELEIN, R. A., BAZAN, F. & LIU, Y. J. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*, 194, 863-9.
- KALINSKI, P., SCHUITEMAKER, J. H., HILKENS, C. M., WIERENGA, E. A. & KAPSENBERG, M. L. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol*, 162, 3231-6.
- KANITAKIS, J., PETRUZZO, P. & DUBERNARD, J. M. 2004. Turnover of epidermal Langerhans' cells. *N Engl J Med*, 351, 2661-2.
- KARSUNKY, H., MERAD, M., COZZIO, A., WEISSMAN, I. L. & MANZ, M. G. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 198, 305-13.
- KATZ, S. I., TAMAKI, K. & SACHS, D. H. 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature*, 282, 324-6.
- KAWAMURA, T., AZUMA, M., KAYAGAKI, N., SHIMADA, S., YAGITA, H. & OKUMURA, K. 1999. Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *Br J Dermatol*, 141, 201-5.
- KAY, B. K., WILLIAMSON, M. P. & SUDOL, M. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J*, 14, 231-41.
- KELLY, M. N., KOLLS, J. K., HAPPEL, K., SCHWARTZMAN, J. D., SCHWARZENBERGER, P., COMBE, C., MORETTO, M. & KHAN, I. A. 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*, 73, 617-21.

- KIM, B., SARANGI, P. P., AZKUR, A. K., KAISTHA, S. D. & ROUSE, B. T. 2008. Enhanced viral immunoinflammatory lesions in mice lacking IL-23 responses. *Microbes Infect*, 10, 302-12.
- KIMBER, I., CUMBERBATCH, M., DEARMAN, R. J., BHUSHAN, M. & GRIFFITHS, C. E. 2000. Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *Br J Dermatol*, 142, 401-12.
- KLECHEVSKY, E., FLAMAR, A. L., CAO, Y., BLANCK, J. P., LIU, M., O'BAR, A., AGOUNA-DECIAT, O., KLUCAR, P., THOMPSON-SNIPES, L., ZURAWSKI, S., REITER, Y., PALUCKA, A. K., ZURAWSKI, G. & BANCHEREAU, J. 2010. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood*, 116, 1685-97.
- KLECHEVSKY, E., MORITA, R., LIU, M., CAO, Y., COQUERY, S., THOMPSON-SNIPES, L., BRIERE, F., CHAUSSABEL, D., ZURAWSKI, G., PALUCKA, A. K., REITER, Y., BANCHEREAU, J. & UENO, H. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*, 29, 497-510.
- KRYCZEK, I., BANERJEE, M., CHENG, P., VATAN, L., SZELIGA, W., WEI, S., HUANG, E., FINLAYSON, E., SIMEONE, D., WELLING, T. H., CHANG, A., COUKOS, G., LIU, R. & ZOU, W. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 114, 1141-9.
- KUBO, M. & MOTOMURA, Y. 2012. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front Immunol*, 3, 275.
- LANGENKAMP, A., MESSI, M., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1, 311-6.
- LANGERHANS, P. 1868. Über die nerven der menschlichen haut. *Archives of Pathological Anatomy*, 44, 325-37.
- LARREGINA, A. T., MORELLI, A. E., SPENCER, L. A., LOGAR, A. J., WATKINS, S. C., THOMSON, A. W. & FALO, L. D., JR. 2001. Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol*, 2, 1151-8.
- LAURENCE, A., TATO, C. M., DAVIDSON, T. S., KANNO, Y., CHEN, Z., YAO, Z., BLANK, R. B., MEYLAN, F., SIEGEL, R., HENNIGHAUSEN, L., SHEVACH, E. M. & O'SHEA, J. J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26, 371-81.
- LEE, A. W., TRUONG, T., BICKHAM, K., FONTENEAU, J. F., LARSSON, M., DA SILVA, I., SOMERSAN, S., THOMAS, E. K. & BHARDWAJ, N. 2002. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine*, 20 Suppl 4, A8-A22.
- LEE, H. K., DUNZENDORFER, S., SOLDAU, K. & TOBIAS, P. S. 2006. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity*, 24, 153-63.
- LEE, Y. K., TURNER, H., MAYNARD, C. L., OLIVER, J. R., CHEN, D., ELSON, C. O. & WEAVER, C. T. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*, 30, 92-107.

- LEHNER, M., KELLERT, B., PROFF, J., SCHMID, M. A., DIESSENBACHER, P., ENSSER, A., DORRIE, J., SCHAFT, N., LEVERKUS, M., KAMPGEN, E. & HOLTER, W. 2012. Autocrine TNF is critical for the survival of human dendritic cells by regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *J Immunol*, 188, 4810-8.
- LENZ, A., HEINE, M., SCHULER, G. & ROMANI, N. 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest*, 92, 2587-96.
- LI, A. G., LU, S. L., HAN, G., HOOT, K. E. & WANG, X. J. 2006. Role of TGFbeta in skin inflammation and carcinogenesis. *Mol Carcinog*, 45, 389-96.
- LIAO, W., LIN, J. X., WANG, L., LI, P. & LEONARD, W. J. 2011. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol*, 12, 551-9.
- LIU, X., ZHAN, Z., LI, D., XU, L., MA, F., ZHANG, P., YAO, H. & CAO, X. 2011. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nat Immunol*, 12, 416-24.
- LUCAS, S., GHILARDI, N., LI, J. & DE SAUVAGE, F. J. 2003. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15047-52.
- LUFT, T., JEFFORD, M., LUETJENS, P., TOY, T., HOCHREIN, H., MASTERMAN, K. A., MALISZEWSKI, C., SHORTMAN, K., CEBON, J. & MARASKOVSKY, E. 2002. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood*, 100, 1362-72.
- LUTZ, M. B. & SCHULER, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23, 445-9.
- MA, D. Y. & CLARK, E. A. 2009. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol*, 21, 265-72.
- MAILLIARD, R. B., WANKOWICZ-KALINSKA, A., CAI, Q., WESA, A., HILKENS, C. M., KAPSENBERG, M. L., KIRKWOOD, J. M., STORKUS, W. J. & KALINSKI, P. 2004. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*, 64, 5934-7.
- MALEK, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*, 26, 453-79.
- MARTIN-OROZCO, N., MURANSKI, P., CHUNG, Y., YANG, X. O., YAMAZAKI, T., LU, S., HWU, P., RESTIFO, N. P., OVERWIJK, W. W. & DONG, C. 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, 31, 787-98.
- MASCANFRONI, I. D., YESTE, A., VIEIRA, S. M., BURNS, E. J., PATEL, B., SLOMA, I., WU, Y., MAYO, L., BEN-HAMO, R., EFRONI, S., KUCHROO, V. K., ROBSON, S. C. & QUINTANA, F. J. 2013. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nature Immunology*, 14, 1054-1063.
- MATHERS, A. R., JANELSINS, B. M., RUBIN, J. P., TKACHEVA, O. A., SHUFESKY, W. J., WATKINS, S. C., MORELLI, A. E. & LARREGINA, A. T. 2009. Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol*, 182, 921-33.

- MATSUMOTO, M., FUNAMI, K., TANABE, M., OSHIUMI, H., SHINGAI, M., SETO, Y., YAMAMOTO, A. & SEYA, T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 171, 3154-62.
- MCINTOSH, M., STONE, B. A. & STANISICH, V. A. 2005. Curdlan and other bacterial (1->3)-beta-D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, 163-73.
- MCLELLAN, A., HELDMANN, M., TERBECK, G., WEIH, F., LINDEN, C., BROCKER, E. B., LEVERKUS, M. & KAMPGEN, E. 2000a. MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival. *Eur J Immunol*, 30, 2612-9.
- MCLELLAN, A. D., TERBECK, G., MENGLING, T., STARLING, G. C., KIENER, P. A., GOLD, R., BROCKER, E. B., LEVERKUS, M. & KAMPGEN, E. 2000b. Differential susceptibility to CD95 (Apo-1/Fas) and MHC class II-induced apoptosis during murine dendritic cell development. *Cell Death Differ*, 7, 933-8.
- MEGIOVANNI, A. M., SANCHEZ, F., GLUCKMAN, J. C. & ROSENZWAJG, M. 2004. Double-stranded RNA stimulation or CD40 ligation of monocyte-derived dendritic cells as models to study their activation and maturation process. *Eur Cytokine Netw*, 15, 126-34.
- MENGES, M., ROSSNER, S., VOIGTLANDER, C., SCHINDLER, H., KUKUTSCH, N. A., BOGDAN, C., ERB, K., SCHULER, G. & LUTZ, M. B. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*, 195, 15-21.
- MERAD, M., GINHOUX, F. & COLLIN, M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 8, 935-47.
- MERAD, M. & MANZ, M. G. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113, 3418-27.
- MERAD, M., MANZ, M. G., KARSUNKY, H., WAGERS, A., PETERS, W., CHARO, I., WEISSMAN, I. L., CYSTER, J. G. & ENGLEMAN, E. G. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*, 3, 1135-41.
- MIYAHARA, Y., ODUNSI, K., CHEN, W., PENG, G., MATSUZAKI, J. & WANG, R. F. 2008. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15505-10.
- MOMMAAS, A. M., MULDER, A. A., OUT, C. J., GIROLOMONI, G., KOERTEN, H. K., VERMEER, B. J. & KONING, F. 1995. Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ. *Eur J Immunol*, 25, 520-5.
- MOORE, K. W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L. & O'GARRA, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765.
- MOOTOO, A., STYLIANOU, E., ARIAS, M. A. & RELJIC, R. 2009. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8, 53-62.
- MORELLI, A. E., RUBIN, J. P., ERDOS, G., TKACHEVA, O. A., MATHERS, A. R., ZAHORCHAK, A. F., THOMSON, A. W., FALO, L. D., JR. & LARREGINA, A. T. 2005. CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. *J Immunol*, 175, 7905-15.
- MORELLI, A. E. & THOMSON, A. W. 2003. Dendritic cells under the spell of prostaglandins. *Trends Immunol*, 24, 108-11.

- MURANSKI, P., BONI, A., ANTONY, P. A., CASSARD, L., IRVINE, K. R., KAISER, A., PAULOS, C. M., PALMER, D. C., TOULOUKIAN, C. E., PTAK, K., GATTINONI, L., WRZESINSKI, C., HINRICH, C. S., KERSTANN, K. W., FEIGENBAUM, L., CHAN, C. C. & RESTIFO, N. P. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*, 112, 362-73.
- NAPOLITANI, G., RINALDI, A., BERTONI, F., SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*, 6, 769-76.
- NELSON, B. H. & WILLERFORD, D. M. 1998. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol*, 70, 1-81.
- NESTLE, F. O., ZHENG, X. G., THOMPSON, C. B., TURKA, L. A. & NICKOLOFF, B. J. 1993. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol*, 151, 6535-45.
- O'GARRA, A. & ROBINSON, D. 2004. Development and function of T helper 1 cells. *Adv Immunol*, 83, 133-62.
- OHL, L., MOHAUPT, M., CZELOTH, N., HINTZEN, G., KIAFARD, Z., ZWIRNER, J., BLANKENSTEIN, T., HENNING, G. & FORSTER, R. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21, 279-88.
- OUWEHAND, K., SANTEGOETS, S. J., BRUYNZEEL, D. P., SCHEPER, R. J., DE GRUIJL, T. D. & GIBBS, S. 2008. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur J Immunol*, 38, 3050-9.
- OZAWA, H., DING, W., TORII, H., HOSOI, J., SEIFFERT, K., CAMPTON, K., HACKETT, N. R., TOPF, N., CRYSTAL, R. G. & GRANSTEIN, R. D. 1999. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer to dendritic cells or epidermal cells augments their antigen-presenting function including induction of anti-tumor immunity. *J Invest Dermatol*, 113, 999-1005.
- PAJTASZ-PIASECKA, E., ROSSOWSKA, J., DUS, D., WEBER-DABROWSKA, B., ZABLOCKA, A. & GORSKI, A. 2008. Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC-based vaccine against murine transplantable colon carcinoma. *Immunol Lett*, 116, 24-32.
- PALUCKA, K. & BANCHEREAU, J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*, 12, 265-77.
- PANZER, S., MADDEN, M. & MATSUKI, K. 1993. Interaction of IL-1 beta, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human T cells activated by murine antigens. *Clin Exp Immunol*, 93, 471-8.
- PEGUET-NAVARRO, J., DALBIEZ-GAUTHIER, C., RATTIS, F. M., VAN KOOTEN, C., BANCHEREAU, J. & SCHMITT, D. 1995. Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol*, 155, 4241-7.
- PEISER, M., WANNER, R. & KOLDE, G. 2004. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J Leukoc Biol*, 76, 616-22.

- PERONA-WRIGHT, G., JENKINS, S. J., O'CONNOR, R. A., ZIENKIEWICZ, D., MCSORLEY, H. J., MAIZELS, R. M., ANDERTON, S. M. & MACDONALD, A. S. 2009. A pivotal role for CD40-mediated IL-6 production by dendritic cells during IL-17 induction in vivo. *J Immunol*, 182, 2808-15.
- PFLANZ, S., TIMANS, J. C., CHEUNG, J., ROSALES, R., KANZLER, H., GILBERT, J., HIBBERT, L., CHURAKOVA, T., TRAVIS, M., VAISBERG, E., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J. D., WAGNER, J. L., TO, W., ZURAWSKI, S., MCCLANAHAN, T. K., GORMAN, D. M., BAZAN, J. F., DE WAAL MALEFYT, R., RENNICK, D. & KASTELEIN, R. A. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*, 16, 779-90.
- PIERRE, P., TURLEY, S. J., MELTZER, J., MIRZA, A., STEINMAN, R. & MELLMAN, I. 1997. Localization and intracellular transport of MHC class II molecules in bone marrow-derived dendritic cells. *Adv Exp Med Biol*, 417, 179-82.
- POULIN, L. F., HENRI, S., DE BOVIS, B., DEVILARD, E., KISSENPFFENNIG, A. & MALISSEN, B. 2007. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 204, 3119-31.
- PYPE, S., DECLERCQ, W., IBRAHIMI, A., MICHIELS, C., VAN RIETSCHOTEN, J. G., DEWULF, N., DE BOER, M., VANDENABEELE, P., HUYLEBROECK, D. & REMACLE, J. E. 2000. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*, 275, 18586-93.
- RANDOLPH, G. J., ANGELI, V. & SWARTZ, M. A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*, 5, 617-28.
- RATZINGER, G., BAGGERS, J., DE COS, M. A., YUAN, J., DAO, T., REAGAN, J. L., MUNZ, C., HELLER, G. & YOUNG, J. W. 2004. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 173, 2780-91.
- RE, F. & STROMINGER, J. L. 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 173, 7548-55.
- REAMS, W. M., JR. & TOMPKINS, S. P. 1973. A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. *Dev Biol*, 31, 114-23.
- RENN, C. N., SANCHEZ, D. J., OCHOA, M. T., LEGASPI, A. J., OH, C. K., LIU, P. T., KRUTZIK, S. R., SIELING, P. A., CHENG, G. & MODLIN, R. L. 2006. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol*, 177, 298-305.
- RESCIGNO, M., MARTINO, M., SUTHERLAND, C. L., GOLD, M. R. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*, 188, 2175-80.
- ROMANI, N., CLAUSEN, B. E. & STOITZNER, P. 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev*, 234, 120-41.

