

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. L. HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



## ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Natalia Anger-Góra

**Wpływ redukcji stężenia interleukiny 10 w mikrośrodowisku  
nowotworowym na skuteczność terapii z udziałem  
cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych stosowanej  
w modelu mysiego raka jelita grubego MC38**

PROMOTOR  
dr hab. Joanna Rossowska

Wrocław 2020

---

*Składam serdeczne podziękowania Pani Profesor Joannie Rossowskiej  
za wysiłek włożony w rozwój moich umiejętności naukowych,  
za zaangażowanie i opiekę podczas mojej pracy badawczej oraz  
za cierpliwość i nieocenioną pomoc w przygotowaniu niniejszej rozprawy.*

*Pani Profesor Elżbiecie Pajtasz-Piaseckiej składam podziękowania  
za wszelką pomoc i dzielenie się opiniami, które kierowały  
moje myślenie na nowe tory i otwierały przede mną szersze perspektywy.*

*Podziękowania kieruję również do moich Koleżanek  
Jagody Mierzejewskiej, Agnieszki Szczygieł oraz Katarzyny Węgierek.  
Ich zaangażowanie, pomoc i życzliwość były bezcenne na każdym etapie  
realizowanej przeze mnie pracy.*

*Moim Najbliższym dziękuję za wyrozumiałość,  
wiarę w moje możliwości i ogromne wsparcie.*

---

---

**Badania były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki w ramach następujących projektów grantowych:**

„Zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej genetycznie modyfikowanych komórek dendrytycznych poprzez zahamowanie ekspresji cytokin immunosupresyjnych u myszy obciążonych nowotworem”

MNiSW, nr projektu: N N401 316239, kierownik: dr hab. Joanna Rossowska, termin realizacji: 2010-2014

„Rola IL-10 w aktywacji mechanizmów supresji wykorzystywanych przez mieloidalne komórki supresorowe - czy eliminacja IL-10 ze środowiska nowotworowego przyczyni się do zwiększenia skuteczności immunoterapii?”

NCN, nr projektu: 2014/15/N/NZ4/04817, kierownik: mgr inż. Natalia Anger-Góra, termin realizacji: 2015-2019

---

---

**W ramach pracy opublikowano:**

Anger N., Rossowska J. Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego jako potencjalny cel terapii przeciwnowotworowych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2018; 72: 1179-1198

Rossowska J., Anger N., Szczygieł A., Mierzejewska J., Pajtasz-Piasecka E. Reprogramming the murine colon cancer microenvironment using lentivectors encoding shRNA against IL-10 as a component of a potent DC-based chemoimmunotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2018; 37(1):126

**W przygotowaniu:**

Anger-Góra N., Węgierek K., Szczygieł A., Mierzejewska J., Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J. Local silencing of IL-10 reduces suppressor activity of MDSCs in MC38 murine colon carcinoma microenvironment.

---

# Spis treści

Wykaz skrótów.....	9
Streszczenie.....	11
Abstract.....	12
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Rola układu odpornościowego w powstawaniu nowotworu.....</b>	<b>13</b>
1.1.1. Trzy fazy immunoedycji: eliminacja, równowaga i ucieczka.....	13
1.1.2. Rola mikrośrodowiska nowotworu w progresji choroby.....	16
1.1.2.1. Limfocyty T regulatorowe.....	17
1.1.2.2. Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego.....	17
1.1.2.3. Makrofagi związane z nowotworem.....	19
<b>1.2. Wpływ interleukiny 10 na aktywność komórek odpornościowych w mikrośrodowisku nowotworu.....</b>	<b>20</b>
1.2.1. Właściwości immunosupresorowe IL-10.....	20
1.2.2. Właściwości immunostymulujące IL-10.....	23
<b>1.3. Immunoterapia przeciwnowotworowa.....</b>	<b>24</b>
1.3.1. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii.....	25
1.3.1.1. Rola komórek dendrytycznych w indukcji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	25
1.3.1.2. Metody przygotowania szczepionek terapeutycznych zawierających komórki dendrytyczne.....	28
1.3.2. Redukcja stężenia IL-10 w TME jako element terapii przeciwnowotworowej.....	30
1.3.2.1. Interferencja RNA.....	33
1.3.2.2. Metody dostarczania siRNA.....	34
1.3.2.3. Wektory lentiwirusowe jako nośniki shRNA.....	35
1.3.3. Immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu.....	38
<b>2. Założenia i cel pracy.....</b>	<b>41</b>
<b>3. Materiały i metody.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Materiały.....</b>	<b>43</b>
3.1.1. Myszki.....	43
3.1.2. Podłoża hodowlane i czynniki wzrostowe.....	43
3.1.3. Linie komórkowe.....	44
3.1.4. Plazmidy.....	44
3.1.5. Odczynniki i płyny.....	45
3.1.6. Przeciwciała monoklonalne.....	47
<b>3.2. Metody.....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Produkcja i zagęszczanie wektorów lentiwirusowych.....	49
3.2.1.1. Produkcja wektorów lentiwirusowych.....	49
3.2.1.2. Zagęszczanie wektorów lentiwirusowych.....	49

