

Pregledni prispevek/Review article

LASTNOSTI IN MOŽNOSTI UPORABE DENDRITIČNIH CELIC, ANTIGENSKO SPECIFIČNIH MODULATORJEV IMUNSKEGA ODZIVA

CHARACTERISTICS AND POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATIONS OF DENDRITIC
CELLS, ANTIGEN SPECIFIC MODULATORS OF IMMUNE RESPONSES

Urška Repnik, Martina Bergant, Matjaž Jeras

Center za tipizacijo tkiv, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-15; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 69-72

Ključne besede: dendritične celice; predstavljanje antigenov; aktivacija limfocitov T

Izvleček – Izhodišča. Od prvega odkritja dendritičnih celic (DC) pred 30 leti so pri miši in človeku osamili številne vrste DC ter razvili tudi postopke za njihovo pripravo in vitro. Med osnovne značilnosti omenjenih celic sodijo: izražanje velikega števila molekul MHC razreda II na njihovi površini; privzemanje, predelava in predstavljanje antigenov; potovanje skozi tkiva in tesno sodelovanje z limfociti. Sprva so jim pripisovali le vlogo pri spodbujanju proliferacije limfocitov T in nastanka citotoksičnih limfocitov T. Danes pa poznamo tudi takšne DC, ki sodelujejo pri vzdrževanju tolerance za lastne antigene. Za obrambo telesa pred patogenimi organizmi so ključne Langerhansove celice ter dermalne ali intersticijske DC, ki naseljujejo periferna tkiva. Tam privzemajo antigene, nato pa se preselijo v sekundarne limfne organe, kjer jih ponujajo v prepoznavo limfocitom T. Če so v tkivih prisotne molekule, značilne za vnetje ali okužbo, začnejo DC na svojih površinah izražati kostimulacijske molekule ter izdelovati citokine. S tem DC ne le sprožijo nastanek imunskega odziva, temveč tudi vplivajo na njegove lastnosti in krojijo njegove efektorske mehanizme.

Zaključki. Za ne tako oddaljeno prihodnost načrtujejo, da bodo lahko z DC diferenciranimi ex vivo ter opremljenimi s poljubnimi antigeni, zdravili raka in avtoimunske bolezni ter preprečevali neželene zavrnitvene reakcije po presaditvah tkiv in organov.

Uvod

Za obrambo organizma pred škodljivimi vplivi okolja obstajata dva sistema: naravna odpornost in imunski sistem. Za slednjega je značilno, da je specifičen, kar pomeni, da lahko razlikuje med telesu lastnimi in tujimi molekulami ter ima spomin in se zato lahko ob naslednjih srečanjih z enakim antigenom odzove bistveno hitreje in s tem tudi učinkoviteje. Osrednje celice imunskega sistema so limfociti T in limfociti B, ki posredujejo celično oziroma humoralno imunost. Vendar za svojo aktivacijo potrebujejo pomoč drugih celic. Limfocite T lahko aktivirajo le antigeni predstavljaajoče celice (APC). Tako aktivirani

Key words: dendritic cells; antigen presentation; T cell activation

Abstract – Background. Since the discovery of dendritic cells (DC) more than 30 years ago, several types of DC have been isolated in mouse and human and methods for their in vitro generation have been developed. Their general characteristics are, the extensive expression of MHC class II molecules on their cell surfaces, the ability to take up, process and present antigens, selective migration through tissues and interaction with lymphocytes. Once they were reknown for their stimulatory role in T cell proliferation and CTL generation but tolerogenic types have since been described which contribute to the maintenance of tolerance to self antigens. Crucial for the defence against pathogens are Langerhans cells and dermal or interstitial DC that reside in the peripheral tissues and take up antigens. Then they migrate to lymph nodes or spleen and present the antigens to T cells. If infectious or inflammatory signals/factors are present in the periphery, DC begin to express costimulatory molecules and secrete cytokines which enable them to trigger immune response, and in addition, influence its characteristics and shape the effector mechanisms.