- ROMANI, N., HOLZMANN, S., TRIPP, C. H., KOCH, F. & STOITZNER, P. 2003. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS*, 111, 725-40.
- ROMANI, N., KOIDE, S., CROWLEY, M., WITMER-PACK, M., LIVINGSTONE, A. M., FATHMAN, C. G., INABA, K. & STEINMAN, R. M. 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 169, 1169-78.
- ROMANO, E., ROSSI, M., RATZINGER, G., DE COS, M. A., CHUNG, D. J., PANAGEAS, K. S., WOLCHOK, J. D., HOUGHTON, A. N., CHAPMAN, P. B., HELLER, G., YUAN, J. & YOUNG, J. W. 2011. Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL15 secretion and T-cell activation in vitro, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells in vivo. *Clin Cancer Res*, 17, 1984-97.
- ROZIS, G., BENLAHRECH, A., DURAISINGHAM, S., GOTCH, F. & PATTERSON, S. 2008. Human Langerhans' cells and dermal-type dendritic cells generated from CD34 stem cells express different toll-like receptors and secrete different cytokines in response to toll-like receptor ligands. *Immunology*, 124, 329-38.
- SABADO, R. L. & BHARDWAJ, N. 2010. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*, 2, 37-56.
- SANSOM, D. M., MANZOTTI, C. N. & ZHENG, Y. 2003. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*, 24, 314-9.
- SATO, K. & FUJITA, S. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*, 56, 183-91.
- SCANDELLA, E., MEN, Y., GILLESSEN, S., FORSTER, R. & GROETTRUP, M. 2002. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 100, 1354-61.
- SCHULER, G. & STEINMAN, R. M. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*, 161, 526-46.
- SCHULZ, O., EDWARDS, A. D., SCHITO, M., ALIBERTI, J., MANICKASINGHAM, S., SHER, A. & REIS E SOUSA, C. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity*, 13, 453-62.
- SCHUSTER, C., VACULIK, C., FIALA, C., MEINDL, S., BRANDT, O., IMHOF, M., STINGL, G., EPPEL, W. & ELBE-BURGER, A. 2009. HLA-DR+ leukocytes acquire CD1 antigens in embryonic and fetal human skin and contain functional antigen-presenting cells. *J Exp Med*, 206, 169-81.
- SCHUSTER, N. & KRIEGLSTEIN, K. 2002. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res*, 307, 1-14.
- SEIJI, M., FITZPATRICK, T. B. & BIRBECK, M. S. 1961. The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol*, 36, 243-52.
- SENESCHAL, J., CLARK, R. A., GEHAD, A., BAECHER-ALLAN, C. M. & KUPPER, T. S. 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity*, 36, 873-84.
- SERE, K., BAEK, J. H., OBER-BLOBAUM, J., MULLER-NEWEN, G., TACKE, F., YOKOTA, Y., ZENKE, M. & HIERONYMUS, T. 2012. Two distinct types of

- Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. *Immunity*, 37, 905-16.
- SFANOS, K. S., BRUNO, T. C., MARIS, C. H., XU, L., THOBURN, C. J., DEMARZO, A. M., MEEKER, A. K., ISAACS, W. B. & DRAKE, C. G. 2008. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*, 14, 3254-61.
- SHIBAKI, A. & KATZ, S. I. 2001. Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells. *Eur J Immunol*, 31, 3006-15.
- SILBERBERG, I., BAER, R. L. & ROSENTHAL, S. A. 1976. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol*, 66, 210-7.
- SIMON, T., FONTENEAU, J. F. & GREGOIRE, M. 2009. Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions. *Immunotherapy*, 1, 289-302.
- SIN, J. I., HONG, S. H., PARK, Y. J., PARK, J. B., CHOI, Y. S. & KIM, M. S. 2006. Antitumor therapeutic effects of e7 subunit and DNA vaccines in an animal cervical cancer model: antitumor efficacy of e7 therapeutic vaccines is dependent on tumor sizes, vaccine doses, and vaccine delivery routes. *DNA Cell Biol*, 25, 277-86.
- SMITH, K. A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240, 1169-76.
- STEINMAN, R. M. 2008. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 29, 319-24.
- STINGL, G., KATZ, S. I., CLEMENT, L., GREEN, I. & SHEVACH, E. M. 1978. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol*, 121, 2005-13.
- STINGL, G., TAMAKI, K. & KATZ, S. I. 1980. Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunol Rev*, 53, 149-74.
- STOITZNER, P., TRIPP, C. H., DOUILLARD, P., SAELAND, S. & ROMANI, N. 2005. Migratory Langerhans cells in mouse lymph nodes in steady state and inflammation. *J Invest Dermatol*, 125, 116-25.
- STOITZNER, P., TRIPP, C. H., EBERHART, A., PRICE, K. M., JUNG, J. Y., BURSCH, L., RONCHESE, F. & ROMANI, N. 2006. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7783-8.
- STREILEIN, J. W., LONSBERRY, L. W. & BERGSTRESSER, P. R. 1982. Depletion of epidermal langerhans cells and Ia immunogenicity from tape-stripped mouse skin. *J Exp Med*, 155, 863-71.
- STRITESKY, G. L., YEH, N. & KAPLAN, M. H. 2008. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol*, 181, 5948-55.
- SUGAYA, M., LORE, K., KOUP, R. A., DOUEK, D. C. & BLAUVELT, A. 2004. HIV-infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4+ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. *J Immunol*, 172, 2219-24.
- SUNG, J. L., LIN, J. T. & GORHAM, J. D. 2003. CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor-beta1 on the proliferation of naive CD4+ T cells. *Int Immunopharmacol*, 3, 233-45.
- SUZUKI, H., WANG, B., SHIVJI, G. M., TOTO, P., AMERIO, P., TOMAI, M. A., MILLER, R. L. & SAUDER, D. N. 2000. Imiquimod, a topical immune

- response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol*, 114, 135-41.
- TAKEDA, A., HAMANO, S., YAMANAKA, A., HANADA, T., ISHIBASHI, T., MAK, T. W., YOSHIMURA, A. & YOSHIDA, H. 2003. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol*, 170, 4886-90.
- TAKEUCHI, J., WATARI, E., SHINYA, E., NOROSE, Y., MATSUMOTO, M., SEYA, T., SUGITA, M., KAWANA, S. & TAKAHASHI, H. 2003. Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 674-9.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-20.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K. & AKIRA, S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*, 165, 5392-6.
- TAYLOR, P. R., BROWN, G. D., REID, D. M., WILLMENT, J. A., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S. & WONG, S. Y. 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol*, 169, 3876-82.
- TCHOU, I., SABIDO, O., LAMBERT, C., MISERY, L., GARRAUD, O. & GENIN, C. 2003. Technique for obtaining highly enriched, quiescent immature Langerhans cells suitable for ex vivo assays. *Immunol Lett*, 86, 7-14.
- TRAKATELLI, M., TOUNGOUZ, M., BLOCKLET, D., DODOO, Y., GORDOWER, L., LAPORTE, M., VERECKEN, P., SALES, F., MORTIER, L., MAZOUZ, N., LAMBERMONT, M., GOLDMAN, S., COULIE, P., GOLDMAN, M. & VELU, T. 2006. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*, 55, 469-74.
- TRIFARI, S., KAPLAN, C. D., TRAN, E. H., CRELLIN, N. K. & SPITS, H. 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, 10, 864-71.
- TZE, L. E., HORIKAWA, K., DOMASCHENZ, H., HOWARD, D. R., ROOTS, C. M., RIGBY, R. J., WAY, D. A., OHMURA-HOSHINO, M., ISHIDO, S., ANDONIOU, C. E., DEGLI-ESPOSTI, M. A. & GOODNOW, C. C. 2011. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med*, 208, 149-65.
- VALLADEAU, J., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. & SAELAND, S. 2003. Langerin/CD207 sheds light on formation of Birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol Res*, 28, 93-107.
- VALLADEAU, J., DUVERT-FRANCES, V., PIN, J. J., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., VINCENT, C., MASSACRIER, C., VINCENT, J., YONEDA, K., BANCHEREAU, J., CAUX, C., DAVOUST, J. & SAELAND, S. 1999. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol*, 29, 2695-704.

- VALLADEAU, J., RAVEL, O., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., MOORE, K., KLEIJMEER, M., LIU, Y., DUVERT-FRANCES, V., VINCENT, C., SCHMITT, D., DAVOUST, J., CAUX, C., LEBECQUE, S. & SAELAND, S. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 12, 71-81.
- VAN BERGENHENEGOUWEN, J., PLANTINGA, T. S., JOOSTEN, L. A., NETEA, M. G., FOLKERTS, G., KRANEVELD, A. D., GARSSSEN, J. & VOS, A. P. 2013. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. *J Leukoc Biol*, 94, 885-902.
- VAN DER AAR, A. M., SYLVA-STEENLAND, R. M., BOS, J. D., KAPSENBERG, M. L., DE JONG, E. C. & TEUNISSEN, M. B. 2007. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol*, 178, 1986-90.
- VAN DER VLIST, M., DE WITTE, L., DE VRIES, R. D., LITJENS, M., DE JONG, M. A., FLUITSMA, D., DE SWART, R. L. & GEIJTENBEEK, T. B. 2011. Human Langerhans cells capture measles virus through Langerin and present viral antigens to CD4(+) T cells but are incapable of cross-presentation. *Eur J Immunol*, 41, 2619-31.
- VAN KOOTEN, C. & BANCHEREAU, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67, 2-17.
- VERDIJK, R. M., MUTIS, T., ESENDAM, B., KAMP, J., MELIEF, C. J., BRAND, A. & GOULMY, E. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol*, 163, 57-61.
- VILLABLANCA, E. J. & MORA, J. R. 2008. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol*, 38, 2975-80.
- VILLABLANCA, E. J., RUSSO, V. & MORA, J. R. 2008. Dendritic cell migration and lymphocyte homing imprinting. *Histol Histopathol*, 23, 897-910.
- VOGT, A., MAHE, B., COSTAGLIOLA, D., BONDUELLE, O., HADAM, S., SCHAEFER, G., SCHAEFER, H., KATLAMA, C., STERRY, W., AUTRAN, B., BLUME-PEYTAVI, U. & COMBADIÈRE, B. 2008. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol*, 180, 1482-9.
- VOLC-PLATZER, B., STINGL, G., WOLFF, K., HINTERBERG, W. & SCHNEIDL, W. 1984. Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient. *N Engl J Med*, 310, 1123-4.
- WALSING, E., FURUTA, K., GOLDSZMID, R. S., WEIH, K. A., SHER, A. & ROCHE, P. A. 2010. Dendritic cell activation prevents MHC class II ubiquitination and promotes MHC class II survival regardless of the activation stimulus. *J Biol Chem*, 285, 41749-54.
- WANG, Y., HUANG, G., VOGEL, P., NEALE, G., REIZIS, B. & CHI, H. 2012. Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1)-dependent checkpoint in the survival of dendritic cells promotes immune homeostasis and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- WEBB, D. C., CAI, Y., MATTHAEI, K. I. & FOSTER, P. S. 2007. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 cell function. *J Immunol*, 178, 219-27.

- WILSON, N. S. & VILLADANGOS, J. A. 2004. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol*, 82, 91-8.
- WINZLER, C., ROVERE, P., RESCIGNO, M., GRANUCCI, F., PENNA, G., ADORINI, L., ZIMMERMANN, V. S., DAVOUST, J. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*, 185, 317-28.
- YAMASHITA, M., FATYOL, K., JIN, C., WANG, X., LIU, Z. & ZHANG, Y. E. 2008. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell*, 31, 918-24.
- YANG, J., BERNIER, S. M., ICHIM, T. E., LI, M., XIA, X., ZHOU, D., HUANG, X., STREJAN, G. H., WHITE, D. J., ZHONG, R. & MIN, W. P. 2003. LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. *J Leukoc Biol*, 74, 438-47.
- YOSHIMURA, T., TAKEDA, A., HAMANO, S., MIYAZAKI, Y., KINJYO, I., ISHIBASHI, T., YOSHIMURA, A. & YOSHIDA, H. 2006. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol*, 177, 5377-85.
- ZGANIACZ, A., SANTOSUOSSO, M., WANG, J., YANG, T., CHEN, L., ANZULOVIC, M., ALEXANDER, S., GICQUEL, B., WAN, Y., BRAMSON, J., INMAN, M. & XING, Z. 2004. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest*, 113, 401-13.
- ZHANG, B., RONG, G., WEI, H., ZHANG, M., BI, J., MA, L., XUE, X., WEI, G., LIU, X. & FANG, G. 2008. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 374, 533-7.
- ZHENG, Y., VALDEZ, P. A., DANILENKO, D. M., HU, Y., SA, S. M., GONG, Q., ABBAS, A. R., MODRUSAN, Z., GHILARDI, N., DE SAUVAGE, F. J. & OUYANG, W. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*, 14, 282-9.

8. PRILOZI

Rezultati prikazani u disertaciji su objavljeni u sledećim radovima:

1. **Ivan Rajković**, Ana Dragičević, Saša Vasilijić, Biljana Božić, Tanja Džopalić, Sergej Tomić, Ivana Majstorović, Dragana Vučević, Jelena Đokić, Bela Balint, Miodrag Čolić. Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells. *Immunology* 2011; 132(2): 217-25.
2. Tanja Džopalić, **Ivan Rajković**, Ana Dragičević, Miodrag Čolić. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunology Res.* 2012; 52(1-2): 20-33.

Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells

Ivan Rajkovic,¹ Ana Dragcevic,¹
Sasa Vasilijic,¹ Biljana Bozic,^{1,2}
Tanja Dzopalic,^{1,3} Sergej Tomic,¹
Ivana Majstorovic,¹ Dragana
Vucevic,¹ Jelena Djokic,¹ Bela
Balint^{1,4} and Miodrag Colic^{1,3}

¹Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, ²Institute for Physiology and Biochemistry, University of Belgrade, ³Medical Faculty Nis, University of Nis, Nis, and ⁴The Transfusiology Institute, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03366.x

Received 18 May 2010; revised 17 August 2010; accepted 18 August 2010.

Correspondence: Professor M. Colic, MD, PhD, Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Omlotrska 17, 11002 Belgrade, Serbia. Email: vmairni@sunet.rs
Senior author: Miodrag Colic

Summary

Langerhans' cells (LCs) represent a specific subset of dendritic cells (DCs) which are important for detecting and processing pathogens that penetrate the skin and epithelial barriers. The aim of our study was to explain what makes their *in vitro* counterparts – monocyte-derived Langerhans'-like cells (MoLCs) – unique compared with monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). Immature MoDCs were generated by incubating peripheral blood monocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4. The addition of transforming growth factor- β (TGF- β) to this cytokine cocktail resulted in the generation of MoLCs. MoLCs showed a lower expression of CD83, CD86, HLA-DR and CCR7 compared with MoDCs, regardless of their maturational status. Both immature and mature MoLCs secreted higher quantities of IL-23 compared with MoDCs and this finding correlated with a higher secretion of IL-17 in co-culture of MoLCs with allogeneic CD4⁺ T cells. Mature MoLCs, which produced higher levels of IL-12 and lower levels of IL-10 compared with mature MoDCs, were more potent at inducing interferon- γ (IFN- γ) production by CD4⁺ T cells in the co-culture system. In conclusion, the finding that mature MoLCs stimulate stronger T-helper 1 and T-helper 17 immune responses than mature MoDCs, makes them better candidates for use in the preparation of anti-tumour DC vaccines.