---

3.2.1.3. Określenie miana zagęszczonych wektorów lentiwirusowych.....	49
3.2.2. Izolacja i hodowla mysich komórek szpikowych.....	50
3.2.2.1. Różnicowanie komórek szpikowych w kierunku komórek dendrytycznych..	50
3.2.2.2. Różnicowanie komórek szpikowych w kierunku komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego.....	50
3.2.3. Transdukcja BMDC i MDSC uzyskanych w warunkach <i>in vitro</i> .....	51
3.2.4. Ocena wydajności wyciszenia ekspresji IL-10 w transdukowanych BMDC i MDSC metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	52
3.2.4.1. Izolacja RNA.....	52
3.2.4.2. Pomiar stężenia RNA.....	52
3.2.4.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	52
3.2.4.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym.....	52
3.2.5. Ocena wydajności wyciszenia ekspresji IL-10 w transdukowanych BMDC i MDSC metodą ELISA.....	53
3.2.6. Określenie fenotypu powierzchniowego BMDC po transdukcji.....	53
3.2.7. Ocena zdolności transdukowanych BMDC do pierwotnej stymulacji limfocytów T.....	54
3.2.7.1. Hodowla mieszana transdukowanych BMDC i splenocytów .....	54
3.2.7.2. Określenie aktywności cytotoksycznej stymulowanych komórek śledzionowych.....	54
3.2.7.3. Ocena ekspresji cząsteczek CD107a na powierzchni komórek efektorowych.....	55
3.2.8. Określenie fenotypu powierzchniowego MDSC po transdukcji.....	55
3.2.9. Ocena aktywności supresorowej transdukowanych MDSC.....	56
3.2.9.1. Przygotowanie splenocytów znakowanych barwnikiem CFDA-SE.....	56
3.2.9.2. Prowadzenie hodowli mieszanej MDSC i znakowanych splenocytów.....	56
3.2.9.3. Ocena proliferacji splenocytów w obecności MDSC.....	57
3.2.10. Doświadczenia terapeutyczne.....	57
3.2.10.1. Wszczepienie komórek nowotworowych.....	57
3.2.10.2. Określenie efektu podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 .....	57
3.2.10.3. Określenie efektu podania cyklofosfamidu i wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10.....	58
3.2.10.4. Określenie efektu skojarzonej immunoterapii złożonej z wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych.....	58
3.2.10.5. Określenie efektu skojarzonej chemioimmunoterapii złożonej z cyklofosfamidu, wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych.....	58
3.2.11. Oznaczenie nacieków limfocytów i komórek mieloidalnych w guzach metodą cytometrii przepływowej.....	60
3.2.12. Ocena zdolności komórek wyizolowanych z guzów do produkcji IL-10.....	62
3.2.13. Izolacja komórek CD11b <sup>+</sup> z guzów pobranych od myszy .....	63
3.2.14. Ocena zdolności komórek CD11b <sup>+</sup> izolowanych z guzów do	