Conclusions. There is a great hope that in the near future ex vivo differentiated DC, equipped with selected antigens could be used for the treatment of cancer, autoimmune diseases and for the prevention of rejections following tissue and organ transplantations.

limfociti T pa potem pomagajo pri aktivaciji in dozorevanju limfocitov B. Aktivacija limfocitov T je torej prelomni dogodek v nastanku imunskega odziva in je zato kompleksen proces s številnimi varovalnimi mehanizmi, še posebej ob prvem srečanju z določenim antigenom. Za aktivacijo limfocitov T sta potrebna dva signala. Prvega zagotavlja vezava med antigen-sko specifičnimi receptorji na limfocitih T (TCR) in kompleksi antigen-skih peptidov ter molekul MHC (Major Histocompatibility Complex), izraženimi na APC. Drugi signal pa sproži vezava med kostimulacijskimi molekulami (CD80, CD86), prisotnimi na APC, ter ustreznimi ligandi (npr. CD28) na limfocitih T. Le profesionalne APC, to so dendritične celice (DC),

makrofagi in limfociti B, izražajo takšne kostimulacijske molekule. Med vsemi naštetimi pa imajo prav DC največjo zmožnost aktivacije limfocitov T in so morda edine APC, ki lahko aktivirajo limfocite T ob njihovem prvem srečanju z antigenom (1). V tem kontekstu lahko razumemo tudi enega od številnih nadimkov DC – »glavno poveljstvo imunskega odziva«. DC so tudi »stražarji« telesa, saj na periferiji vzorčijo antigene, ki so prisotni v tkivih, ter »kurirji«, ki informacije o naravi antigena, o njegovem patogenem potencialu in o značilnostih naravne obrambe prenašajo v sekundarne limfne organe. Neaktivirani limfociti T ne vstopajo v periferna tkiva, zato pa stalno krožijo prav skozi sekundarne limfatične organe in ob pregledovanju DC, ki so tja pripotovali iz periferije, pridobijo informacije o dogajanju v telesu.

Odkritje dendritičnih celic

DC so pravzaprav odkrili dvakrat. Leta 1868 je Paul Langerhans opisal celice s številnimi izrastki, ki so prisotne v epidermisu kože. Ker jih je odkril s tehniko napraševanje zlatovega klorida, ki so jo tedaj uporabljali za označevanje živčnih celic, so dolga leta verjeli, da so Langerhansove celice pravzaprav celice živčnega sistema (2). Njihovo pravo naravo so dognali šele leta 1985 (3). Pot k temu sta leta 1973 utrla Ralph Steinman in Zanvil A. Cohn (4–6). Med preučevanjem začetka imunskega odziva v mišji vranici sta naletela na majhno populacijo celic z nenavadno obliko. Zaradi drevesastih izrastkov jih je Steinman poimenoval dendritične celice (DC). Kmalu je ugotovil, da je med njimi in do tedaj že kar dobro znanimi makrofagi veliko pomembnih razlik. Med drugim imajo manj lizosomov, na stopnji končne diferenciacije pa slabo fagocitirajo in ne vsebujejo številnih encimov, ki so značilni za makrofage. Šele leta 1978 je Steinman s sod. razvil postopke, s katerimi so osamili tovrstne celice v zadostnem številu, da so lahko potem izvedli funkcijske teste *in vitro* (7). Slednji so jasno pokazali, da DC lahko izzovejo daleč najmočnejši proliferacijski odziv limfocitov T. V začetku 80. so podobne celice odkrili tudi pri človeku. Šele desetletje kasneje pa so uspeli razviti postopke za pripravo velikega števila DC iz njihovih predhodnikov v pogojih *in vitro* (8–9). S tem se je začela doba njihovega intenzivnega preučevanja, ki je prinesla veliko odgovorov in postala še več novih vprašanj.

Raznovrstnost DC

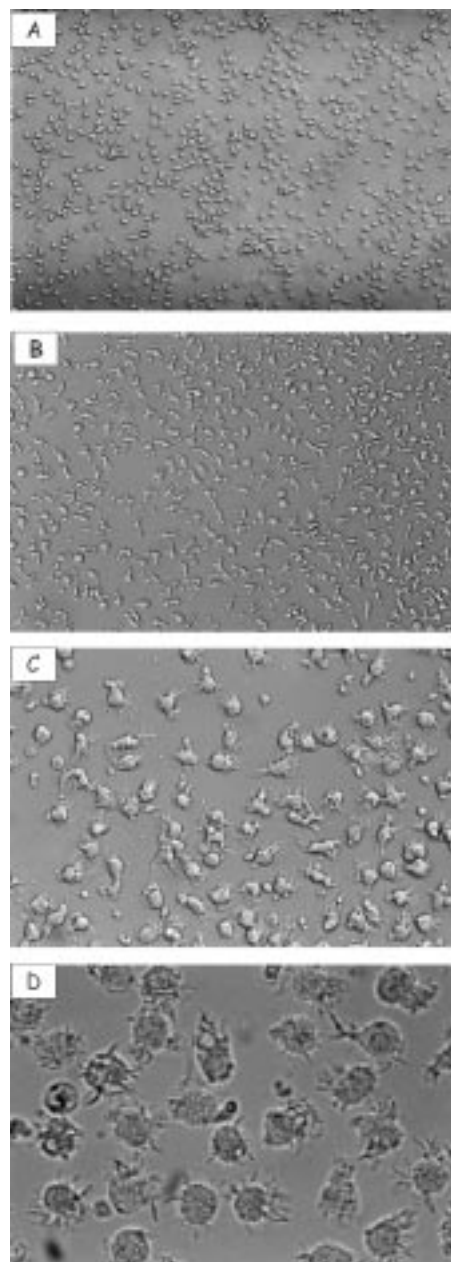
Danes je jasno predvsem to, da so DC zelo raznolika celična populacija. Združujejo jih podobne morfološke lastnosti, konstitutivno izražanje molekul HLA-DR, potovanje skozi tkiva in interakcija z limfociti T, B ter celicami NK (10).