Keywords: cytokine production; monocyte-derived dendritic cells; monocyte-derived Langerhans-like cells; phenotypization; T-helper cell polarization

Introduction

Dendritic cells (DCs) are members of a leucocyte population that is highly specialized in all phases of processing an antigen, including its uptake, transportation and presentation to target cells. DCs can be separated into different subpopulations, depending on their tissue locations, pathways of migration and mechanisms of dealing with the antigen challenge.¹ Generally, DCs can be migratory or resident, and localized in lymphoid (thymus, spleen, lymph nodes and mucosa-associated lymphoid tissues) and non-lymphoid (in sterile organs such as the pancreas, heart, liver and kidney or in those connected with the environment, i.e. the skin, gut, lung or urinary tract) tissues.² Regardless of where they are located, the principal

functions of DCs are to maintain self-tolerance or to initiate specific immune responses to particular antigens.³

Langerhans' cells (LCs) are a specific subset of DCs that are considered important for detecting and processing pathogens that penetrate epithelial barriers. While in an immature state, they are resident in the epidermal layer of the skin or in the other stratified epithelia that line the cavities of the respiratory, gastrointestinal and urogenital systems.⁴ Immature LCs express high levels of: (i) Langerin (CD207), a type II lectin receptor with a pattern-recognition role, (ii) Birbeck granules, unorthodox organelles that might have a role in the alternative antigen-presenting pathway, (iii) CD1a, a family of molecules that are able to present microbial lipid antigens to T cells and (iv) E-cadherin, an adhesion molecule.^{2,4,5} When stimulated

I. Rajković *et al.*

by danger signals, LCs start to undergo a functional maturation and migrate through the afferent lymphatic vessels towards the nearby lymph nodes, which are capable of priming T cells.^{5–7} These migratory LCs up-regulate major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, costimulatory molecules (i.e. CD40 and CD86) and CC-chemokine receptor 7 (CCR-7), while at the same time down-regulate Langerin and E-cadherin.^{4,6,7} Recently, it was shown that the maturation and migration of LCs could also be independently initiated,^{8,9} and thus the third stage in their developmental cycle was introduced. LCs that are phenotypically semimature serve to promote peripheral tolerance in the lymph node either by inducing anergy and apoptosis of specific CD4⁺ T-cell clones, or by promoting differentiation of naïve CD4⁺ T cells into T-regulatory cells.^{10,11}

In the dermal layer of the skin, as well as in the connective tissues located beneath stratified epithelia, there is another, phenotypically heterogeneous population of DCs, identified as interstitial/dermal DCs (IDDCs). This population consists of three different subsets, categorized according to their expression of CD1a and CD14 molecules: (i) CD14⁺ CD1a⁻, (ii) CD14⁻ CD1a⁻ and (iii) CD14⁻ CD1a⁺.¹² It is believed that the CD14⁺ subset represents a population of dermal macrophages or a group of precursors for other antigen-presenting cells (APCs) in the skin,¹³ while the CD1a⁺ subset represents a dermal DC population, distinct from LCs.¹⁴ CD1a⁺ cells showed the capacity to migrate and prime T cells in the lymph node, while CD14⁺ cells did not have such ability.¹⁵ IDDCs express a C-type lectin receptor called DC-SIGN (CD209), which is different from that expressed by LCs.¹⁶ Only a small percentage of dermal CD14⁺ cells, which could serve as precursors for LCs, are Langerin-positive.¹³ Although LCs and IDDCs have already been phenotypically well distinguished, their function, as well as their cross-talk have not been completely clarified.¹⁷

The exact precursors of different DC populations have not yet been confirmed. It has been established that they mostly originate from bone marrow but differentiate in peripheral locations under specific conditions.¹⁸ The experiments performed by Qu *et al.*,¹⁹ which improved the initial concept of Randolph *et al.*,²⁰ have demonstrated the differentiation of skin DCs from mouse Gr-1⁺ monocytes *in vivo*. Geissmann *et al.*²¹ found a functional correlation between the Gr-1⁺ subpopulation and human CD14⁺ monocytes. Therefore, it was presumed that human DCs generated from peripheral blood monocytes (MoDCs) *in vitro*, in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4,⁵ resemble those produced *in vivo*. This system can also be used to generate Langerhans'-like DCs (MoLCs), in the presence of transforming growth factor- β (TGF- β).²²

The maturation and migration of DCs can be induced by various inflammatory stimuli. Tumour necrosis factor-

α (TNF- α), IL-1 β and IL-6 are capable of promoting the maturation of MoDCs that is not dependent on Toll-like receptor (TLR) stimulation,²³ while the addition of prostaglandin E₂ (PGE₂) further enhances their migratory and functional characteristics.²⁴ MoDCs cultured in the presence of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂ induced T helper 1 (Th1) polarization of CD4⁺ T cells.²⁴ The effects of this well-known combination of proinflammatory cytokines on MoLCs have not yet been explored. Taking into account that data analyzing the effect of MoLCs on CD4⁺ T-helper polarizing capabilities are also scarce, the aim of our study was to explain what makes MoLCs unique compared with MoDCs, before and after treatment with the cocktail of proinflammatory cytokines and mediators.

Materials and methods

Medium and reagents

The culture medium was RPMI-1640 (ICN, Costa Mesa, CA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 20 μ g/ml of gentamicin, 50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME) and 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS). Recombinant human IL-4 was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Recombinant human GM-CSF (Leucomax, specific activity 4.44 \times 10⁶ UI) was obtained from Schering-Plough (Basel, Switzerland). Recombinant human TGF- β 1 (Chinese hamster ovary-cell derived) was from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Cell preparation and MoDC/MoLC cultures

MoDCs and MoLCs were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Briefly, PBMCs from buffy coats of healthy volunteers were isolated by density centrifugation on Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway), resuspended in 5 ml of RPMI-1640 containing 10% FCS and 50 μ M of 2-ME and allowed to adhere to plastic in flasks. After incubation for 1.5 hr at 37°, non-adherent cells were removed. To obtain MoDCs, adherent cells were cultured in 5 ml of control medium (RPMI-1640) containing GM-CSF (100 ng/ml) and IL-4 (20 ng/ml). The addition of TGF- β 1 (5 ng/ml) to this cytokine cocktail resulted in the generation of MoLCs.²² After 6 days, MoDCs were replated in medium (RPMI-1640) containing GM-CSF + IL-4 or GM-CSF + IL-4 + cocktail of proinflammatory cytokines, and MoLCs were replated in medium containing GM-CSF + IL-4 + TGF- β 1 or GM-CSF + IL-4 + TGF- β 1 + cocktail of proinflammatory cytokines; 1 \times 10⁶ MoDCs or 1 \times 10⁶ MoLCs were added to each ml of the respective medium, and incubation was carried out for a further 2 days. The cocktail of proinflammatory cytokines consisted of TNF- α , IL-1 β , IL-6 (10 ng/ml of each; R&D Systems) and PGE₂ (1 μ g/ml;

Monocyte-derived dendritic cell subsets

Sigma, Munich, Germany). After 8 days, cell-free supernatants were collected and stored at -20° for the subsequent determination of cytokine levels.

Immunophenotyping of MoDCs/MoLCs

Control and treated MoDCs and MoLCs (1×10^5 cells/sample tube) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2% FCS and 0.1% sodium azide (NaN_3), and incubated for 45 min at 4° with one of the following monoclonal antibodies (mAbs) which was conjugated to either phycoerythrin (PE) or fluorescein isothiocyanate (FITC): HLA-DR-PE, CD1a-PE, CD14-FITC, CD83-FITC, CD86-PE, (Serotec, Oxford, UK), CD54-PE (Serotec) and CCR7-FITC (R&D Systems). Controls consisted of samples with irrelevant (Ir) mouse mAbs, conjugated to PE or FITC (Serotec), and which were reactive with rat antigens and non-reactive with human antigens. Cell fluorescence was analyzed using an EPICS XL-MCL flow cytometer (Coulter, Krefeld, Germany). At least 5000 cells per sample were analyzed.

Immunocytochemistry of MoDCs/MoLCs

Immature cells of both DC subsets were adhered to glass slides covered with poly-L-lysine (2×10^4 cells/slide) using a Shandon Cytospin Centrifuge (Thermo Scientific, Breda, the Netherlands). Cytospin preparations were fixed with 2% pararosaniline in PBS and incubated for 30 min with anti-(human Langerin/CD207) (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, goat IgG; R&D Systems). This was followed by a 15-min incubation with a biotinylated link antibody in the presence of 5% normal human serum and then by a 15-min incubation with alkaline phosphatase-labelled streptavidin (LSAB+ System; AP; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). After each step of the staining procedure, the slides were thoroughly washed with Tris-buffered saline (TBS). Staining was complete after a 10-min incubation with the substrate-chromogen solution, and the cytospin preparations were analyzed using light microscopy. Slides in which the primary antibody was omitted served as the negative control. At least 500 cells were analyzed on each cytospin preparation and the percentage of positive cells was determined.

Allogeneic T-cell activation

The ability of T cells to proliferate was tested in an allogeneic mixed leucocyte reaction (MLR). CD4^+ T cells were used as responders in the MLR, after their isolation from PBMCs using immunomagnetic sorting with a CD4^+ isolation kit (MACS technology; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) following the manufacturer's instructions. After loading the cell suspension onto a column placed in the magnetic field of a MACS Separator, unlabelled cells run through and this cell frac-

tion consists mainly of CD4^+ T cells. The purity of T cells recovered in the negative fraction was 90.8%, as verified by staining with anti-CD3-PE and anti-CD4-FITC followed by flow cytometry analysis. Purified CD4^+ T cells (1×10^5 cells/well) were cultured with different numbers of allogeneic MoDCs in complete RPMI-1640 containing 10% FCS, in 96-well round-bottomed cell-culture plates. Different ratios of DC cells : T cells were used. After 5 days of culture, cell proliferation was assessed by pulsing the cells with [^3H]thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$; Amersham, Bucks., UK) for the last 18 hr of culture. Labelled cells were harvested onto glass fibre filters and the incorporation of the radionuclide into the DNA was measured using β -scintillation counting (LKB-1219 Rackbeta; Wallac, Turku, Finland). The results were expressed as counts per minute (c.p.m.) \pm standard deviation (SD) of triplicate samples.

Cytokine assays

Cells were stimulated, after 8 days of culture, with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for 16 hr to stimulate the production of the synthesized cytokines. Cells were harvested and centrifuged, and the cell-free supernatants were collected and stored at -20 for the subsequent determination of cytokine levels. The levels of IL-12, IL-23, IL-27, IL-6 and TGF- β 1 were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) from R&D Systems, following the manufacturer's instructions, in the cell-free supernatants of control or treated MoDCs. TNF- α was determined using an ELISA kit purchased from Bender MedSystems (Vienna, Austria). The levels of T-helper cytokines were evaluated using a FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex kit from Bender MedSystems.

Statistical analysis

The significance between the means of experimental data was determined using the Student's unpaired *t*-test. Their differences were considered statistically significant if the *P* value was below 0.05.

Results**Phenotypic characteristics of MoDCs and MoLCs**

MoDCs were generated from peripheral blood monocytes after incubation of the cells with GM-CSF and IL-4. The addition of TGF- β to this cytokine cocktail resulted in the generation of MoLCs. The phenotypic characteristics of these DC subsets were determined after 6 days of culture.

Both MoDCs and MoLCs displayed phenotypic characteristics of immature DCs, as judged by the low expres-

I. Rajkovic *et al.*

sion of CD86, CCR7 (Fig. 1) and CD83 (data not shown). While the expression of CD14 was almost completely down-regulated in both subsets, almost all MoLCs, but only about half of the MoDCs, expressed CD1a. Immature (i)MoLCs differed from iMoDCs by having higher forward scatter (FS) parameters and significantly lower expression of HLA-DR, CD-54 and CCR7 (Fig. 1). In addition, the percentage of Langerin+ cells within iMoLCs (70%) was significantly higher than the percentage of Langerin+ cells within iMoDCs (5%) (Fig. 2).

The iDCs of both lineages were induced to mature by incubation with a standard cocktail of proinflammatory mediators. This resulted in the up-regulation of HLA-DR, CD83, CD86 and CCR7 and a slight decrease in the FS profiles (Fig. 1). Mature (m)MoLCs showed lower expression of HLA-DR and CCR7 compared with mMoDCs, whereas no significant differences in the expression of CD83 and CD86 were seen. The levels of non-specific (background) fluorescence for both immature and mature MoDCs and MoLCs, determined using irrelevant mAbs conjugated to PE and FITC, did not exceed 2%.

Production of cytokines by MoDCs and MoLCs in culture

The levels of cytokines were determined in the cell-free supernatants of both iDCs and mDCs (Fig. 3).

iMoLCs produced significantly lower levels of IL-12 and TNF- α , and significantly higher levels of IL-23, than iMoDCs. The differences in secretion of IL-6, IL-10 and IL-27 between these DC subsets were not statistically significant.

mMoLCs produced significantly higher quantities of IL-12 and IL-23 and lower quantities of IL-10 compared with mMoDCs, whereas the secretion of IL-27 was not statistically different between the two cell types.

Alloreactive stimulatory capability of MoDCs and MoLCs

The alloreactive stimulatory capability of MoDCs and MoLCs was tested using MLRs where allogeneic CD4⁺ T cells were responders. CD4⁺ T cells stimulated with iMo-

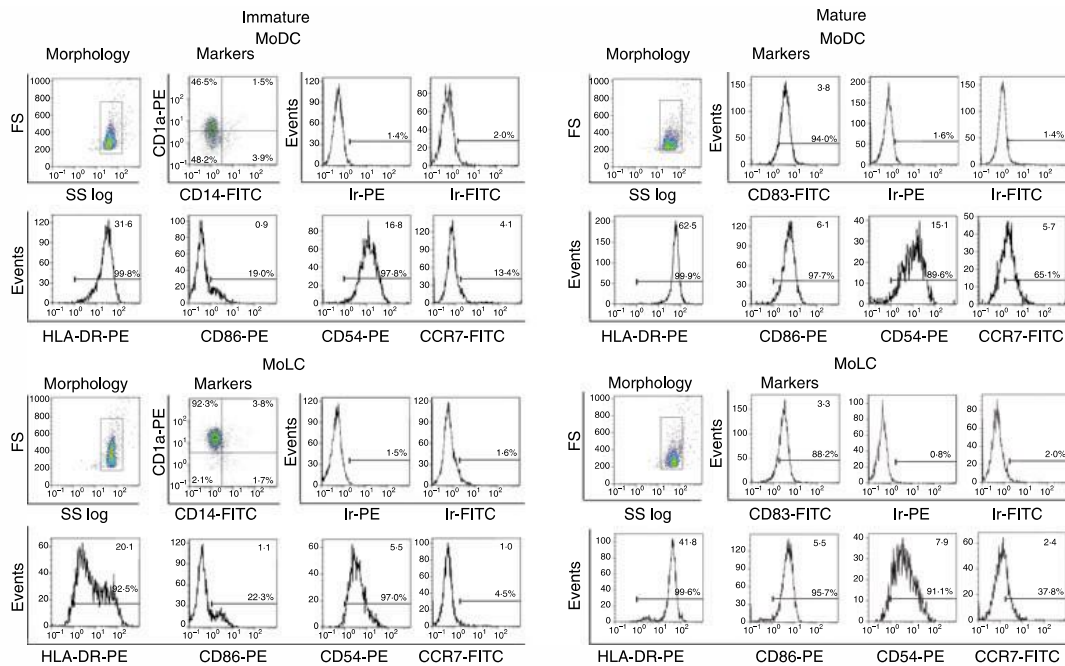


Figure 1. Phenotypic characterization of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) and monocyte-derived Langerhans' like cells (MoLCs), as determined by flow cytometry. MoDCs were generated from peripheral blood monocytes after incubation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). MoLCs were generated under the same conditions but with the addition of transforming growth factor- β (TGF- β) to the cytokine cocktail. Maturation of these DC subsets was induced with a cocktail of proinflammatory mediators, as described in the Materials and methods. The numbers in the upper right corners of single histograms represent mean values of fluorescence intensity within the gated populations [marked on forward scatter (FS) : side scatter (SS) log profiles]. The results are representative of one donor, out of five different experiments. Ir-PE and Ir-FITC represent non-specific (background) fluorescence using irrelevant (Ir) mouse monoclonal antibodies (mAbs) conjugated to the corresponding fluorochrome [i.e. phycoerythrin (PE) and fluorescein isothiocyanate (FITC)], which do not react with human cells.

Monocyte-derived dendritic cell subsets

LCs showed a higher proliferation capability than $CD4^+$ T cells stimulated with iMoDCs, at all DC/ $CD4^+$ T-cell ratios. All differences were statistically significant except at the highest (1:10) DC/ $CD4^+$ T-cell ratio (Fig. 4).

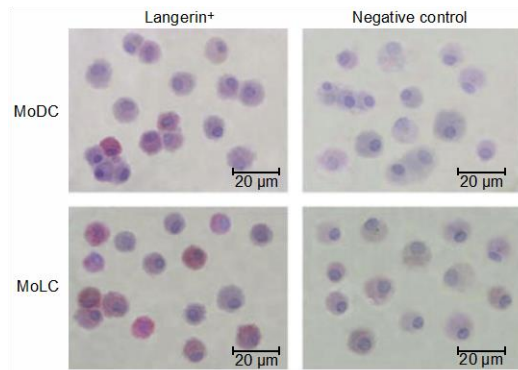


Figure 2. Phenotypic characterization of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) and monocyte-derived Langerhans' like cells (MoLCs), as determined by immunocytochemistry. Cytospin preparations of immature dendritic cell (iDC) samples were stained with anti-human Langerin IgG, as described in the Materials and methods. At least 500 cells were analyzed on each cytosin using a light microscope and the percentage of positive cells was determined. Original magnification, $\times 600$; the bar represents 20 μ m. The slides with the omitted primary antibody served as negative controls.

After maturation, the alloreactive stimulatory capability changed in favour of MoDCs. In contrast to iMoLCs, the alloreactive stimulatory capability of mMoLCs was lower than that of mMoDCs and the differences were statistically significant except at the highest (1:10) DC/ $CD4^+$ T-cell ratio (Fig. 4).

T-helper polarization capability of MoDCs and MoLCs

The ability of MoDCs and MoLCs to polarize T-helper immune responses was assayed on the basis of the levels of interferon- γ (IFN- γ), IL-17, IL-4, IL-13 and IL-10 in the supernatants of DC/ $CD4^+$ T-cell co-cultures (Fig. 5).