---

wytwarzania reaktywnych form tlenu.....	63
3.2.15. Ocena aktywności supresorowej komórek CD11b <sup>+</sup> wyizolowanych z guzów.....	63
3.2.16. Ocena fenotypu limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych wyizolowanych od myszy po terapii.....	64
3.2.17. Ocena zdolności komórek wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych do produkcji cytokin.....	65
3.2.18. Restymulacja komórek śledzionowych uzyskanych od myszy po terapii.....	65
3.2.18.1. Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek MC38.....	65
3.2.18.2. Przygotowanie komórek efektorowych, zakładanie pięciodniowej hodowli mieszanej.....	65
3.2.19. Ocena aktywności restymulowanych komórek efektorowych.....	65
3.2.20. Ocena polaryzacji śledzionowych limfocytów T.....	66
3.2.21. Analiza statystyczna .....	66
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1. Określenie skuteczności wybranych sekwencji shRNA w wyciszaniu         ekspresji IL-10.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2. Określenie aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10         w warunkach <i>in vitro</i>.....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania BMDC.....	69
4.2.2. Ocena zdolności komórek BMDC z wyciszoną ekspresją IL-10 do indukcji swoistej odpowiedzi komórkowej.....	70
4.2.3. Podsumowanie.....	73
<b>4.3. Określenie aktywności komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego         z wyciszoną ekspresją IL-10 w warunkach <i>in vitro</i>.....</b>	<b>74</b>
4.3.1. Charakterystyka MDSC uzyskanych w trakcie krótkotrwałej hodowli mysich komórek szpikowych.....	74
4.3.2. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania MDSC.....	76
4.3.3. Ocena aktywności supresorowej MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 wobec limfocytów T.....	78
4.3.4. Podsumowanie.....	81
<b>4.4. Określenie aktywności komórek układu odpornościowego po doguzowym         podaniu wektorów wyciszających ekspresję IL-10.....</b>	<b>82</b>
4.4.1. Kinetyka indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10.....	82
4.4.1.1. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 guzach MC38.....	82
4.4.1.2. Aktywność komórek układu odpornościowego w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych.....	84
Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38.....	84
Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38.....	90
Aktywność limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych.....	92
4.4.1.3. Aktywność komórek układu odpornościowego w śledzionie.....	94
4.4.2. Kinetyka indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku podania	

---

cyklofosfamidu i wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10.....	96
4.4.2.1. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach MC38.....	96
4.4.2.2. Aktywność komórek układu odpornościowego w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych.....	98
Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38.....	98
Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38.....	102
Aktywność limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych.....	103
4.4.2.3. Aktywność komórek układu odpornościowego w śledzionie.....	105
4.4.3. Podsumowanie.....	107
<b>4.5. Określenie efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających ekspresję IL-10.....</b>	<b>109</b>
4.5.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii.....	109
4.5.2. Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii.....	111
4.5.2.1. Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38.....	111
4.5.2.2. Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38.....	114
4.5.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii.....	117
4.5.4. Podsumowanie.....	119
<b>4.6. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu, komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających ekspresję IL-10.....</b>	<b>120</b>
4.6.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	120
4.6.2. Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	122
4.6.2.1. Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38.....	122
4.6.2.2. Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38.....	125
4.6.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	127
4.6.4. Podsumowanie.....	131
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>132</b>
<b>6. Wnioski.....</b>	<b>145</b>
<b>Spis rycin i tabel.....</b>	<b>146</b>
<b>Piśmiennictwo.....</b>	<b>150</b>