Njihova raznolikost je po obsegu pri miši in človeku podobna. Posameznih vrst DC pri obeh vrstah zaradi številnih razlik ni mogoče neposredno primerjati. Osnova za opisovanje različnih vrst DC so značilne površinske molekule (molekule MHC, kostimulacijske, adhezijske in receptorske molekule), citokini, ki jih izločajo ter lastnosti imunskega odziva, ki ga izzovejo. Ni pa še jasno, v kolikšni meri so različne že opisane vrste DC posledica njihovega različnega izvora, oziroma kolikšen je vpliv mikrookolja na diferenciacijo DC iz istega izvora. Razvojnim potem DC še ne moremo slediti na kraju samem. Dosedaj opisane vrste DC so značilne za posamezna tkiva, medtem ko sorodnost med vrstami DC, ki so jih našli v različnih tkivih, pogosto ostaja nejasna (10).

V človeški krvi jih najdemo v zelo majhni populaciji celic, ki izražajo molekule HLA-DR in nobene od značilnih površinskih molekul celičnih vrst CD3, CD15, CD16, CD56, CD19, CD20 in CD14, ki so značilni za ostale levkocite. Na osnovi značilnih površinskih molekul so opisali tri vrste DC. Prve naj bi bile zgodnejše, predniške oblike DC. Drugi dve vrsti pa naj bi ustrezali t. i. mi-

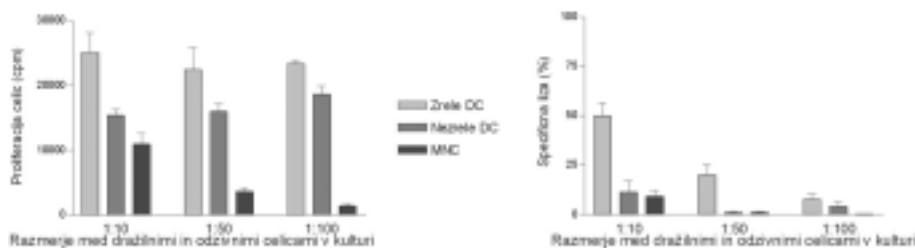
eloidnim in plazmacitoidnim DC, ki se med drugim med seboj razlikujeta po receptorjih TLR (Toll-Like Receptors), izraženih na celični površini. Tudi funkcijsko sta obe vrsti različni, saj sodelujeta v imunskih odzivih, ki so usmerjeni proti različnim patogenom. Mieloidne DC naj bi sodelovale v imunskih odzivih proti bakterijam, plazmacitoidne pa proti virusom (10).

V perifernih tkivih razlikujejo dve glavni vrsti DC. V epidermisu kože, sluznici črevesja, sečil in dihal najdemo Langerhansove celice, v dermisu kože ter v intersticiju večine drugih organov pa so prisotne t.i. dermalne ali intersticijske neepitelijske DC. Za razliko od Langerhansovih celic slednje ne izražajo langerina in nimajo Birbekovih granul (10).