$CD4^+$ T cells in co-culture with iMoLCs produced significantly lower amounts of IFN- γ , IL-4, IL-13 and IL-10, but higher amounts of IL-17 and IL-2, compared to these cytokines in co-culture with iMoDCs.

In contrast, mMoLCs significantly up-regulated the production of IFN- γ , IL-2 and IL-17 by $CD4^+$ T cells compared with the levels produced by mMoDCs. It is interesting that the production of T-helper 2 (Th2) cytokines was different. The level of IL-4 in the mMoLC/ $CD4^+$ T-cell co-culture was higher than in the corresponding mMoDC/ $CD4^+$ T-cell co-culture. The opposite results were obtained for IL-13. In addition, higher quantities of TGF- β were detected in mMoLC/ $CD4^+$

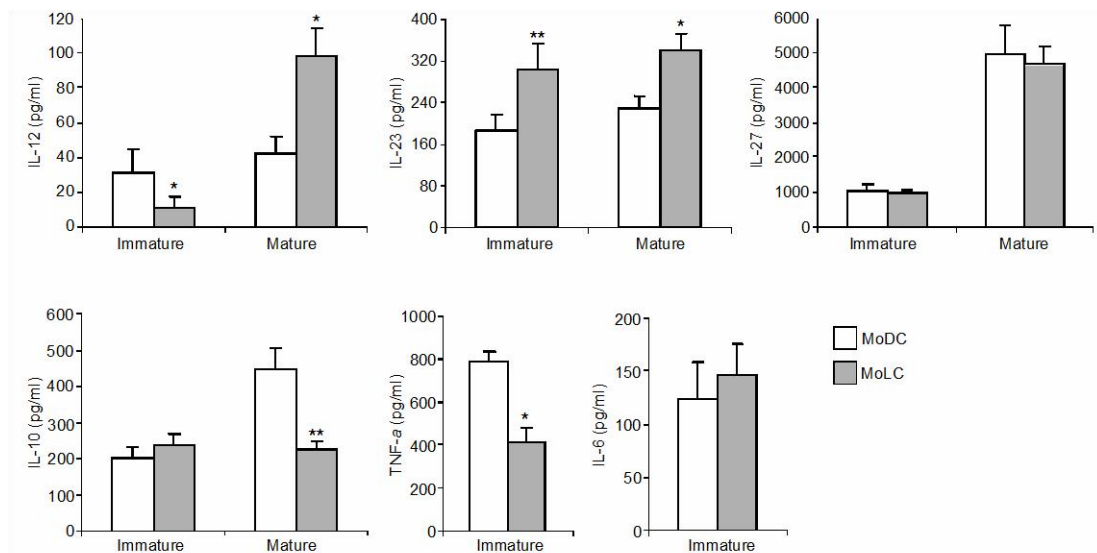


Figure 3. Production of cytokines in monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) and monocyte-derived Langerhans' like cells (MoLCs) culture supernatants. The supernatants of both immature and mature MoDCs and MoLCs were collected after 6 days of culture, and the concentrations of cytokines (in pg/ml) were determined using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Values are given as mean \pm standard deviation (SD) of three different experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with MoDCs. IL, interleukin; TNF- α , tumour necrosis factor- α .

I. Rajkovic et al.

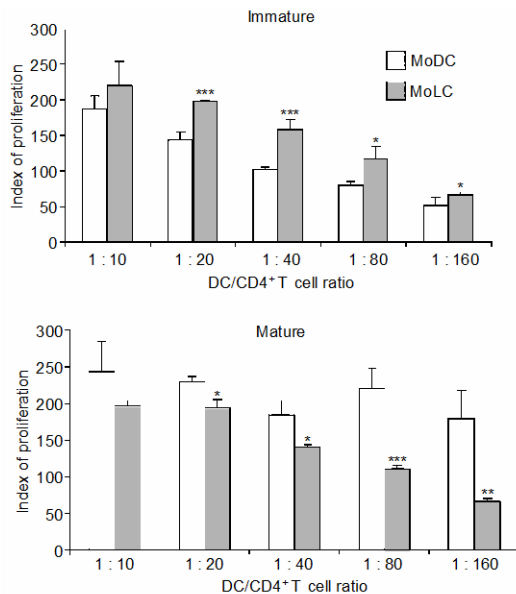


Figure 4. Allostimulatory activity of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) and monocyte-derived Langerhans' like cells (MoLCs). Immature and mature MoDCs and MoLCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T cells at different ratios. After 5 days, the cultures were pulsed with [³H]thymidine for the last 18 hr and the radioactivity was measured as described in the Materials and methods. Values are given as mean \pm standard deviation (SD) of triplicate samples from one representative experiment out of three different experiments showing similar results. The basal counts per minute (c.p.m.) in CD4⁺ T-cell cultures, alone, was 402 ± 53 c.p.m. The basal c.p.m. in DC cultures alone, independently of number and type of DCs, was between 62 and 102 c.p.m. (similar to the background radioactivity). The proliferation index (PI) was calculated as follows: $PI = \text{c.p.m. (DC/CD4}^+ \text{T-cell co-culture)} / [\text{c.p.m. (CD4}^+ \text{T-cell culture alone)} + \text{c.p.m. (DC culture alone)}]$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ compared with MoDCs.

T-cell co-cultures compared with mMoDC/CD4⁺ T-cell co-cultures.

Discussion

Blood monocytes may differentiate into various DC subsets, depending on the cytokine milieu. In our study, iMoDCs were generated by the treatment of monocytes with GM-CSF and IL-4, a well known DC differentiation cocktail.²⁵ The addition of TGF- β to this cocktail resulted in the generation of iMoLCs.²² As the differentiation potential and function of these cells are significantly influenced by the culture conditions and individual genetic variations, we generated these DC subsets from the same blood donors. It is believed that these DC subsets may represent *in vitro* counterparts of LCs and IDDCs, respec-

tively, whose functions are not well understood. Therefore, the main goal of our study was to define differences in the T-helper polarizing capability of these DC subsets before and after treatment with a DC differentiation cocktail of proinflammatory cytokines and mediators. The components of this cocktail, namely TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂, which are mostly secreted by local DCs and macrophages *in vivo* after activation of these cells with various danger signals, are the best-defined DC maturation stimuli.²⁴

According to the phenotypic analysis, iMoLCs were larger and more heterogenous in size, and expressed significantly higher levels of CD1a and Langerin, than iMoDCs. Such characteristics mirrored the differences between *ex vivo* isolated LCs and IDDCs.¹⁵ Lower expression of HLA-DR, CD54 and CCR7 on iMoLCs suggested that these cells were more immature than iMoDCs. The difference in the expression of HLA-DR corresponded well with data obtained from other *in vitro* studies,^{26,27} in contrast to those obtained for CD54 and CCR7, which have not yet been published. Although there was no difference in the expression of CD86 between iMoLCs and iMoDCs, its low expression on both DC types corresponded with their immature phenotype.²⁷ Upon maturation, both DC subsets up-regulated most cell-surface markers, but the expression of these markers was lower on mMoLCs than on mMoDCs. These results are in accordance with the fact that TGF- β down-regulates HLA-DR, CD83 and CD86 on DCs.²⁸

The main finding of this study was that iMoLCs induced weaker T-helper 1 (Th1) and Th2, but stronger T-helper 17 (Th17), polarization of allogeneic CD4⁺ T cells than iMoDCs. In contrast, mMoLCs were able to induce stronger Th1, Th2 and Th17 immune responses than mMoDCs. Several *ex vivo* studies have shown that both LCs and IDDCs induced Th1 and Th2 polarization of alloreactive CD4⁺ T cells,^{29,30} while only LCs were able to induce Th17 polarization of CD4⁺ T cells.³¹ Stronger induction of the Th17 response by MoLCs compared with MoDCs is in accordance with the specific request for IL-17 production in epithelia where LCs act as a first line of defense against various pathogens.³²⁻³⁵ Additionally, the Th17 response is also supported by the fact that tissues populated with LCs are enriched with TGF- β .³⁶ Therefore, our results on the *in vitro* counterparts of LCs and IDDCs shed new light on these important biological phenomena.

Lower production of IFN- γ and higher production of IL-17 by allogeneic CD4⁺ T cells in co-culture with iMoLCs compared with co-culture of CD4⁺ T cells and iMoDCs, are in agreement with the lower production of IL-12 and TNF- α and higher production of IL-23, respectively, by iMoLCs compared with iMoDCs. A similar, strong association between the levels of IL-23 and the production of IL-17 in co-culture of CD4⁺ T cells and

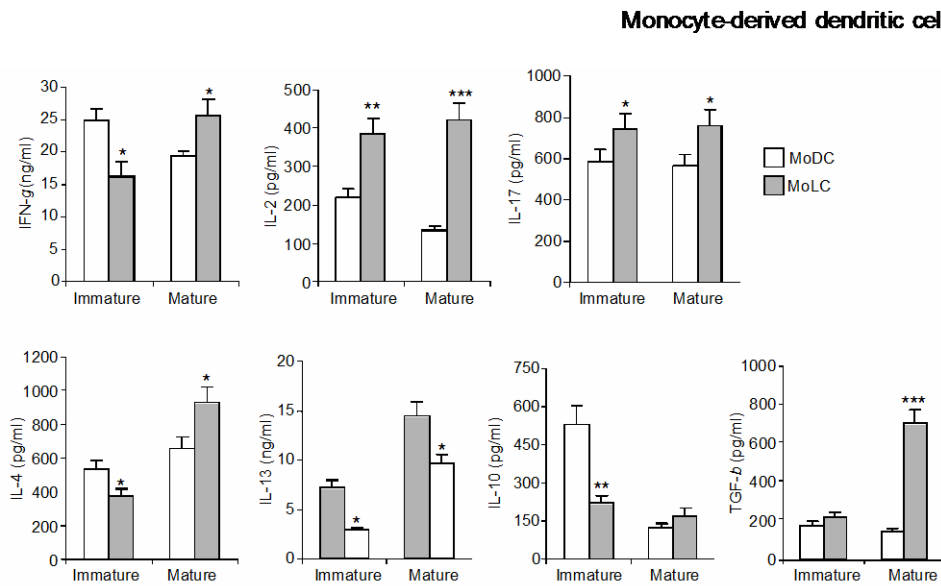


Figure 5. Production of cytokines by allogeneic CD4⁺ T cells in co-culture with immature or mature monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) or monocyte-derived Langerhans' like cells (MoLCs). The amounts of cytokines in both co-cultures (MoDCs/CD4⁺ T cells and MoLCs/CD4⁺ T cells) were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) or FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex, as described in the Materials and methods. Values are given as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ compared with MoDCs. IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleukin; TNF- α , tumour necrosis factor- α .

mMoLCs was confirmed in this study. Higher levels of IL-12 and lower levels of IL-10 in mMoLC cultures might explain why mMoLCs are more potent inducers of Th1 polarization than mMoDCs. An interesting finding was the lower ability of iMoLCs to induce a Th2 response compared with iMoDCs, as judged by lower levels of both IL-4 and IL-13 in co-culture supernatants. When assessing the production of IL-13, the same finding was confirmed by mMoLCs. However, the opposite was observed for the production of IL-4. One explanation could be differences in the dynamics of secretion of Th2 cytokines in co-culture. Namely, it has been shown that up- and down-regulation of IL-13 production by CD4⁺ CD45RO⁺ cells predominantly, is faster than the production of IL-4 in cultures with DCs.³⁷ However, the biological significance of this finding remains to be tested, bearing also in mind that IL-13 is a more potent down-modulator of IFN- γ production than IL-4.³⁸

The proliferation capability of CD4⁺ T cells stimulated by iMoLCs was higher than that of CD4⁺ T cells primed with iMoDCs, and the phenomenon correlated with the production of a higher level of IL-2. The reason for this finding is not clear because the expression of a costimulatory ligand (CD86) was similar and the expression of HLA-DR and CD54 was even lower than on iMoDCs. Therefore, it remains to be studied how the expression of this molecule changes as a result of contact with CD4⁺ T cells, in which CD40 ligand (CD4⁺ T cells) and CD40 (DCs) is of significant importance.³⁹ Peiser et al.⁴⁰ showed that stimulation of MoLCs with CD40 ligand was

followed by the up-regulation of CD83 and CD86 expression and the production of IL-12p70 and IL-10. In addition, CD40 triggering increased the potency of MoLCs to stimulate CD4⁺ T-cell proliferation. It is also not clear whether increased production of IL-2 is a cause or a consequence of cellular activation. In this context, lower production of IL-10 in a co-culture of iMoLCs with CD4⁺ T cells might be important, because IL-10 inhibits the production of IL-2 at the mRNA level without changing the expression or function of the IL-2 receptor (IL-2R).⁴¹ Therefore, in our culture system lower levels of IL-10 could have counteracted the production of IL-2, which is a key T-cell growth factor.⁴²

However, maturational stimuli significantly lowered the proliferation capability of CD4⁺ T cells triggered by mMoLCs, compared with mMoDCs, in spite of higher production of IL-2. This result could be explained by a lower expression of most cell-surface markers on mMoLCs compared with mMoDCs, and a different IL-2/TGF- β ratio. Lower expression of HLA-DR and CD54 on mMoLCs is in line with previously published data which show that mature LCs from skin explants, with a low ability for antigen presentation and reduced affinity to contact alloreactive CD4⁺ T cells, abrogated their proliferation.²⁹ In contrast, higher production of TGF- β in co-culture of CD4⁺ T cells and mMoLCs is in accordance with the effect of TGF- β on the modulation of intracellular effects of IL-2. Namely, it has been shown that TGF- β inhibits expression, as well as signalling through IL-2R, mediated by the Jak-Stat pathway.⁴³⁻⁴⁵

I. Rajkovic *et al.*

Anti-tumour vaccine protocols in the last few years have been mainly focused on mMoDCs, which are able to promote the Th1 polarization of CD4⁺ T cells.⁴⁶ However, experiments in mice have recently shown that CD4⁺ Th17 cells provided better protection against malignant melanoma than CD4⁺ Th1 cells because of their unique ability to promote CD8⁺ anti-tumour T cells *in vivo*.⁴⁷ Th17 cells maintained anti-tumour activity *in vivo* by producing IFN- γ but not IL-17,⁴⁸ as a result of the Th17/Th1 phenotypic switch.⁴⁹ As the mMoLCs in our study were stronger inducers of both Th1 and Th17 responses than mMoDCs, and CD4⁺ Th17 cells have been found in various human tumours,^{48,50–52} we hypothesized that mMoLCs might be useful for future vaccine protocols aimed against at least skin and epithelial tumours. However, it should be emphasized that mMoLCs were also stronger inducers of the Th2 immune response than mMoDCs, which could potentially decrease the intensity of the Th17/Th1 response.⁵³ As MoLCs achieved this characteristic after maturation, it would be reasonable to test additional maturation protocols in future experiments in order to determine their potentially useful characteristics for optimal stimulation of anti-tumour immunity. This assumption is supported by earlier studies showing that a well-established maturational cocktail,²⁴ which we used in our study, had the ability to expand a regulatory T-cell population,⁵⁴ whereas PGE₂ could additionally stimulate the production of IL-10, inhibit the secretion of IL-12 and induce Th2 polarization by DCs.^{55,56}

In conclusion, our results demonstrated that both iMoLCs and mMoLCs are better inducers of the Th17 immune response than MoDCs. This function, and the ability of MoLCs to stimulate a stronger Th1 immune response than mMoDCs, make mMoLCs a better candidate for preparation of anti-tumour DC vaccines.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (VMA/06-10/A.5) from the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. We would like to express our gratitude to Ms Dejana Dimitrijevic for assistance in English correction.

Disclosure

The authors deny any potential conflict of interest, including all relevant financial interests in any company or institution that might benefit from this publication.