---



## Wykaz skrótów

**Arg1** (*arginase 1*) – arginaza 1;

**APC** (*antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen;

**ATP** (*adenosine triphosphate*) – adenozyntrifosforan;

**BMDC** (*bone marrow-derived dendritic cells*) – komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego;

**CAF** (*cancer associated fibroblasts*) – fibroblasty związane z nowotworem;

**CAR** (*chimeric antigen receptor*) – chimerowy receptor antygenowy;

**CCL** (*CC chemokine*) – chemokina CC;

**CCR** (*CC chemokine receptor*) – receptor chemokiny CC;

**CD** (*cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania;

**cDC** (*conventional DC*) – konwencjonalne DC;

**CMV** (*cytomegalovirus*) – cytomegalowirus;

**ConA** (*concanavalin A*) – konkanawalina A;

**CTL** (*cytotoxic T lymphocytes*) – limfocyty T cytotoksyczne;

**CTLA-4** (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) – antygen związany z limfocytym T cytotoksycznym;

**CY** (*cyclophosphamide*) – cyklofosfamid;

**DAMP** (*damage-associated molecular patterns*) – molekularne wzorce związane z uszkodzeniem;

**DC** (*dendritic cells*) – komórki dendrytyczne;

**dsRNA** (*double strand RNA*) – podwójna nić RNA;

**EGFP** (*enhanced green fluorescence protein*) – białko wzmocnionej zielonej fluorescencji;

**FasL** (*Fas ligand*) – ligand Fas;

**FoxP3** (*forkhead box P3*) – czynnik transkrypcyjny FoxP3;

**GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów;

**HIV-1** (*human immunodeficiency virus 1*) – ludzki wirus niedoboru odporności 1;

**HLA** (*human leukocyte antigen*) – ludzki antygen leukocytny;

**HMGB1** (*high mobility group box 1*) – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej 1;

**i.c.** (*isotype control*) – kontrola izotypowa;

**ICD** (*immunogenic cell death*) – immunogenna śmierć komórki;

**IDO** (*indolamine-2,3-dioxygenase*) – 2,3-dioksygenaza indoloaminy;

**IFN** – interferon;

**IL** (*interleukin*) – interleukina;

**i.p.** (*intraperitoneally*) – dootrzewnowo;

**i.t.** (*intratumorally*) – doguzowo;

**LAG-3** (*lymphocyte-activation gene 3*) – gen aktywacji limfocytów;

**LTR** (*long terminal repeats*) – długie terminalne powtórzenia;

**LV** (*lentivirus*) – lentiwirus;

**MAPK** (*mitogen-activated protein kinases*) – kinazy aktywowane mitogenami;

**MCA** (*methylcholanthrene*) – metylocholanren;

**MDSC** (*myeloid-derived suppressor cells*) – komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego;

**MFI** (*mean fluorescence intensity*) – średnia intensywność fluorescencji;

**MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej;

**MIC** (*MHC class I polypeptide-related sequence*) – polipeptyd związany z MHC klasy I;

<b>M-MDSC</b> ( <i>monocytic MDSC</i> ) – monocytarne MDSC;	<b>S100A8/9</b> ( <i>S100 calcium-binding protein</i> ) – białka wiążące wapń z rodziny S100;
<b>NADPH</b> ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide hosphate</i> ) – ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;	<b>s.c.</b> ( <i>subcutaneously</i> ) – podskórnie;
<b>NK</b> ( <i>natural killer</i> ) – naturalne komórki cytotoksyczne;	<b>shRNA</b> ( <i>short hairpin RNA</i> ) – krótkie RNA zawierające strukturę spinki do włosów;
<b>NKG2D</b> – aktywujący receptor komórek NK;	<b>siRNA</b> ( <i>small interfering RNA</i> ) – krótkie interferujące RNA;
<b>NKT</b> ( <i>natural killer T cells</i> ) – komórki posiadające markery powierzchniowe charakterystyczne dla limfocytów T i komórek NK;	<b>STAT</b> ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> ) – transduktor sygnału i aktywator transkrypcji;
<b>Nrp-1</b> ( <i>neuropilin-1</i> ) – neuropilina 1;	<b>TLR</b> ( <i>toll-like receptor</i> ) – receptor toll-podobny;
<b>PAMP</b> ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> ) – wzorce molekularne związane z patogenami;	<b>TIL</b> ( <i>tumor infiltrating lymphocytes</i> ) – limfocyty naciekające guz;
<b>PBS</b> ( <i>phosphate-buffered saline</i> ) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej;	<b>TAg</b> ( <i>tumor antigens</i> ) – antygeny nowotworowe;
<b>PD-L</b> ( <i>programmed death ligand</i> ) – ligand receptora programowanej śmierci;	<b>TAM</b> ( <i>tumor-associated macrophages</i> ) – makrofagi związane z nowotworem;
<b>pDC</b> ( <i>plasmacytoid DC</i> ) – plazmocytoidalne DC;	<b>T-bet</b> ( <i>T-box transcription factor</i> ) – czynnik transkrypcyjny T-bet;
<b>PGE2</b> ( <i>prostaglandin E2</i> ) – prostaglandyna E2;	<b>TCR</b> ( <i>T cell receptor</i> ) – receptor limfocyту T;
<b>PMN-MDSC</b> ( <i>polymorphonuclear MDSC</i> ) – granulocytarne MDSC;	<b>Th</b> ( <i>T helper</i> ) – limfocyty T pomocnicze;
<b>p.t.</b> ( <i>peritumorally</i> ) – okołoguzowo;	<b>TGF-β</b> ( <i>transforming growth factor β</i> ) – transformujący czynnik wzrostu β;
<b>PTEN</b> ( <i>phosphatase and tensin homologue</i> ) – kinaza PI3K;	<b>TGI</b> ( <i>tumor growth inhibition</i> ) – zahamowanie wzrostu guzów;
<b>RISC</b> ( <i>RSC-induced silencing complex</i> ) – kompleks indukujący wyciszenie;	<b>TME</b> ( <i>tumor microenvironment</i> ) – mikrośrodowisko nowotworu;
<b>RNAi</b> ( <i>RNA interference</i> ) – interferencja RNA;	<b>TNF-α</b> ( <i>tumor necrosis factor-α</i> ) – czynnik martwicy nowotworu α;
<b>RNS</b> ( <i>reactive nitrogen species</i> ) – reaktywne formy azotu;	<b>TRAIL</b> ( <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> ) – ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę;
<b>RORγt</b> ( <i>retinoic acid receptor-related orphan receptor γt</i> ) – receptor jądrowy RORγt;	<b>Treg</b> ( <i>T regulatory</i> ) – limfocyty T regulatorowe;
<b>ROS</b> ( <i>reactive oxygen species</i> ) – reaktywne formy tlenu;	<b>VEGF</b> ( <i>vascular endothelial growth factor</i> ) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego;
<b>RSV</b> ( <i>respiratory syncytial virus</i> ) – syncytialny wirus oddechowy;	<b>VSV-G</b> ( <i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i> ) – glikoproteina wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej

## Streszczenie

Wykorzystanie w immunoterapii przeciwnowotworowej szczepionek zawierających komórki dendrytyczne umożliwia pobudzenie swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jednak akumulacja czynników immunosupresorowych w mikrośrodkowisku nowotworu, które hamują proces aktywacji mechanizmów odpornościowych, znacznie obniża potencjał terapeutyczny komórek dendrytycznych. Podejmowane są zatem próby opracowania protokołów terapii skojarzonych, w których obok szczepionek komórkowych wdraża się czynniki znoszące supresję w nowotworze. Potencjalnym celem takiej immunoterapii jest interleukina 10 (IL-10). Podczas rozwoju nowotworu, IL-10 indukuje powstawanie komórek o charakterze immunosupresorowym, blokuje wydzielanie cytokin prozapalnych, a także hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, przyczyniając się do progresji choroby.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu redukcji stężenia IL-10 w mikrośrodkowisku nowotworowym na skuteczność chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu (CY) i komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi (BMDC/TAg) stosowanej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38. W doświadczeniach wykorzystano wektory lentiwirusowe trzeciej generacji kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko mRNA dla IL-10 (LV shIL-10), które umożliwiały wyciszenie ekspresji cytokiny w komórkach docelowych.

Przeprowadzone badania wykazały, że podawane doguzowo wektory LV shIL-10 są wydajnym nośnikiem shRNA i redukują poziom wydzielania IL-10 w guzach MC38. Po zastosowaniu immunoterapii, w której wektory LV shIL-10 i szczepionki zawierające BMDC/TAg podawano trzykrotnie w odstępach tygodniowych obserwowano istotne zahamowanie wzrostu guzów. Wyciszenie ekspresji IL-10 indukowało zwiększenie stopnia dojrzałości populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy, czemu towarzyszył napływ limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>. Po immunoterapii z udziałem wektorów LV shIL-10 i BMDC/TAg odnotowano również pobudzenie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Rozszerzenie protokołu o jednokrotne podanie CY, zastosowanego w niskiej, immunomodulującej dawce, przyczyniło się do zwiększenia skuteczności terapeutycznej wektorów LV shIL-10 i BMDC/TAg. Chemioimmunoterapia indukowała zwiększony naciek limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK i NKT przy jednoczesnym obniżeniu odsetków populacji komórek o aktywności immunosupresorowej w guzach MC38. Zmianom tym towarzyszyło pobudzenie miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi typu Th1.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wykazują, że redukcja stężenia IL-10 w mikrośrodkowisku guzów przy jednoczesnej immunomodulacji za pomocą cyklofosfamidu przyczynia się do zwiększenia skuteczności szczepionkowych komórek dendrytycznych w indukcji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