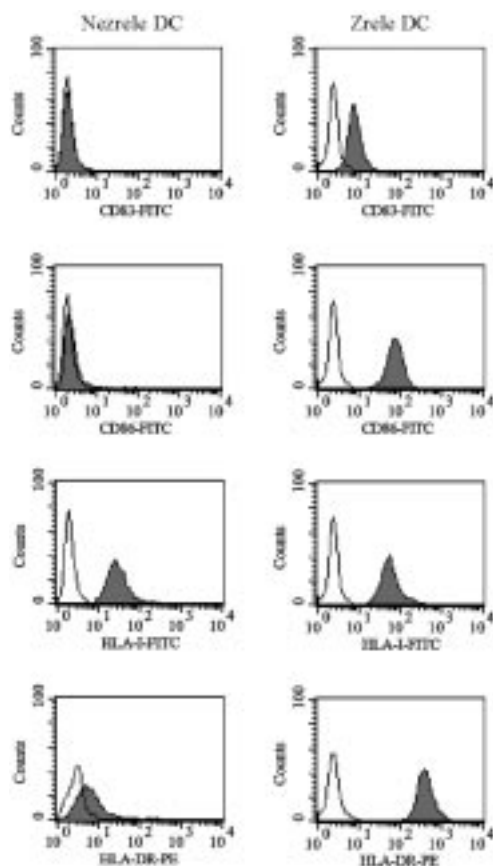
Sl. 1. Mikroskopske slike celičnih kultur: (A) Monociti (objektiv 10-krat); (B) Nezrele DC (objektiv 10-krat); (C) Zrele DC z značilnimi izrastki (objektiv 20-krat); (D) Zrele DC (objektiv 40-krat). DC – dendritične celice.

Figure 1. Microphotographs of cell cultures: (A) Monocytes (10× ex-objective); (B) Immature DC (10 × ex-objective); (C) Mature DC with characteristic extensions (20 × ex-objective); (D) Mature DC (40 × ex-objective). DC – dendritic cells.



Sl. 2. Primerjava primarnega proliferacijskega odziva limfocitov T (levo) in nastanka citotoksičnih limfocitov T (desno) v kulturah zrelih in nezrelih DC ali MNC (dražilne celice) in alogenskih limfocitov T (odzivne celice). Za pripravo zrelih DC smo nezrele DC za 12 ur prenesli v gojišče z LPS (20 ng/mL). DC – dendritične celice; MNC – mononuklearne celice.

Figure 2. Comparison of primary proliferative T cell response (left) and cytotoxic T cell generation (right) in cultures of mature and immature DC or MNC (stimulatory cells) and allogeneic T cells (responder cells). Mature DC were prepared by 12-hour exposure to LPS (20 ng/mL). DC – dendritic cells; MNC – mononuclear cells.



Sl. 3. Primerjava izražanja površinskih označevalcev CD83, CD86 (kostimulacijske molekule) ter molekul HLA razreda I in II (DR) molekule na nezrelih in zrelih DC, pripravljenih iz monocitov *in vitro*. Neosenčeni vrhovi prikazujejo nespecifično vezavo protiteles. DC – dendritične celice.

Figure 3. Comparison of the expression of surface markers CD83, CD86 (costimulatory molecules) and HLA class I and II (DR) molecules on immature and mature DC, differentiated *in vitro* from monocytes. The black line indicates the binding of isotype-matched, irrelevant control antibodies. DC – dendritic cells.

V sekundarnih limfatičnih organih so pri človeku opisali pet fenotipsko različnih vrst DC, v priželjcu pa naj bi obstajali vsaj dve vrsti DC (10).

Izvor DC še ni v celoti pojasnjen. Iz krvotvorne pluripotentne matične celice (CD34+) v kostnem mozgu se razvija multipotentna matična celica limfoidne vrste in multipotentna matična celica mieloidne vrste. Iz prve naj bi se nato razvile plazmacitoidne DC, iz druge pa Langerhansove celice ter intersticijske ali dermalne DC (11). Limfatičnega izvora so tudi DC v priželjcu, ki sodelujejo v procesih vzpostavljanja centralne tolerance. O monocitih kot možnih predhodnikih DC *in situ* obstajata dve hipotezi. Po prvi naj bi se v DC lahko razvil le tisti del monocitov, ki izraža CD16FcγR, po drugi pa naj bi bila diferenciacija monocitov v makrofage oz. v DC odvisna od vnetnih oz. infekcijskih dražljajev v okolju (12).