References

- Riedl E, Stockl J, Majdic O, Scheinecker C, Knapp W, Strobl H. Ligation of E-cadherin on *in vitro*-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood* 2000; **96**:4276–84.
- Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009; **113**:3418–27.
- Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**:767–811.
- Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devillard E, Kissenpennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 2007; **204**:3119–31.
- Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C *et al.* Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 2002; **196**:417–30.
- Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M *et al.* Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 2007; **204**:3133–46.
- Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:935–47.
- Randolph GJ. Is maturation required for Langerhans cell migration? *J Exp Med* 2002; **196**:413–6.
- Villablanca EJ, Mora JR. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol* 2008; **38**:2975–80.
- Grunig G, Banz A, de Waal Malefyt R. Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacol Ther* 2005; **106**:75–96.
- Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 2002; **63**:1156–63.
- Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 1993; **151**:6535–45.
- Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA *et al.* Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol* 2001; **2**:1151–8.
- Angel CE, George E, Brooks AE, Ostrovsky LL, Brown TL, Dunbar PR. Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J Immunol* 2006; **176**:5730–4.
- Angel CE, Lala A, Chen CJ, Edgar SG, Ostrovsky LL, Dunbar PR. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int Immunol* 2007; **19**:1271–9.
- Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S *et al.* Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* 2004; **16**:877–87.
- Becheuille N, Andre V, Valladeau J, Perrier E, Dezutter-Dambuyant C. Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2006; **80**:45–58.
- Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; **17**:313–8.
- Qu C, Edwards EW, Tacke F *et al.* Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 2004; **200**:1231–41.
- Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo*. *Immunity* 1999; **11**:753–61.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; **19**:71–82.
- Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 1998; **187**:961–6.
- Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 2005; **6**:163–70.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G *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**:3135–42.
- 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**:1109–18.
- Takeuchi J, Watari E, Shinya E *et al.* Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**:674–9.
- van der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Kapsenberg ML, de Jong EC, Teunissen MB. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* 2007; **178**:1986–90.
- Geissmann F, Revy P, Regnault A *et al.* TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 1999; **162**:3567–75.
- Morelli AE, Rubin JP, Erdos G *et al.* CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. *J Immunol* 2005; **175**:7905–15.

Monocyte-derived dendritic cell subsets

- 30 Klechevsky E, Morita R, Liu M *et al.* Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity* 2008; **29**:497–510.
- 31 Mathers AR, Janelsins BM, Rubin JP *et al.* Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol* 2009; **182**:921–33.
- 32 Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; **165**:6107–15.
- 33 Kim B, Sarangi PP, Azkur AK, Kaistha SD, Rouse BT. Enhanced viral immunoinflammatory lesions in mice lacking IL-23 responses. *Microbes Infect* 2008; **10**:302–12.
- 34 Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; **190**:624–31.
- 35 Kelly MN, Kolls JK, Happel K *et al.* Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 2005; **73**:617–21.
- 36 Hashimoto K. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci* 2000; **24**(Suppl 1):S46–50.
- 37 Webb DC, Cai Y, Matthaei KI, Foster PS. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4⁺ Th2 cell function. *J Immunol* 2007; **178**:219–27.
- 38 de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **102**:165–9.
- 39 van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; **67**:2–17.
- 40 Peiser M, Wanner R, Kolde G. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J Leukoc Biol* 2004; **76**:616–22.
- 41 de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993; **150**:4754–65.
- 42 Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 1998; **70**:1–81.
- 43 Grundstrom S, Dohlsten M, Sundstedt A. IL-2 unresponsiveness in anergic CD4⁺ T cells is due to defective signaling through the common gamma-chain of the IL-2 receptor. *J Immunol* 2000; **164**:1175–84.
- 44 Campbell JD, Cook G, Robertson SE *et al.* Suppression of IL-2-induced T cell proliferation and phosphorylation of STAT3 and STAT5 by tumor-derived TGF beta is reversed by IL-15. *J Immunol* 2001; **167**:553–61.
- 45 Bright JJ, Kerr LD, Sriram S. TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J Immunol* 1997; **159**:175–83.
- 46 Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q *et al.* Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004; **64**:5934–7.
- 47 Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, 2009; **31**:787–98.
- 48 Muranski P, Boni A, Antony PA *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008; **112**:362–73.
- 49 Lee YK, Turner H, Maynard CL *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 2009; **30**:92–107.
- 50 Zhang B, Rong G, Wei H *et al.* The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **374**:533–7.
- 51 Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH *et al.* Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008; **14**:3254–61.
- 52 Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, Wang RF. Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:15505–10.
- 53 de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005; **26**:289–307.
- 54 Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 2006; **108**:2655–61.
- 55 Luft T, Jefford M, Luetjens P *et al.* Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002; **100**:1362–72.
- 56 Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells under the spell of prostaglandins. *Trends Immunol* 2003; **24**:108–11.

Immunol Res (2012) 52:20–33
DOI 10.1007/s12026-012-8279-5

IMMUNOLOGY IN SERBIA

The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors

Tanja Dzopalic · Ivan Rajkovic · Ana Dragicevic · Miodrag Colic



Miodrag Colic

Published online: 6 March 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Dendritic cells (DCs) are key antigen-presenting cells that express a wide variety of pattern-recognition receptors (PRRs). Triggering of a single PRR, especially Toll-like receptors (TLRs) and C-type lectins, induces maturation of DCs, but cooperativity between multiple PRRs is needed in order to achieve an effective immune response. In this review, we summarize the published data related to the effect of individual and joint PRR agonists on DCs and Langerhans-like cells derived from monocytes (MoDCs and MoLCs, respectively). Our results demonstrate that MoDCs co-stimulated with TLR3/TLR7 and TLR3/Dectin-1 ligands induced superior T helper (Th)1 and Th17 immune responses, compared to effects of single agonists. The opposite outcome was observed after co-ligation of TLR3 and Langerin on MoLCs. These findings may be relevant to improve strategy for tumor immunotherapy.

Keywords Monocyte-derived dendritic cells · Pattern-recognition receptors · Toll-like receptors · C-type lectins · Immunotherapy

Introduction

Dendritic cells (DCs) are bone marrow-derived antigen-presenting cells (APCs) that represent a key bridge between innate and adaptive immunity [1]. These cells have a unique capability to activate naïve T cells and to initiate CD4⁺ T helper (Th), CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and T-cell dependent antibody responses [1]. The antigen-presenting function of DCs is manifested by capturing and processing antigens into peptides that are displayed on their surface for presentation to T cells after migration to secondary lymphoid organs [2]. DCs capture antigens based on the expression of a wide variety of pattern-recognition receptors (PRRs), which discriminate self tissues from infectious nonself through pathogen-

associated molecular patterns (PAMPs) recognition. There are several described PRRs, including Toll-like receptors (TLRs), C-type lectins (CLRs), cytoplasmic retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RLRs), nucleotide oligomerization domain-like receptors (NLRs) and many others [3–5]. Activation of PRRs triggers signaling pathways, which is followed by phenotypic changes and functional maturation of DCs.

Mature MoDCs acquire migratory properties by modulation of the expression pattern of receptors for chemokines, down-regulate phagocytosis and endocytosis, and up-regulate expression of HLA class I and class II molecules, adhesion molecules (CD54), co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) and maturation markers, the properties necessary for their optimal T-cell polarization capacity [6]. T-cell polarization to either Th1, Th2 or Th17 profile depends on the type of co-stimulatory molecules and cytokines expressed by the DCs, which is in turn determined by the TLR signaling profile [7].

DCs are a heterogeneous group of cells comprising functionally distinct subtypes. Based on their differences in function, localization and phenotype, two main populations

T. Dzopalic · I. Rajkovic · A. Dragicevic · M. Colic (✉)
Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defense in Belgrade, Crnotravska 17, 11002 Belgrade, Serbia
e-mail: mjcolic@eunet.rs

T. Dzopalic · M. Colic
Medical Faculty, University of Nis, Nis, Serbia

of DCs in human peripheral blood have been described: CD11c⁺ myeloid DCs (mDCs), which include Langerhans cells, dermal and interstitial DCs, and CD11c⁻/CD123⁺/CD4⁺ plasmacytoid DCs (pDCs) [8]. Due to the expression of distinct PRRs capable for responding to various pathogens, both of them are able to initiate characteristic T-cell responses [6]. The functional plasticity and diversity of these DC subsets make them potentially very useful in designing effective cancer vaccines [9].

At least two mDC subtypes that specifically populate epithelial tissues can be described: Langerhans cells (LCs) and interstitial dendritic cells (IDCs). LCs resident in epidermis and mucosal epithelia are characterized by high expression of CD1a, Langerin molecules and E-cadherin. CD1a family of proteins binds and presents lipids while Langerin (CD207) receptors make contact with mannose and related sugars. After establishing contact with soluble or cell-surface antigens, Langerin molecules form Birbeck granules (characteristic tennis-racquet shape structures), which are involved in the process of alternative antigen presentation to T cells and/or their further endosomal processing. E-cadherin is an adhesion molecule that anchors epidermal LCs to keratinocytes and epithelial T cells [10–12].

As APCs of myeloid origin, both cell populations share some basic functional features with other DC populations [13]. After the uptake and processing of foreign pathogens that penetrate epithelia, resident LCs and IDCs mature during migration toward the local lymph nodes thus acquiring the capability to prime T cells. It was shown in *ex vivo* experiments that during this process LCs up-regulate MHC II molecules, co-stimulatory molecules and CC-chemokine receptor 7 (CCR-7) while down-regulating CD1a, Langerin, E-cadherin and CD54 [12, 14]. It is believed that migration of these populations can be initiated independently of maturation after the exposition to self-antigens [15, 16]. Immature LCs and IDCs can probably promote peripheral tolerance in the nearby lymph node either by inducing anergy or apoptosis of self-reactive naïve T-cell clones or by induction of T regulatory cells (Tregs) [17]. The roles of LCs and IDCs to prime naïve T cells or to induce anergy of T cells can be explained by specific TLR profiles and other PRRs of these cells.

Since the extent of circulating DCs in human blood is very low, the most commonly used approach exploit *in vitro*-generated monocyte-derived DCs (MoDCs) [18]. It includes cultivation of monocytes, obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), with recombinant granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4, which are able to differentiate into immature MoDCs after 5–6 days [19]. The addition of transforming growth factor β (TGF- β) to this cytokine

cocktail results in the generation of Langerhans-like DCs (MoLCs) [20].

The aim of this review is to provide insights into the response of *in vitro*-generated MoDCs and MoLCs to the co-ligation of PRRs, as a basis for new immunotherapy perspectives.

TLRs

The evolutionary conserved TLRs are best-characterized PRRs, which discriminate self from nonself, providing the first line of defense against invading pathogens. Although a part of the innate immunity, TLRs initiate long-standing and protective immunity by presenting antigen motifs to the cells of adaptive immune system [21]. To date, 10 and 12 functionally active TLRs have been identified in humans and mice, respectively. They are most commonly divided into two groups depending on their cellular localization and PAMP ligands. One group refers to TLRs expressed on cell surfaces and recognize mainly microbial membrane components (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6). The other group consisting of TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 is expressed in intracellular vesicles (endosomes, lysosomes, endoplasmic reticulum) where they recognize microbial nucleic acids [22]. The TLRs are expressed by various immunologically relevant cell types, including DCs, macrophages and B cells [23], but DCs are particularly important for all aspects of TLR function.

TLRs are a family of transmembrane receptors consisting of ectodomains with multiple leucine-rich repeats (LRRs), linked by a transmembrane domain to a conserved cytosolic domain called the Toll/IL-1 receptor homology (TIR) domain [21]. The super-family of TIR domain-containing receptors also includes the IL-1R/IL-18R family, which act by recruiting and homodimerizing with TIR domain-containing adaptor proteins. Myeloid differentiation protein 88 (MyD88), as a major adaptor protein linking these receptors, is required for signaling through all TLRs, except TLR3, which acts through the adaptor molecule Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing interferon (IFN)- β (TRIF), while TLR4 signals through both MyD88- and TRIF-dependent pathways. Recruitment of MyD88 leads to the activation of IL-1 receptor-associated kinases (IRAKs) and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), consecutively activating transcription factors, such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) [24]. TLRs are widely expressed on immune cells and possess distinctive functions depending on the cell type and signaling pathways [25]. TLR agonists, as maturation agents for DCs, have been tested as an attractive agent for initiating or boosting the anti-tumor response [26].

TLR2, expressed by both MoDCs and mDCs [27], is involved in the recognition of a wide spectrum of microbial molecules, such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, parasites and viruses [28]. Due to the formation of heterodimers with TLR1 and TLR6, TLR2 has a capacity to bind a variety of ligands [29]. TLR2/TLR1 and TLR2/TLR6 activation leads to DC maturation and NF- κ B activation through recruitment of MyD88, and subsequent production of numerous cytokines [30]. Recent study has shown that, through activation of specific pathways involving TLR2, zymosan can activate DCs [31]. Zymosan is a crude cell-wall component mixture of the baker's yeast extracts from *Saccharomyces cerevisiae*, composed mainly of β -glucans, mannans and chitins [32]. Investigating differential regulation of cytokine production in human DCs, Gerosa et al. [33] have shown that zymosan stimulated IL-23 rather than IL-12p70 production in MoDCs, suggesting its role in Th17 immune response. The same study reported that low levels of IL-12p70 did not affect Th1 response, induced by zymosan-stimulated MoDCs. Wei et al. [32] have shown that this TLR2 ligand can promote phenotypic maturation of human MoDCs, followed by an increased allostimulatory capacity and production of both pro- and anti-inflammatory cytokines.

It has been shown that freshly purified LCs and MoLCs display TLR2 and its associated receptors TLR1 and TLR6, but no TLR4 [34]. This expression pattern was also similar to that of the freshly isolated LCs from human skin [35]. After stimulation with a TLR2 agonist, peptidoglycan (PGN), MoLCs weakly up-regulated maturation markers CD80, CD86 and HLA-DR and produced smaller amounts of IL-12p70 and IL-10 when compared to MoDCs. Stimulation with a TLR4 agonist, lipopolysaccharide (LPS), did not show any measurable production of these cytokines, nor changes in the expression of maturation markers, when compared to control [36]. Since Gram-positive bacterial species are the most important commensal bacteria in skin that can also cause severe systemic infections, it is most likely that production of IL-10 after TLR2 ligation with PGN can be required for avoiding reaction against commensals. [34]. Experiments on murine DCs supported this hypothesis because TLR2^{-/-} mice showed impaired immunity against *Staphylococcus aureus* [37]. Recent studies imply that LCs activated by TLR2 ligands can also induce Th17 polarization of allogeneic CD4⁺T cells [35].

TLR3 is a PRR highly expressed in immature MoDCs [29]. Ligation of TLR3 by its specific agonist double-stranded (ds)RNA, that signals the presence of infectious agent, is followed by activation of DCs and induction of protection to viral cytopathic effect [38]. Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly (I:C)) is a synthetic analogue of dsRNA and a TLR3 agonist. Studies so far have shown that Poly (I:C) induces phenotypic maturation of MoDCs [39].

Therefore, Poly (I:C) is an appropriate maturation agent for MoDCs. Poly (I:C)-treated MoDCs are in vitro and in vivo potent producers of bioactive IL-12, a crucial initiator of the Th1 response [39] and weak producers of IL-10, an anti-inflammatory cytokine that drive T cells toward Th2 and T regulatory cell (Treg) response [40, 41]. We have found that stimulation of TLR3 increases the production of IL-17, a signature cytokine of the Th17 subset of CD4⁺ T cells whose expansion and maturation are promoted by IL-23, which is in consistence with results published by Sallusto et al. [42]. Collectively, stimulation of MoDCs with Poly (I:C) polarizes the immune response toward strong Th1 and moderate Th17 responses, respectively.

LC-like DCs derived from human cord blood express TLR3 receptors [43]. Recent study with bafilomycin, an inhibitor of endosomal acidification, on LCs isolated from human skin, showed that TLR3 is responsible for the effects of Poly(I:C) on the induction of maturation and allostimulatory properties and Th1 polarizing capability of LCs [44]. Our results on MoLCs mostly corroborated these results, but an interesting finding was that Poly (I:C) did not modulate Th2 or Th17 polarization compared to control (unpublished data).

TLR4, as a founding member of the human TLR family, was described as essential for recognition of bacterial LPS, a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria [21]. TLR4 interacts with three different extracellular proteins—LPS binding protein (LBP), CD14 and myeloid differentiation protein 2 (MD-2)—to induce a signaling cascade leading to the activation of both the MyD88- and TRIF-dependent pathways. This activation is necessary for the induction of inflammatory cytokines. LPS is one of the most commonly used compounds for the induction of DC maturation, which in turn produce more cytokines and express co-stimulatory molecules to activate T cells [45, 46]. LPS also stimulates macrophages to produce proinflammatory cytokines [47]. Such treated MoDCs produce moderate levels of IL-12, but also IL-10 [46]. TLR4 signaling pathway can mediate a signal from dying tumor cells that causes DCs to mature and elicit phagocytosis [48]. Since the immune response activated from dying tumor cells is essential for a successful cancer therapy, TLR4 agonists could be tested for the enhancement of current chemotherapeutic regimens [49].