---

## Abstract

### **The impact of IL-10 concentration reduction in the tumor microenvironment on the effectiveness of cyclophosphamide and dendritic cell-based therapy in the MC38 murine colon carcinoma**

Application of dendritic cell-based vaccines in immunotherapy enables the generation of a specific antitumor response. However, the accumulation of immunosuppressive factors, which hinder the activation of immune mechanisms in the tumor microenvironment (TME), significantly lowers the therapeutic potential of dendritic cells. As a result, considerable efforts are being taken to develop combined therapies, where cell-based vaccines are used in conjunction with anti-immunosuppressive agents. In the TME, interleukin-10 (IL-10) is responsible for inducing immunosuppressive cells, as well as inhibition of secretion of proinflammatory cytokines and maturation of dendritic cells. As these processes invariably lead to tumor progression, IL-10 is regarded as a potent target for combined therapies.

The aim of this study was to determine the effects of reduction of IL-10 concentration in the TME on the efficiency of chemoimmunotherapy composed of cyclophosphamide (CY) and dendritic cells stimulated with tumor antigens (BMDC/TAg) in MC38 murine colon carcinoma model. In course of the experiments, 3<sup>rd</sup> generation lentiviral vectors encoding shRNA that binds IL-10 mRNA (LV shIL-10) were used to silence the expression of IL-10 in target cells.

The research showed that intratumorally injected LV shIL-10 vectors are efficient shRNA carriers and that they reduce the amount of IL-10 secretion in MC38 tumors. Following the immunotherapy, where LV shIL-10 vectors and vaccines containing BMDC/TAg were distributed three times at weekly intervals, a significant tumor growth inhibition was observed. Reduced expression of IL-10 resulted in increased differentiation level of tumor-infiltrating myeloid cells, accompanied by the influx of T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> lymphocytes. Furthermore, the therapy caused the stimulation of the systemic antitumor response. Extending the protocol by a single administration of an immunomodulating dose of CY further improved the results of the immunotherapy. Chemoimmunotherapy with CY increased the influx of T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> lymphocytes, as well as NK and NKT cells, while lowering the percentage of immunosuppressive cells in MC38 tumors. Changes in the TME were reflected in stimulation of both local and systemic Th1-type response.

The presented results prove that the reduction of IL-10 levels in the TME combined with immunomodulation using CY increases the efficiency of dendritic cell-based vaccines and leads to the induction of a specific antitumor response.

# 1. Wstęp

## 1.1. Rola układu odpornościowego w powstawaniu nowotworu

Wieloletnie badania nad mechanizmami biorącymi udział w procesie nowotworzenia pozwoliły na określenie charakterystycznych cech nowotworu (ang. *hallmarks of cancer*), do których należą: niezależność od zewnętrznych czynników wzrostowych, niewrażliwość na sygnały hamujące wzrost, tworzenie przerzutów, nieograniczona zdolność do podziałów, angiogeneza oraz unikanie apoptozy (Hanahan i Weinberg 2000). Po 11 latach, autorzy uzupełnili listę o dwie nowe cechy: zmiana metabolizmu komórek oraz unikanie zniszczenia przez układ odpornościowy (Hanahan i Weinberg 2011). Rolę układu odpornościowego w procesie progresji nowotworu naukowcy dostrzegli już na początku XX w., kiedy to Paul Ehrlich wysunął hipotezę, według której komórki nowotworowe powstają w organizmie w sposób ciągły, a następnie są identyfikowane i eliminowane przez układ odpornościowy zanim dojdzie do rozwoju nowotworu. W połowie XX w., Burnet i Thomas zaproponowali podobną hipotezę, która zyskała miano nadzoru immunologicznego. Obecnie wiadomo, że układ odpornościowy oddziałując na rozwijający się nowotwór eliminuje zmienione komórki, jednocześnie dokonując selekcji komórek immunogennych, pozostawiając te, które stały się nierozpoznawalne dla komórek efektorowych. Proces ten, nazwany immunoedycją, składa się z trzech faz: eliminacji, równowagi oraz ucieczki (ryc. 1).