Priprava dendritičnih celic *in vitro* ter njihove značilnosti

Z možnostjo priprave DC v pogojih *in vitro* je njihovo raziskovanje dobilo nov zalet. Najlažje dostopni predhodniki za tovrstno pripravo so pri človeku monociti, pridobljeni iz venske krvi (13). Prav zato so lastnosti DC, pripravljenih iz monocitov, najbolj proučene. Z gojenjem monocitov v prisotnosti citokinov IL-4 in GM-CSF po 5–7 dneh dobimo nezrele DC (8–9). V primerjavi z monociti, ki na svoji površini izražajo molekule CD14, nezrele DC teh molekul ne izražajo več. Nezrele DC so bistveno večje od monocitov, po obliki pa niso več kroglaste, temveč nepravilno podolgovate (Sl. 1). Ko nezrele DC prenesemo v gojišče z vnetnimi citokini (TNF-α, IL-1β, IL-6) ali mikrobnimi produkti (LPS, bakterijski toksini, proteini virusnega plašča, ...), le-te začnejo zoreti. Zrele DC so kroglaste oblike s številnimi prstastimi izrastki – dendriti, po katerih so tudi dobile ime (Sl. 1). Medtem ko so nezrele DC prilagojene za privzemanje antigenov, pa so zrele DC specializirane za njihovo predstavljanje in aktivacijo limfocitov T. Nezrele DC imajo veliko načinov za privzemanje topnih in netopnih antigenov iz okolja, vendar pa so zlasti na kraju samem le šibki aktivatorji limfocitov T in ne izzovejo nastanka citotoksičnih limfocitov T. Zrele DC iz okolja ne privzemajo antigenov, zato pa med vsemi APC izzovejo največjo proliferacijo limfocitov T in nastanek citotoksičnih limfocitov T (Sl. 2). Analiza značilnih površinskih molekul na nezrelih in zrelih DC s pretočnim citometrom nam jasno pokaže razlog za tolikšne funkcijske razlike med obema razvojnima stopnjama (Sl. 3). Kostimulacijske molekule iz družine B7, kot sta CD86 in CD80, imajo ključno vlogo pri aktiviranju limfocitov T, saj celicam zagotavljajo signal za izdelovanje IL-2. Nezrele DC na svoji površini le šibko izražajo molekule CD80, molekul CD86 pa sploh ne. Nasprotno pa zrele DC zelo močno izražajo omenjene molekule. Podobno se med zorenjem poveča tudi izražanje molekul MHC, in sicer tako razreda I kot II. Samo za zrele DC pa je značilna tudi prisotnost molekul CD83 na njihovi površini, vendar njihova vloga še ni pojasnjena.

Vloga dendritičnih celic v telesu

DC, pripravljene iz monocitov *in vitro*, so resda mieloidnega izvora, vendar v celoti fenotipsko niso podobne nobenemu od dosedaj opisanih vrst DC v telesu. V nezreli obliki naj bi približno ustrezale mieloidnim DC tj. Langerhansovim celicam ter dermalnim ali intersticijskim DC v perifernih tkivih (14). Te celice so namreč v tkivih razporejene v nekakšno mrežo in tako prilagojene na prestrezanje antigenov. V procesih fago-

citoze, z receptorji posredovane endocitoze, makropinocitoze ter pinocitoze privzemajo netopne in topne antigene in na ta način ves čas vzorčijo antigene v svojem okolju. V zdravem tkivu niso izpostavljene molekulam, ki spremljajo vnetje ali okužbo, zato ne morejo dozoreti. Kljub temu pa spremenijo nabor kemokinskih receptorjev na svoji površini, kar jim omogoča, da po limfi zapustijo periferna tkiva in se naselijo v sekundarnih limfatičnih organih, kjer limfocitom T lahko predstavijo na periferiji privzete antigene. Ker takšne DC ne izražajo kostimulacijskih molekul, povzročajo nastanek regulacijskih ali anergičnih limfocitov T in na ta način prispevajo k vzdrževanju periferne tolerance. V primeru okužbe ali vnetja pa DC v perifernih tkivih začnejo zoreti. Prenehajo privzemati antigene iz okolja, povečajo pa izražanje kompleksov MHC-antigen-ski peptid ter kostimulacijskih molekul. Tudi te DC po limfi potujejo v sekundarne limfatične organe (12). Zrele DC, pripravljene iz monocitov *in vitro*, vsaj približno ustrezajo takšnim zrelim DC v sekundarnih limfatičnih organih (14).