TLR5 is distinctive for its ability in recognizing the flagellin protein component of bacterial flagella [28]. Intestinal epithelial cells, as well as lamina propria DCs, express TLR5 in a wide range, suggesting its role in the detection of flagellated bacteria in the gut [24]. The expression of TLR5 on MoDCs and mDCs has been described as well [50]. Study by Means et al. [51] have shown that ligation of TLR5 by flagellin could induce phenotypic maturation of MoDCs, as judged by increased

expression of maturation and co-stimulatory markers. The same group reported that flagellin-matured DCs displayed an enhanced T-cell stimulatory capacity with a concomitant decrease in the endocytic activity. Recent study showed that stimulated DCs from lamina propria by flagellin are good stimulators of Th1 and Th17 immune responses [52].

TLR7 and TLR8 are natural receptors for single-stranded (ss) RNA and, together with TLR3 and TLR9, act as powerful activators of the innate immune response upon viral infections [53]. Besides ssRNA, several chemical compounds have been described as TLR7/8 agonists, such as resiquimod, CL075 and CL097 [54]. Stimulation of MoDCs with these compounds resulted in their maturation with the capability for polarization of the immune response toward Th1 [55]. Therefore, in order to understand the essence of MoDCs activation by common TLR7/8 ligands, it is important to evaluate the effects of selective TLR7 and TLR8 agonists. There are two well-known groups of selective TLR7 agonists, imidazoquinolines (imiquimod and gardiquimod) and guanosine derivatives (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxo-guanosine (loxoribine) and 7-thia-8-oxo-guanosine (7-TOG)) [54]. The data regarding their effect on MoDCs are controversial. Namely, a number of studies showed that selective TLR7 ligands could stimulate only preactivated MoDCs [56, 57]. The other group of authors described that imidazoquinolines inhibited differentiation, but enhanced maturation of human MoDCs [58]. Our group studied selective TLR7 agonists (loxoribine and 7-TOG) and showed that loxoribine, at relatively high concentrations (250 μM), was able to induce maturation of MoDCs without additional stimuli and the effect was partly dependent on the up-regulation of TLR7 expression. In addition, loxoribine-treated MoDCs were potent inducers of Th1 and Th17 immune responses [59].

In our previous *in vitro* studies in rodents, we described 7-TOG as a strong modulator of the immune response [60, 61]. Later investigations into human monocytes demonstrated significantly augmented stimulatory potential of 7-TOG-treated monocytes on T-cell proliferation, which was partially dependent on IL-12 production. Different TLR7 expression in rodent and human, as well as possible dosage-dependence and characteristic chemical structure, led us to further investigate the modulatory activity of 7-TOG on human MoDCs. We showed that this guanosine analogue was able to activate immature MoDCs in a strong dose-dependent manner. Namely, the highest applied concentration of 7-TOG (250 μM) was a potent inducer of MoDCs maturation, which directed the immune response toward Th1 and Th17. The intermediate concentration of 7-TOG (100 μM) was, however, a weak stimulator of MoDCs maturation, and such treated MoDCs stimulated the Th17 response. On the contrary, the lowest applied

concentration of 7-TOG (25 μM) did not trigger maturation of MoDCs, but primed these cells to polarize the immune response toward Th2 (unpublished data). Due to the endosomal localization of TLR7, delivery of agonists to endosome is significantly facilitated through the process of phagocytosis or endocytosis. This could be advantageous in increasing the intracellular concentrations of the compounds and subsequent better DCs activation. Therefore, our research group was studying multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) as a delivery system of 7-TOG to endosomal TLR7 in human MoDCs, when different concentrations of 7-TOG were covalently attached to MWCNTs by the original method [62]. Light, confocal and transmission electron microscopic observations confirmed efficient phagocytosis of 7 TOG-MWCNT nanoparticles (Fig. 1). This delivery system showed that low concentrations of 7-TOG attached to MWCNTs was able to promote both Th1 and Th17 immune responses, as efficiently as ten times higher concentrations of soluble 7-TOG (unpublished data). These findings support the hypothesis that functionalized MWCNTs may be a challenging system for delivery of 7-TOG to MoDCs, in order to improve the protocols for preparation of DC vaccines.

TLR9 recognizes specific unmethylated 2'-deoxyribo (cytidine-phosphate-guanosine) (CpG) DNA motifs that distinguish microbial DNA from mammalian DNA [63]. CpG-containing oligonucleotides (ODNs) can mimic natural CpG sequences and are used as TLR9 ligands [64]. In humans, TLR9 can be found on pDCs, activated monocytes, NK cells and B-lymphocytes [64]. Until recently, it was believed that MoDCs and mDCs do not express TLR9 [65]. However, using synthetic CpG-A ODN D19, Hoene et al. [66] proved the existence of TLR9 in MoDCs, in amounts comparable with pDCs. It has been shown that ligation of TLR9 induces maturation of MoDCs, with a subsequent increased T-cell proliferation and Th1 differentiation. Data about the modulatory effects of TLR9 agonists on MoDCs are scarce.

Co-ligation of TLRs

Although triggering of single TLRs results in phenotypic and functional changes in DCs, cooperation between multiple TLRs is needed in order to achieve an effective immune response. Therefore, numerous studies using simultaneous engagement of multiple TLRs were performed.

The co-ligation of TLR2 and TLR4 caused greater production of TNF- α and IL-6 by human monocytes than ligation of single receptors did [67, 68]. Further results indicated the secretion of additional levels of TNF- α , IL-6 and IL-12p40 if Poly (I:C) and CpG DNA simultaneously

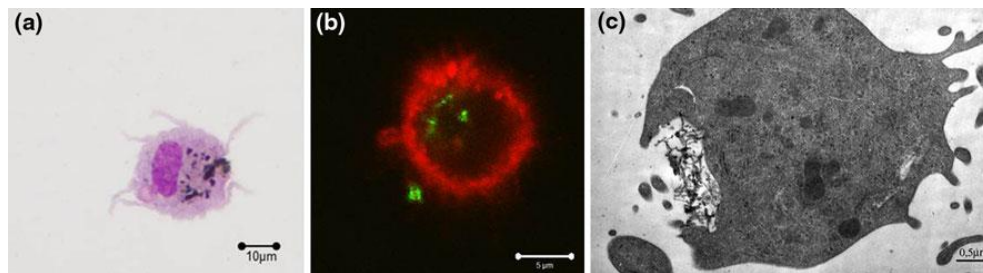


Fig. 1 Internalization of 7-TOG attached to MWCNTs by MoDCs. MoDCs were generated by cultivation of human monocytes in the presence of GM-CSF (100 ng/ml) and IL-4 (20 ng/ml) for 6 days and functionalized MWCNTs with 7-TOG for another 48 h. **a** In order to evaluate ingestion of MWCNTs by MoDCs, cytopspins were prepared and observed by light microscopy. *Black dots* inside the cell are presumed to be ingested nanoparticles; **b** For confirmation, cytopspins

were processed for confocal microscopy. Fluorescent 7-TOG-MWCNTs, coupled with FITC, are seen inside the HLA-DR/Alexa 548⁺ cell; **c** Finally, MoDCs cultivated with 7-TOG-MWCNTs were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) after appropriate processing. TEM micrograph shows protrusion of cell membrane, forming coated pit with ingested nanoparticles

activated mouse macrophages, suggesting, for the first time, that multiple TLR ligands increase the host resistance [69]. Napolitani et al. [70] are among the first describing the strong synergistic effects of TLR ligands on cytokine production by human DCs. Namely, this group showed that TLR3 or TLR4 potentially acted in synergy with TLR7/8 in the enhancement of IL-12 and IL-23 production by human MoDCs, which resulted in additional potentiation of Th1 polarizing capacity. These findings were explained by the fact that simultaneous activation of NF- κ B, interferon regulatory factors (IRFs), mitogen-activated protein (MAP) kinases (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI-3 K) and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) signaling pathways are involved in this process, suggesting a crucial role for the synergistic gene expression during the combined TLR3 or TLR4 and TLR7/8 ligand stimulation [71].

Similar effects on cytokine production by MoDCs have also been reported for co-ligation of TLR3 or TLR4 with TLR2 (PGN), TLR2/TLR6 (zymosan) and TLR5 (flagellin) [72]. Namely, it has been shown that MoDCs combine and integrate signals received via the IFN-dependent pathway by engagement of TLR3 and activation of TRIF with the MyD88-dependent pathway by ligation of TLR2 (PGN), TLR2/TLR6 and TLR5.

The other group of authors reported that TLR2 is able to restrain the TLR4- and/or TLR7/8-induced production of proinflammatory cytokines, while leaving the cytokines induced by TLR3 or TLR5 unchanged [73]. They also revealed that abrogating the IL-12p70 production by DCs, TLR2 exerts its suppressive function. This inhibition of IL-12p70 release by TLR2 led to an increased DC-mediated T-cell differentiation into Th2 and Th17 cells. Therefore, it can be assumed that the modulation of TLR2-mediated signaling in cooperation with other TLR ligands might

provide novel insights for interventions within immune diseases.

Based on our previous papers, where the effects of single TLR3 and TLR7 agonists on MoDCs were investigated [59, 74], we tried to determine whether these agonists, triggering different pathways, may cooperate in MoDC activation. Therefore, we combined suboptimal (10 μ g/ml) or optimal (25 μ g/ml) concentrations of Poly (I:C) with suboptimal (100 μ M) and optimal (250 μ M) concentrations of loxoribine. The effect of each combination on phenotypic properties and cytokine production by MoDCs and their Th polarizing capability was studied, and some of these results are presented in Fig. 2.

The first combination of suboptimal concentrations of Poly (I:C) and loxoribine induced maturation of MoDCs, directing the immune response toward Th1, as documented on the basis of levels of IFN- γ in co-culture with allogeneic CD4⁺T cells. Higher production of IFN- γ correlated with the levels of IL-27 and IL-12, which is in agreement with previous study where IL-27, by synergizing with IL-12p70, participates in the expansion and survival of Th1 cells [75]. Such treated MoDCs also potentiated the production of IL-17 by CD4⁺T cells, which correlated with significantly higher amounts of IL-23 in MoDC cultures, compared to the levels of the cytokines induced by suboptimal concentrations of single agonists. This Th17 profile was somewhat expected, knowing that final differentiation of Th17 cells partially depends on IL-23 [76].

Cultivation of MoDCs with a combination of both optimal concentrations of TLR agonists primed them to polarize the immune response toward Th1 with the significant production of IFN- γ by allogeneic CD4⁺T cells. This finding also correlated with the increased levels of IL-12 and IL-27 [77]. This induction of Th1-polarizing signals was not followed by up-regulation of HLA-DR and

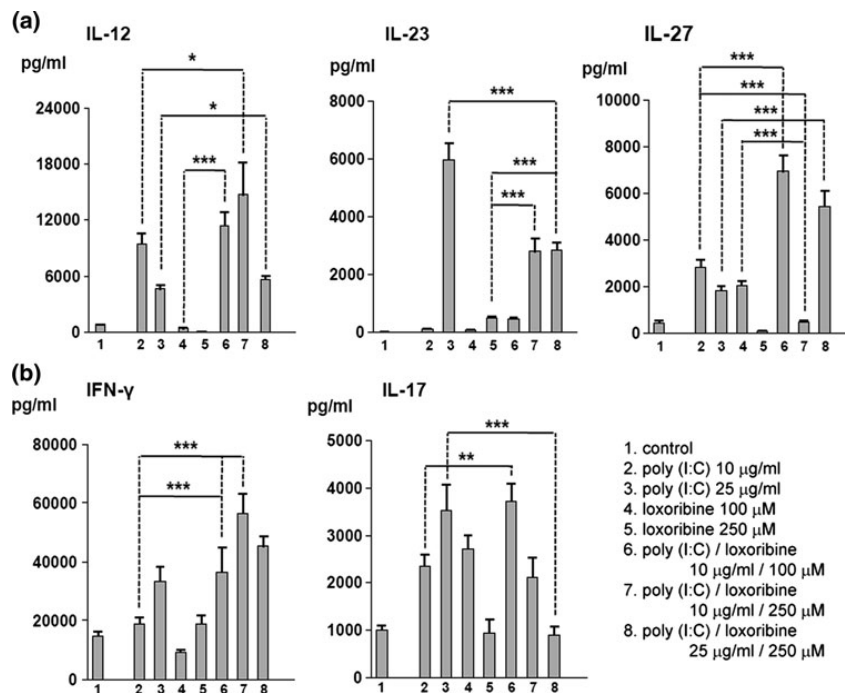


Fig. 2 The effect of TLR3 and TLR7 co-ligation on cytokine production and Th polarization capability of MoDCs. MoDCs were obtained by cultivation of human monocytes for 6 days with GM-CSF (100 ng/ml) and IL-4 (20 ng/ml) and then stimulated with Poly (I:C) and loxoribine in different concentrations for an additional 48 h. **a** Levels of secreted IL-12, IL-23 and IL-27 were determined in cell-free supernatants by ELISA; **b** Allogeneic CD4⁺T cells were co-cultured with MoDCs (1×10^4 cells/well) at a concentration of

1×10^5 cells/well. Co-cultivation lasted 5 days, when PMA (20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) were added for an additional 8 h. Levels of IFN- γ and IL-17 were measured in CD4⁺T-cell/DC co-culture supernatants using sandwich ELISA kits following the manufacturer's instructions. Cytokine levels are given as $x \pm$ S.D. ($n = 3$ donors). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared to relevant controls

co-stimulatory molecules. On the contrary, their expression was down-regulated, compared to the effect of single agonists. A similar finding was described by Napolitani et al. [70] who suggested an existence of different induction thresholds between these two "programs" and indicated that such co-ligation may represent a so-called "security code," which ensures powerful effectors (Th1 response) to be generated only in response to invading pathogens. In addition, distinct cellular compartment of TLR3 and TLR7 could be of importance, when dsRNA can initiate TLR3 and prime DCs to a subsequent activation of TLR7 in the endosomal compartment. On the other hand, such treated MoDCs decreased the production of IL-23, compared to the effect of single Poly (I:C), and the effect was followed by decreased production of IL-17 in co-culture with CD4⁺T cells. The enhancement of IL-27 production could be responsible for down-regulation of IL-23, according to literature data [78]. High amounts of IL-27 could be also explained by suppression of IL-4 production and subsequent decrease in the Th2 cell differentiation

[79]. When a suboptimal concentration of poly (I:C) was combined with an optimal loxoribine concentration to activate MoDCs, the Th1 immune response was mostly pronounced and followed by increased levels of IL-12 in MoDC cultures. These findings confirmed again the fact that DCs have very large capacity to produce IL-12 that is "deployed," only in the response to multiple stimuli acting simultaneously [70].

Ligation of TLR3 and TLR7 by their specific ligands results in conformational changes in the receptors, leading to downstream signal transduction, which primarily involves MyD88- and TRIF-dependent pathways [80]. Namely, it is known that signaling through TLR3 and TLR7 differs. Activation of TLR3 leads to the induction of IRF3, NF- κ B and MAPK through the engagement of TRIF adapter protein, whereas TLR7 signaling activate NF- κ B via a MyD88-dependent pathway and activation of IRF7 [28]. Furthermore, it has been shown that ongoing stimulation through the TRIF-dependent pathway is required for the enhancement of the MyD88-dependent DC function and for the T-cell

activation [81]. Based on these findings, we postulated that maybe combination of these signaling pathways could modulate the final outcome of the immune response. Namely, the MyD88-independent pathway corresponding to signal 2 increases the T-cell priming, but the MyD88-dependent pathway, as signal 3, determines a T-cell response [81]. This crosstalk may be established to avoid induction of unnecessary activation of immune responses while allowing an immune response against tumors.

C-type lectin receptors (CLRs)

C-type lectin receptors are family of both soluble and transmembrane proteins that possess at least one carbohydrate recognition domain (CRD) with unique specificity. They provide DCs with the ability to recognize mannose, fucose and glucan carbohydrate structures that are part of the most pathogens [82]. CLRs can be divided into two groups according to their molecular structures. Group I has its amino (N) terminus pointing outwards of the cell and has several CRDs at the carboxyl (C) terminus. It is named the mannose receptor (MR) family, which includes mannose receptor (CD206) and DEC-205 (CD205) [4]. Group II has its N terminus pointing into the cytoplasm of the cell and has single CRD. It is called the asialoglycoprotein receptor family and comprises the DC-specific ICAM3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), Langerin (CD207) and the members of Dectin-1 and DC immunoreceptor (DCIR) families. The Dectin-1 family includes Dectin-1, lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1), C-type lectin receptors 1 and 2 (CLEC-1 and 2) and myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL), while DCIR family includes DCIR, DC immunoreceptor (DCAR), Dectin-2 and blood DC antigen protein 2 (BDCA-2) [83, 84].