### 1.1.1. Trzy fazy immunoedycji: eliminacja, równowaga i ucieczka

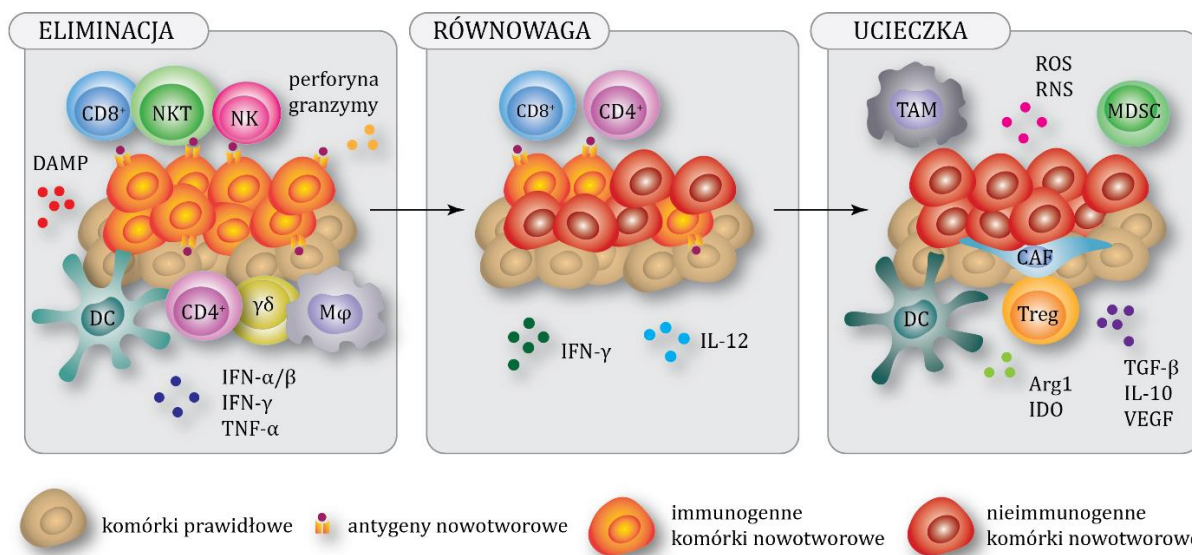
W pierwszej fazie procesu immunoedycji, układ odpornościowy dokonuje eliminacji komórek, które zyskały cechy komórek nowotworowych. Mimo że proces ten nie został rozpoznany klinicznie z powodu zbyt wczesnej fazy rozwoju choroby nowotworowej, o jego istnieniu świadczą obserwacje z badań na modelach zwierzęcych, jak również dane pochodzące od pacjentów. Zaobserwowano bowiem, że u myszy z niedoborami odporności o wiele częściej dochodzi do rozwoju nowotworów, zarówno tych indukowanych chemicznie, jak i spontanicznych (Kaplan i in. 1998; Shankaran i in. 2001). Podobnie, u pacjentów cierpiących na choroby związane z niedoborem odporności, czy też przyjmujących leki warunkujące immunosupresję, obserwuje się zwiększoną zapadalność na choroby nowotworowe, w porównaniu do całej populacji (Boshoff i Weiss 2002; Vajdic i in. 2006). W eliminacji komórek nowotworowych biorą udział mechanizmy odporności wrodzonej, jak i nabytej. Układ odpornościowy jest aktywowany poprzez sygnały zagrożenia, które pojawiają się już w początkowej fazie rozwoju nowotworu i są rozpoznawane przez komórki należące do wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, takie jak komórki NK, NKT czy limfocyty  $T\gamma\delta$ , a także przez komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DC) (Kim i in. 2007). Do sygnałów