DC torej prenašajo informacije o razmerah na periferiji do limfocitov T, ki so v sekundarnih limfatičnih organih. Vsako sporočilo ima vsaj tri bistvene elemente. Prvega predstavlja kratek peptid v kompleksu s molekulam MHC in je molekularni zapis o antigenu, ki sporoča njegovo identiteto. Drugi element sporoča patogeni potencial antigena in se kaže v prisotnosti kostimulacijskih molekul na površini DC. Prvi in drugi element zadostujeta za aktivacijo naivnih limfocitov T in za začetek njihove proliferacije. DC pa niso le spodbujevalci proliferacije limfocitov T, temveč vplivajo tudi na njihovo diferenciacijo, s čimer začitajo značilnosti nastajajočega imunskega odziva. Prav to pa je bistvo tretjega elementa. V njegovi vlogi najpogostejše nastopajo citokini, ki vplivajo na diferenciacijo limfocitov v smeri odziva Th1 ali Th2, ključen med njimi pa je IL-12. V poskusih *in vitro* so namreč dokazali, da z različnimi aktivatorji zorenja DC in/ali različnimi citokini ter drugimi topnimi molekulami lahko pripravimo takšne zrele DC, ki zelo močno aktivirajo proliferacijo limfocitov T. Vendar se bistveno razlikujejo v zmožnosti izdelovanja IL-12. Na izdelovanje IL-12 v DC in situ vplivajo dejavniki v perifernih tkivih, in sicer izključno na začetku njihovega zorenja. Med tovrstne dejavnike sodijo molekule patogenega izvora ter molekule, ki jih telesne celice sproščajo kot del naravne obrambe. Med slednjimi sta najboljše preučena IFN- γ , ki izdelovanje IL-12 spodbuja, ter PGE $_2$, ki ga zavira (15).

Mnogi patogeni organizmi, med njimi npr. zajedalec *Plasmodium* in virus HIV, proti katerim imunski odziv ni uspešen, lahko vplivajo na funkcijo DC največkrat tako, da onemogočijo njihovo zorenje, lahko pa povzročijo celo nastanek tolerogenih DC, ki nato aktivno zavirajo nastanek imunskega odziva. Tudi tumorske celice lahko podobno vplivajo na DC (14).

Dendritične celice kot terapevtsko orodje

Ker DC zavzemajo osrednje mesto v obrambi organizma, so zanimive tudi kot mesto delovanja različnih farmacevtskih učinkovin, s katerimi bi lahko *in situ* modulirali njihove lastnosti. Vsaj zaenkrat pa se zdi enostavnejše prikrivanje lastnosti DC pripravljenih *ex vivo* ter vnos tako pripravljenih celic v bolnika. Prednost imunskega zdravljenja z DC je antigensko specifična modulacija imunskega odziva, saj s posebnimi tehnikami lahko dosežemo, da DC na svoji površini predstavljajo natančno določene antigene. V prihodnje bo slika o razvojnih vrstah DC verjetno postala jasnejša. Že danes pa je fenotipska raznolikost DC, ki jo lahko dosežemo z različnimi načini njihove diferenciacije, izjemna. Poleg DC, ki izzovejo nastanek različnih vrst imunskega odziva, znamo danes pripraviti tudi tolerogene DC, ki imunski odziv zavirajo. S tem se odpirajo široke možnosti zdravljenja ne le infektivnih bolezni in raka, pač pa tudi avtoimunskih bolezni ter preprečevanja zavračanja presadka. Pred raziskovalci DC je zahtevno in zanimivo obdobje ter upanje, da bomo s pomočjo DC nekoč lahko zdravili danes neozdravljive bolezni.

Literatura

1. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed. New York: Garland Publishing, 2001: 294-340.
2. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. AMPIS 2003; 111: 725-40.
3. Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells *in vitro*. J Exp Med 1985; 161: 526-46.
4. Steinman RM in Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 1973; 137: 1142-62.
5. Steinman RM in Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vitro*. J Exp Med 1974; 139: 380-97.
6. Steinman RM in Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties *in vivo*. J Exp Med 1974; 139: 1431-5.
7. Steinman RM in Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. Proc Natl Acad sci, 1978; 75: 5132-6.
8. Romani N, Gruner S, Brang D et al. Proliferating dendritic cells progenitors in human blood. J Exp Med 1994; 180: 83-93.
9. 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.
10. Hart DNJ, MacDonald K, Vuckovic S, Clark GJ. Phenotypic characterization of dendritic cells. Dendritic Cells. Biology and clinical applications. 2nd ed. London: Academic Press, 2001.
11. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell 2001; 106: 259-62.
12. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. AMPIS 2003; 111: 675-97.
13. Repnik U, Knezevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. JIM 2003; 278: 283-92.
14. Austyn JM. Dendritic cells - new therapeutic targets. Isis News 2001; 34: 2-4.
15. Kalinski P, Hilgert CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunology Today 1999; 20: 561-7.