Triggering of CLR by different pathogens can induce gene expression independently of other PRR signaling (Dectin-1, Langerin) or, by contrast, induce signaling pathways that can only modulate the TLR-induced gene expression (DC-SIGN, BDCA2, DCIR and MICL). Common feature of both signaling pathways is the induction of NF- κ B, a key mediator of inducible gene expression in the immune system, although other transcription factors contribute to the CLR-induced signal transduction as well [28, 85].

Dectin-1 is one of many PRRs that mediate their own signaling and can synergize with TLRs to initiate specific responses to pathogens [86]. Dectin-1 was first identified as a DC-associated C-type lectin, containing a single extracellular CRD motif at the COOH-terminal end that recognizes β -1,3-glucans found mainly in the cell walls of fungi and an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-like sequence (hemITAM) in the cytoplasmic

domain [87], necessary for intracellular signal generation [88]. Subsequent studies have shown that mouse Dectin-1 is highly expressed on neutrophils, alveolar macrophages and inflammatory macrophages with lower expression on resident macrophages, DCs and some T cells [89]. Human Dectin-1 is expressed additionally on B cells. Dectin-1 recognizes soluble and particulate β -glucan [87, 89] that makes up to 50% of the fungal cell wall. Activation of the Dectin-1 receptor is followed by the recruitment of the tyrosine kinase Syk by hemiITAM sequence in the cytoplasmic domain. This initiates downstream signaling cascade that culminates with the activation of NF- κ B, the transcription factor NFAT and MAPK [90]. Upon ligand recognition, Dectin-1 can induce diverse responses such as an oxidative burst, inflammatory cytokine production and phagocytosis [88].

The role of Dectin-1 in modulating the biological functions, of human DCs, is reported in only few studies. It has been shown that mouse DCs stimulated with curdlan, a Dectin-1 agonist, increased co-stimulatory molecules (CD80, CD86 and CD40) [90]. These results are similar to those showing an up-regulation of CD40 and CD86 by human DCs treated with *Candida albicans*. It is known that the response of DCs to *C. albicans* is largely dependent on Dectin-1 recognition [91]. Our results (unpublished data) support these findings and additionally showed an up-regulation of HLA-DR and CD83 expression by curdlan-treated MoDCs. Collectively, all these data demonstrated that Dectin-1 could be instrumental in promoting an efficient antigen presentation and that curdlan, through activation of Dectin-1, induce phenotypic maturation of human MoDCs. Previous studies on human MoDCs have shown that stimulation of Dectin-1 signaling pathway with curdlan increases the production of IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12p35, IL-23p19 and IL-12p40 [92]. Activation of the Dectin-1 pathway in our study increased the production of IL-27 and lowered the production of IL-10 by MoDCs, while the levels of IL-6, TNF- α and IL-23 were unchanged, compared to control. Although the levels of both IL-12 and IL-23 were very low or undetectable, an intriguing finding of our study and a previous publication [90] was the ability of curdlan to promote Th1 and Th17 polarizing capabilities of MoDCs.

Dectin-2 is mostly expressed on immature MoLCs and to a lesser extent on immature MoDCs. Maturation of MoLCs is followed by reduced expression of Dectin-2, while the opposite effect was observed on MoDCs [93]. This receptor is also detected in monocytes, macrophages, B cells and neutrophils [94]. Triggering the Dectin-2 receptor with fungal hyphae from *Candida*, *Trichophyton* and *Microsporium species* leads to the production of TNF- α and IL-6, independently on other TLRs by DCs [95].

DC-SIGN (CD209) was first identified as an intercellular binding molecule, necessary for establishing the

DC/T-cell contact, which influences the T-cell proliferation and for binding and presentation of unprocessed HIV-1 virions to CD4⁺ T cells [4, 96]. DC-SIGN recognizes mannose- and fucose-containing pathogens and modulates TLR3-, TLR4- and TLR5-induced immune responses by DCs. Activation of this receptor induces an up-regulation of the TLR-induced IL-10 production [97].

Recent studies have shown that Langerin has a similar role on LCs as Dectin-1 receptor and DC-SIGN have on DCs. Namely, although LCs also express Dectin-1 it was found that Langerin is the main CLR for fungi [98]. Langerin displays extracellular C-terminal CRD and transmembrane anchor segment that are similar to Dectin-1. Oligomerization of three Langerin molecules via the α -helical neck region that connects aforementioned segments is responsible for binding specificity of this receptor to glycoprotein ligands. In addition, this extracellular domains promote folding and superimposition of plasma membrane that lead to the formation of ultramicroscopically characteristic Birbeck granules [99]. The granules can play a possible role as the subsequent intracellular storage that shelter material bound to Langerin or CD1a molecules from degradation until LCs receive exact activation signal. It was shown in vitro that Langerin and Birbeck granules are simultaneously down-regulated while MHC class II and CD86 are up-regulated after maturation of LC maturation influenced by CD40 ligation. Since proinflammatory signals, such as TNF- α , increase the expression of Langerin, it can be postulated that migration and maturation of LCs in lymph nodes can be independently regulated. This finding may also explain the presence of Langerin + cells outside of skin or mucosa [11]. Langerin lacks an intracellular tyrosine-based motif that acts as a potential signal transduction site. It contains a sequence of proline-rich repeats, which is known to interact with SH3 (src homology 3) domain proteins that regulate cytoskeleton movements connected with vesicular transport [99]. Similarly as DC-SIGN, Langerin can introduce HIV-1 virion to T cells and at the same time prevent their infection [100].

Recent ex vivo experiments on human LCs confirmed that not only Dectin-1 but also Langerin can interact with β -glucans [101]. Curdlan was shown to strongly bind to human LCs. Since LCs isolated from epidermis expressed both Langerin and Dectin-1 receptors, but no DC-SIGN, it is possible that the main CLR for fungi on LCs could be Langerin [98]. Our study showed that MoLCs stimulated with curdlan induced stronger Th1, Th2 and Th17 responses compared to control, nonstimulated MoLCs (unpublished data). This result is very similar to the effect that we have found in our previous experiment when MoLCs were matured with classic cocktail of proinflammatory cytokines and modulators [15].

BDCA2 is considered as a specific marker of pDCs, known for their ability to produce large amount of type I IFNs upon viral infection [102]. One of the proposed mechanisms of the immune escape by viruses is triggering the BDCA2 molecule. BDCA2 ligation following TLR3 or TLR9 activation leads to up-regulation of IL-10 production and suppression of IL-6 and TNF- α [102].

DCIR and MCLL are the only known CLR that contain immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) in their cytoplasmic domain [85]. Studies based on the use of antibodies for this ITIM-bearing CLR have shown that activation of DCIR inhibits TLR8-mediated production of IL-12 and TNF- α by myeloid DCs and TLR9-induced production of IFN- α and TNF- α by pDCs. The activation of MCLL suppresses TLR4-induced IL-12 production [103, 104]. DCIR is more expressed on CD14⁺/CD1a⁻ MoDCs (correspond to IDDCs) than on CD1a⁺CD14⁻ MoLCs (correspond to LCs). DCIR surface level does not change during differentiation from monocytes to immature MoDCs, but it is down-regulated after stimulation with LPS or CD40L [105]. On the other hand, triggering of MCLL augmented CD40L-mediated Th1 response, but inhibited the LPS-mediated response [104].

Co-ligation of TLRs and CLR

Recent studies have shown that the treatment of MoDCs with a TLR3 ligand, Poly (I:C), or Dectin-1 agonist, curdlan, elicits their maturation into the cells competent to prime effective immune responses. Since individual agonists exert different outcome on immunomodulation, we have performed a study in order to examine the response of MoDCs to the combined effect of Poly (I:C) and curdlan. Our results showed that co-ligation of TLR3 and Dectin-1 leads to the phenotypical maturation of MoDCs, which was similar to the effect of Poly (I:C) alone, except an additional increase in the expression of CCR7. This chemokine receptor could be relevant to improved migratory properties of DCs. MoDCs treated with both ligands up-regulated the production of interleukin IL-12, IL-23 and IL-10, compared to the effect of Poly (I:C), alone. Curdlan-treated MoDCs stimulated the production of IL-17 by alloreactive CD4⁺ T cells more strongly than Poly (I:C)-treated MoDCs. The opposite effect was observed for IFN- γ production. When combined, these agonists primed MoDCs to further increase the production of IFN- γ by CD4⁺ T cells in co-culture, especially those of naïve (CD45RO⁻) phenotype, and IL-17 by memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells (unpublished results). Although no microbe or fungal pathogen that expresses or generates ligands for both TLR3 and Dectin-1 has been found so far, our findings can be

taken into consideration for development of new strategies in the field of immunotherapy (Fig. 3).

To our knowledge, there is no available data considering the effect of simultaneous activation of TLR3 and Langerin either on LCs or on MoLCs. We have shown in our experiments on MoLCs that this combination diminished allostimulatory potential of MoLCs and at the same time reduced their Th1 and Th17 polarizing capability (unpublished data). This finding still has to be thoroughly analyzed and reevaluated in the next experiments.

NLR and RLR family of PRRs

The other group of non-TLR PRRs (NLR and RLR family) refers to the cytosolic receptors involved in the recognition of microbial components as well. The NLR family includes 22 proteins divided into the group of NACHT, LRR and PYD containing proteins (NALPs), IL-1 β -converting enzyme protease-activating factor (IPAF) and nucleotide oligomerization domain (NOD). Signaling through the members of this family is very complex. Generally,

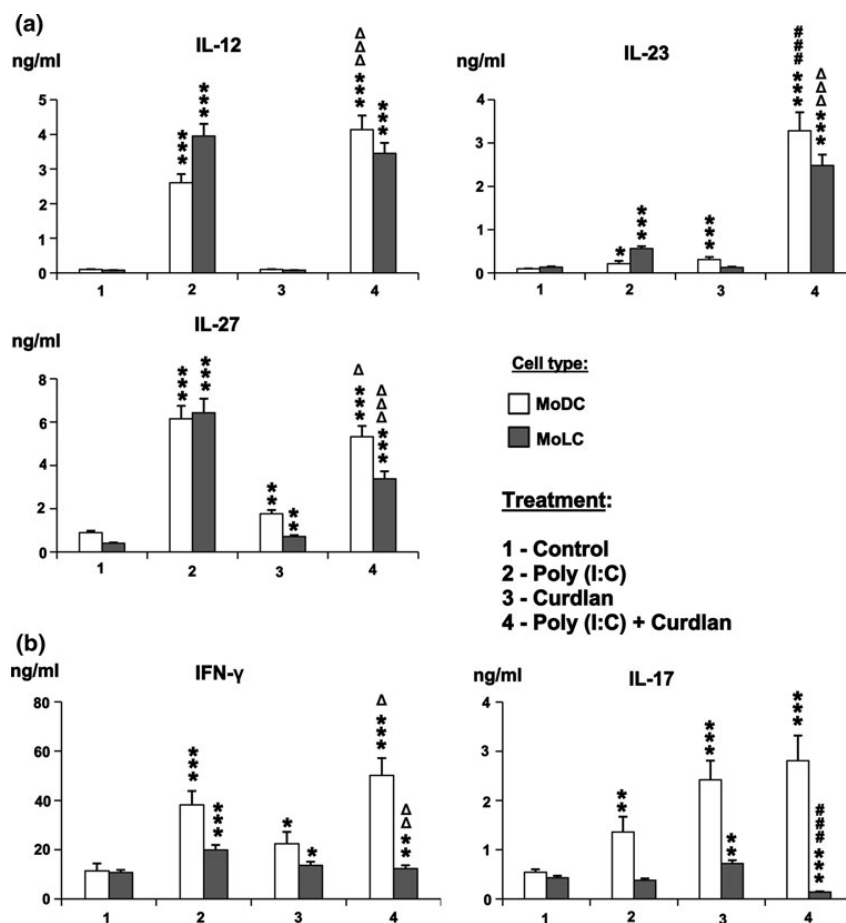


Fig. 3 The combined effect of Poly (I:C) and curdlan on the cytokine production and Th polarization capability of MoDCs and MoLCs. **a** Cultivation of human monocytes for 6 days with GM-CSF (100 ng/ml) and IL-4 (20 ng/ml) generated immature MoDCs, while addition of TGF- β (10 ng/ml) to this cytokine cocktail generated immature MoLCs. Immature MoDCs and MoLCs were stimulated with Poly (I:C) (25 μ g/ml), curdlan (100 μ g/ml) or their combination for an additional 48 h. Levels of secreted IL-12, IL-23 and IL-27 were determined in cell-free supernatants by ELISA. Values are given as $x \pm$ S.D. ($n = 3$ donors). **b** Purified CD4 $^{+}$ (1×10^5 cells/well) were

co-cultivated with MoDCs or MoLCs (1×10^4 cells/well) for 5 days, when PMA (20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) were added for an additional 8 h. After that, cell supernatants were collected and used for IFN- γ and IL-17 detection by ELISA and FlowCytomix Human Th1/Th2 11 plex. Cytokine levels are given as $x \pm$ S.D. ($n = 3$ donors). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared to control MoDCs/MoLCs. $\Delta p < 0.05$, $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0.005$ compared to Poly (I:C)-treated MoDCs/MoLCs. ### $p < 0.005$ compared to curdlan-treated MoDCs/MoLCs

activation of NALPs and IPAF leads to the activation of caspase-1, whereas NOD proteins activate NF- κ B [110]. Main members of the RLR family are retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) and laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). All these cytoplasmic PRRs recognize viral dsRNA [24]. Activation of RLRs goes through recruitment of the kinase TANK-binding kinase 1 (TBK1) and activation of NF- κ B and IRF7 and/or IRF3 with culmination in type I IFN production [106].

A number of papers have described synergistic production of cytokines upon co-ligation of NOD1 and NOD2 with many TLR ligands [107]. As shown, the stimulation of DCs with NOD2 and NOD1 agonists in combination with TLR3, TLR4 and TLR9 ligands synergistically induce IL-12p70. DCs stimulated with TLR4 together with either NOD1 or NOD2 activate human T cells to produce high levels of IFN- γ , suggesting that NOD1 as well as NOD2 signals augment the Th1 polarization induced by various TLR signals [108]. The essence of these interactions involves cooperation of signaling pathways, characteristic for activated PRRs. For example, the combination of NOD2 and TLR2 agonists decreases the production of IL-12p70 by DCs. In contrast, co-ligation of NOD2 and TLR7/8 is followed by increased production of this cytokine. These findings suggest that signal transduction pathways upon the NOD1 and NOD2 engagement are different [109]. Simultaneous engagement of TLRs and NALPs also promote characteristic activating pathways. Thus, NALP3 activation raises caspase-1 with the cleavage of pro-IL-1 β and pro-IL-18. Nevertheless, co-ligation between TLR7/8 and NALP3 seems to be necessary for full production of inflammatory cytokines in response to *influenza virus* [110]. It is not quite clear how NODs and TLRs activate synergistically the production of inflammatory cytokines. Since both receptors activate NF- κ B, it can be postulated that simultaneous engagement of the receptors triggers stronger activation of NF- κ B. However, there are other reports suggesting that the enhanced NF- κ B activation is only an additive mechanism and as such unable to explain the synergy in cytokine production. It is assumed that the receptors induce different NF- κ B isoforms or alter the kinetics of NF- κ B activation, sufficient for synergistic results [5].

To date, there are not many studies facing the pathways of TLRs and RLRs co-ligation. Interactions between RLRs (recognizing viral RNA) and TLR3, TLR7 and TLR9 (recognizing viral dsRNA, ssRNA and DNA, respectively) expressed by human MoDCs are best studied [24]. Activation of either TLR or RLR signaling, or both, is required for adequate immune response against viruses. This largely depends on the type of viruses and probably the route of infection, but also of activated signaling pathway. It has

been shown that upon recognition of viral nucleic acid sequences, TLRs and RLRs recruit specific adaptor proteins to activate signaling pathways involving NF- κ B, MAP kinases and IRFs that control the transcription of genes encoding type I IFN and other inflammatory cytokines, important for eliminating viruses [24].

Co-ligation strategy to improve immunogenicity of DCs for therapy

The considerable progress made in the knowledge of DC biology and the outcomes of signaling pathways triggered by different PRRs opens the new opportunities for design of improved clinical protocols. Owing to their capacity to regulate immunity and tolerance, DCs are the attractive candidates to be used as cancer vaccines [111]. The aim of cancer immunotherapy is the elicitation of the immune responses that will overcome the suppression caused by cancer cells, which develop various mechanisms to escape immune surveillance. It should be stated that the immune response relies heavily on the immune-stimulatory capacity of DC subsets being used and the choice of maturation stimuli [112].

A key challenge in the immunotherapeutic strategy is to optimize a maturation cocktail that will combine high yield of DCs, potent expression of maturation markers, co-stimulatory and adhesion molecules together with high production of Th cytokines crucial for the anti-tumor immune response. Active specific immunotherapy based on the injection of DCs generated and matured *ex vivo* is the most promising approach for developing the potent and long-lasting patient's immune responses against tumors. Many protocols have been developed so far, but immune tolerance to an established tumor is often the crucial factor that limits their clinical efficacy. Therefore, incomplete or incorrect maturation of DCs with tolerogenic properties can even enhance the tolerance to tumor and exacerbation of the disease [113].

Desirable anti-tumor immune response involves CTLs directed against transformed cells and key anti-tumor mediators, such as chemokines and cytokines. These include IFN- γ whose crucial role in the immune response to tumors has been confirmed [114]. Th1 cells were considered as the most important CD4⁺ T-cell subset for generating anti-tumor immunity because of their potential to potentiate the IFN- γ -dependent cytotoxic function of CD8⁺ T cells. This is the reason why studies so far have focused on the applicability of Poly (I:C)-treated MoDCs in cancer immunotherapy [115]. The role of Th17 cells in tumor immunity is still highly controversial, since a series of reports have suggested pro-tumor [116] and anti-tumor functions for IL-17 [117, 118]. Anti-tumor effects of Th17

cells are attributed to their capability to enhance inflammatory responses and to increase antigen presentation by DCs, promote leukocyte homing to tumors and facilitate the CD8⁺ T-cell priming and differentiation of these cells into effector CTLs [118].

In order to achieve these goals, we co-stimulated MoDCs with different combinations of PRR agonists, including TLR3/TLR7 and TLR3/Dectin-1, and used nanoparticles as carriers for PRR agonists. We showed that all these approaches were superior in triggering Th1 and Th17 responses, compared to the effect of individual agonists or agonist without carriers. In this context, the engagement of TLR7 by using guanosine analogues, which are nontoxic even at very high concentrations [61], could be a new strategy to improve DC immunogenicity and tumor immunotherapy.

Acknowledgments This work was supported by the grant of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (project number 175102).

References

- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245–52.
- Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:975–1028.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296:298–300.
- Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:77–84.
- Underhill DM. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev*. 2007;219: 75–87.
- Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*. 2010; 2:37–56.
- Pilsbury LE, Allen RL, Vordermeier M. Modulation of Toll-like receptor activity by leukocyte Ig-like receptors and their effects during bacterial infection. *Mediat Inflamm*. 2010. doi:10.1155/2010/536478.
- Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunol*. 2007;26:741–50.
- Simon T, Fonteneau JF, Gregoire M. Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions. *Immunotherapy*. 2009;1: 289–302.
- Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devillard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin + dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 2007;204:3119–31.
- Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, Davoust J. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med*. 2002;196: 417–30.
- Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:935–47.
- Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17:313–8.
- Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J, Kissenpfennig A, Malissen B, Grisotto M, Snoeck H, Randolph G, Merad M. Blood-derived dermal langerin + dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007;204:3133–46.
- Rajkovic I, Dragicevic A, Vasilijic S, Bozic B, Dzopalic T, Tomic S, Majstorovic I, Vucevic D, Djokic J, Balint B, Colic M. Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans-like cells. *Immunology*. 2010;132:217–25.
- Villablanca EJ, Mora JR. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol*. 2008;38: 2975–80.
- Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol*. 2002;63:1156–63.
- 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;179:1109–18.
- Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2003;134:63–9.
- Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*. 1998; 187:961–6.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373–84.
- Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:185–214.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5:987–95.
- Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21:317–37.
- Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans*. 2000;28:563–6.
- Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer. *J Clin Invest*. 2007;117:1130–6.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863–9.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.
- Wetzler LM. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine*. 2003;21(Suppl 2):S55–60.
- Kokkinopoulos I, Jordan WJ, Ritter MA. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Mol Immunol*. 2005;42:957–68.
- Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:3107–15.
- Wei WC, Su YH, Chen SS, Sheu JH, Yang NS. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine*. 2011;55:79–89.

33. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, Batoni G, Esin S, Winkler-Pickett RT, Consolaro MR, De Marchi M, Giachino D, Robbiano A, Astegiano M, Sambataro A, Kastelein RA, Carra G, Trinchieri G. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med*. 2008;205:1447–61.
34. Flacher V, Bouschbacher M, Verronese E, Massacrier C, Sisirak V, Berthier-Vergnes O, de Saint-Vis B, Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Lebecque S, Valladeau J. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol*. 2006;177:7959–67.
35. Aliahmadi E, Gramlich R, Grutzkau A, Hitzler M, Kruger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *Eur J Immunol*. 2009;39:1221–30.
36. Takeuchi J, Watari E, Shinya E, Norose Y, Matsumoto M, Seya T, Sugita M, Kawana S, Takahashi H. Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:674–9.
37. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*. 2000;165:5392–6.
38. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*. 1999;189:821–9.
39. Rouas R, Lewalle P, El Ouriaghli F, Nowak B, Duvillier H, Martiat P. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *Int Immunol*. 2004;16:767–73.
40. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol*. 1992;148:1143–8.
41. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000;14:1693–711.
42. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009;39:2076–82.
43. Renn CN, Sanchez DJ, Ochoa MT, Legaspi AJ, Oh CK, Liu PT, Krutzik SR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol*. 2006;177:298–305.
44. Furio L, Billard H, Valladeau J, Peguet-Navarro J, Berthier-Vergnes O. Poly(I:C)-Treated human langerhans cells promote the differentiation of CD4+ T cells producing IFN-gamma and IL-10. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1963–71.
45. Suzuki N, Suzuki S, Eriksson U, Hara H, Mirtosis C, Chen NJ, Wada T, Bouchard D, Hwang I, Takeda K, Fujita T, Der S, Penninger JM, Akira S, Saito T, Yeh WC. IL-1R-associated kinase 4 is required for lipopolysaccharide-induced activation of APC. *J Immunol*. 2003;171:6065–71.
46. Colic M, Mojsilovic S, Pavlovic B, Vucicevic D, Majstorovic I, Bufan B, Stojic-Vukanic Z, Vasilijic S, Vucevic D, Gasic S, Balint B. Comparison of two different protocols for the induction of maturation of human dendritic cells in vitro. *Vojnosanit Pregl*. 2004;61:471–8.
47. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:437–57.
48. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogue C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050–9.
49. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:293–307.
50. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166:249–55.
51. Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170:5165–75.
52. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*. 2008;9:769–76.
53. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303:1529–31.
54. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6646–51.
55. Duraisingham SS, Hornig J, Gotch F, Patterson S. TLR-stimulated CD34 stem cell-derived human skin-like and monocyte-derived dendritic cells fail to induce Th17 polarization of naive T cells but do stimulate Th1 and Th17 memory responses. *J Immunol*. 2009;183:2242–51.
56. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 2009;182:3372–9.
57. Severa M, Remoli ME, Giacomini E, Annibaldi V, Gafa V, Lande R, Tomai M, Salvetti M, Coccia EM. Sensitization to TLR7 agonist in IFN-beta-preactivated dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:6208–16.
58. Zhu KJ, Cen JP, Lou JX, Wang Q, Zhang X, Xu Y, Chen XZ, Cheng H. Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2009;9:412–7.
59. Dzopalic T, Dragicevic A, Vasilijic S, Vucevic D, Majstorovic I, Bozic B, Balint B, Colic M. Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1- and Th-17-polarizing capability. *Int Immunopharmacol*. 2010;10:1428–33.
60. Colic M, Gasic S, Vasilijic S, Pejanovic V, Jandric D, Medic-Mijacevic L, Rakic L. A nucleoside analogue, 7-thia-8-oxoguanosine stimulates proliferation of thymocytes in vitro. *Immunol Lett*. 1999;69:293–300.
61. Colic M, Gasic S, Vucevic D, Pavicic L, Popovic P, Jandric D, Medic-Mijacevic L, Rakic L. Modulatory effect of 7-thia-8-oxoguanosine on proliferation of rat thymocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *Int J Immunopharmacol*. 2000;22:203–12.
62. Vukovic G, Tomic S, Marinkovic A, Radmilovic V, Uskokovic P, Colic M. The response of peritoneal macrophages to dapsone covalently attached on the surface of carbon nanotubes. *Carbon*. 2010;48:3066–78.
63. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408:740–5.

64. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002;168:4531–7.
65. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol.* 2001;31:3026–37.
66. Hoene V, Peiser M, Wanner R. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol.* 2006;80:1328–36.
67. Beutler E, Gelbart T, West C. Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:728–30.
68. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin HS, Valentine C, Hellman J. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol.* 2007;178:1164–71.
69. Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D, Williams BR. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res.* 2004;64:5850–60.
70. Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6:769–76.
71. Makela SM, Strengell M, Pietila TE, Osterlund P, Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2009;85:664–72.
72. Bohnenkamp HR, Papazisis KT, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses. *Cell Immunol.* 2007;247:72–84.
73. Wenink MH, Santeogoets KC, Broen JC, van Bon L, Abdollahi-Roodsaz S, Popa C, Huijbens R, Remijn T, Lubberts E, van Riel PL, van den Berg WB, Radstake TR. TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J Immunol.* 2009;183:6960–70.
74. Dragicevic A, Dzopalic T, Vasilijic S, Vucevic D, Bozic B, Majstorovic I, Balint B, Colic M. The influence of CD40 ligation and interferon-gamma on functional properties of human monocyte-derived dendritic cells activated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Vojnosanit Pregl.* 2011;68:301–8.
75. Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol.* 2006;177:7579–87.
76. Yu CF, Peng WM, Oldenburg J, Hoch J, Bieber T, Limmer A, Hartmann G, Barchet W, Eis-Hubinger AM, Novak N. Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol.* 2010;184:1159–67.
77. Molle C, Nguyen M, Flamand V, Renneson J, Trottein F, De Wit D, Willems F, Goldman M, Goriely S. IL-27 synthesis induced by TLR ligation critically depends on IFN regulatory factor 3. *J Immunol.* 2007;178:7607–15.
78. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol.* 2006;177:5377–85.
79. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:15047–52.
80. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:353–89.
81. Zhu Q, Egelston C, Vivekanandhan A, Uematsu S, Akira S, Klinman DM, Belyakov IM, Berzofsky JA. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16260–5.
82. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005;272:6179–217.
83. Kanazawa N, Okazaki T, Nishimura H, Tashiro K, Inaba K, Miyachi Y. DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Invest Dermatol.* 2002;118:261–6.
84. Kanazawa N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci.* 2007;45:77–86.
85. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:465–79.
86. Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol.* 2007;82:253–8.
87. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R 3rd, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.* 2000;275:20157–67.
88. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:33–43.
89. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002;169:3876–82.
90. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, Reis e Sousa C. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007;8:630–8.
91. Skrzypek F, Cenci E, Pietrella D, Rachini A, Bistoni F, Vecchiarelli A. Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to *Candida albicans* through Syk activation. *Microbes Infect.* 2009;11:661–70.
92. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vliet M, Wevers B, Bruijns SC, Geijtenbeek TB. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 2009;10:203–13.
93. Kanazawa N, Tashiro K, Miyachi Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology.* 2004;209:179–90.
94. Fernandes MJ, Finnegan AA, Siracusa LD, Brenner C, Iscove NN, Calabretta B. Characterization of a novel receptor that maps near the natural killer gene complex: demonstration of carbohydrate binding and expression in hematopoietic cells. *Cancer Res.* 1999;59:2709–17.
95. Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD Jr, Ariizumi K. Dectin-2 is

- a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*. 2006;281:38854–66.
96. de Fougerolles AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med*. 1992;175:185–90.
 97. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmeik B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*. 2003;197:7–17.
 98. de Jong MA, Vriend LE, Theelen B, Taylor ME, Fluitsma D, Boekhout T, Geijtenbeek TB. C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Mol Immunol*. 2010;47:1216–25.
 99. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000;12:71–81.
 100. de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, Piguet V, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*. 2007;13:367–71.
 101. Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, Yoshida H, Kimura Y, Kang YS, Steinman RM, Park CG, Inaba K. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin C-type lectins. *Int Immunol*. 2004;16:819–29.
 102. Dzionek A, Sohna Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001;194:1823–34.
 103. Meyer-Wentrup F, Cambi A, Joosten B, Looman MW, de Vries IJ, Figdor CG, Adema GJ. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol*. 2009;85:518–25.
 104. Chen L, Arora M, Yarlagadda M, Oriss TB, Krishnamoorthy N, Ray A, Ray P. Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *J Immunol*. 2006;177:2373–83.
 105. Bates EE, Fournier N, Garcia E, Valladeau J, Durand I, Pin JJ, Zurawski SM, Patel S, Abrams JS, Lebecque S, Garrone P, Saeland S. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol*. 1999;163:1973–83.
 106. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006;27:352–7.
 107. Fritz JH, Girardin SE. How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *J Endotoxin Res*. 2005;11:390–4.
 108. Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*. 2005;73:7967–76.
 109. Watanabe T, Kitani A, Strober W. NOD2 regulation of Toll-like receptor responses and the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2005;54:1515–8.
 110. Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Nunez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. 2006;440:233–6.
 111. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007;220:129–50.
 112. Hovden AO, Karlsen M, Jonsson R, Aarstad HJ, Appel S. Maturation of monocyte derived dendritic cells with OK432 boosts IL-12p70 secretion and conveys strong T-cell responses. *BMC Immunol*. 2011;12:2.
 113. McIlroy D, Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother*. 2003;52:583–91.
 114. Ikeda Y, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoeediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:95–109.
 115. Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;46(Suppl):S52–61.
 116. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 2009;114:1141–9.
 117. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC, Restifo NP. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008;112:362–73.
 118. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, Hwu P, Restifo NP, Overwijk WW, Dong C. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009;31:787–98.

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Ivan M. Rajković je rođen 23. januara 1975. godine u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu je upisao 1993. godine a diplomirao 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,29. Nakon dve godine rada u opštoj medicinskoj praksi, upisao je doktorske studije na smeru Molekularne medicine 2008. godine. Praktični deo doktorske disertacije uradio je u Institutu za Medicinska istraživanja VMA. Zaposlen je po ugovoru kao saradnik u nastavi na predmetu fiziologija Medicinskog fakulteta VMA Univerziteta odbrane u Beogradu od 2011. godine. Angažovan je na projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije: „Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u imunoterapiji tumora“ čiji je rukovodilac akademik prof. dr Miodrag Čolić, i projektu Ministarstva odbrane Republike Srbije: „Funkcionalni aspekti modulacije imunogenih i tolerogenih svojstava dendritskih ćelija“ koji se realizuje na Medicinskom fakultetu VMA, čiji je rukovodilac docent dr Saša Vasilijić.

Ivan M. Rajković je do sada bio autor ili koautor četiri naučne publikacije u časopisima međunarodnog značaja, kao i šest saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i pet saopštenja na skupovima nacionalnog značaja iz uže naučne oblasti. Na Svetskom kongresu iz imunologije u Milanu 2013. godine imao je usmeno izlaganje u okviru teme: „Receptori za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena“, pod nazivom: „Kolidacija agonista TLR-3 i dectin-1 pojačava sposobnost Langerhansovih ćelija monocitnog porekla da indukuju Th1 imunski odgovor *in vitro*.“

10. IZJAVE

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Иван Рајковић

број индекса: 08-DS-MM-07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Модулација диференцијације и функције хуманих Лангерхансових ћелија моноцитног порекла in vitro

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.03.2015.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: др Иван Рајковић

Број индекса: 08-DS-MM-07

Студијски програм: Молекуларна медицина

Наслов рада: **Модулација диференцијације и функције хуманих
Лангерхансових ћелија моноцитног порекла *in vitro***

Ментор: проф. др Владимир Трајковић

Потписани: др Иван Рајковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 16.03.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Модулација диференцијације и функције хуманих Лангерхансових ћелија моноцитног порекла in vitro

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

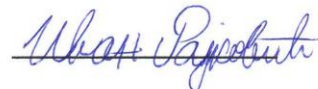
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 16.03. 2015.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.