tych należą tzw. molekularne wzorce związane z uszkodzeniem (ang. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), które są uwalniane bezpośrednio z martwych komórek nowotworowych lub z tkanek uszkodzonych podczas gwałtownego wzrostu guza (Schreiber i in. 2011). Komórki nowotworowe ze względu na zmienioną proliferację oraz uruchomienie szlaków związanych ze stresem komórkowym, wykazują zwiększoną ekspresję ligandów dla receptorów NKG2D, przez co mogą zostać rozpoznane przez komórki wrodzonej odporności. Komórki NK, NKT oraz limfocyty T $\gamma\delta$  wydzielają interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), który hamuje proliferację oraz indukuje apoptozę komórek nowotworowych (Kim i in. 2007). Ponadto, cytokina ta promuje ekspresję głównego układu zgodności tkankowej klasy I (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) na powierzchni komórek nowotworowych, tym samym ułatwia ich rozpoznanie limfocytom T cytotoksycznym (ang. *cytotoxic T lymphocytes*, CTL) (Shankaran i in. 2001). Interferony typu I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), do produkcji których zdolne są plazmocytoidalne DC, przyczyniają się do aktywacji komórek odpowiedzi wrodzonej oraz zwiększają aktywność CTL (Woo i in. 2015). Aktywowane komórki NK, NKT oraz limfocyty T $\gamma\delta$ , oprócz produkcji IFN- $\gamma$  wykorzystują także inne mechanizmy do eliminacji komórek nowotworowych, takie jak wydzielanie ziaren cytolitycznych zawierających perforynę i granzymy oraz ekspresja cząsteczek TRAIL i FasL (Woo i in. 2015). Uwolnione antygeny nowotworowe są pochłaniane przez komórki dendrytyczne, które następnie migrują do węzłów chłonnych i aktywują swoistą odpowiedź przeciwnowotworową poprzez prezentację antygenów dziewiczym limfocytom T pomocniczym (ang. *T helper*, Th) oraz limfocytom T cytotoksycznym. Swoiste limfocyty T mogą migrować w miejsce rozwoju nowotworu, gdzie przyczyniają się do eliminacji komórek nowotworowych produkując cytokiny (Th) lub wykorzystując mechanizmy cytotoksyczności (CTL) (Kim i in. 2007).

W sytuacji, gdy w wyniku procesu eliminacji nie wszystkie komórki nowotworowe zostaną zniszczone, może nastąpić kolejna faza immunoedycji, którą jest równowaga. Uważa się, że nowotwór w fazie równowagi może znajdować się nawet przez wiele lat, podczas których komórki efektorowe rozpoznają komórki nowotworowe i dokonują ich ciągłej eliminacji, przy czym zachowana jest równowaga pomiędzy proliferacją komórek nowotworowych a ich śmiercią. Zachodzenie tego procesu potwierdzono podczas doświadczenia przeprowadzonego z wykorzystaniem modelu mięsaka indukowanego metylocholanem (ang. *methylcholanthrene*, MCA) (Koebel i in. 2007). Po podaniu myszom niskiej dawki MCA, u większości zwierząt pojawiły się małe guzy, które nie rozwijały się przez kolejne 200 dni obserwacji. Jednak, kiedy myszom podano przeciwciała skierowane przeciwko limfocytom T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  lub interleukinie 12 (IL-12), następował gwałtowny przyrost masy guzów. Natomiast, takiego zjawiska nie obserwowano po eliminacji komórek NK, a także białek niezbędnych do prawidłowego działania tych komórek, takich jak NKG2D oraz TRAIL (Koebel i in. 2007). Z tych obserwacji wynika, że za powstrzymanie progresji nowotworu w fazie równowagi odpowiedzialna jest tylko odporność nabyta, co umożliwia rozróżnienie tego etapu immunoedycji od eliminacji, w której

niezbędna jest aktywność komórek zarówno należących do odporności nabytej, jak i tych warunkujących odporność wrodzoną.

Komórki nowotworowe wykorzystują różne mechanizmy, które umożliwiają im przejście z fazy równowagi do fazy ucieczki. Jednym z nich jest zmiana poziomu ekspresji antygenów na ich powierzchni, przez co komórki układu odpornościowego nie mogą ich rozpoznać. W fazie równowagi, swoiste limfocyty T eliminują immunogenne komórki nowotworowe. Dochodzi wtedy do naturalnej selekcji, w wyniku której przy życiu pozostają komórki wykazujące ekspresję antygenów, które nie wywołują reakcji odpornościowej. Ponadto, komórki nowotworowe mogą unikać rozpoznania przez limfocyty T poprzez utratę ekspresji MHC I na skutek mutacji genów kodujących to białko, bądź genów białek biorących udział w przetwarzaniu oraz transporcie antygenów (Khong i Restifo 2002). Innym mechanizmem warunkującym niewrażliwość komórek nowotworowych na działanie komórek odpornościowych o aktywności cytotoksycznej jest nadekspresja białek anti-apoptotycznych (Schreiber i in. 2011). Co więcej, komórki nowotworowe indukują kształtowanie się silnie immunosupresorowego mikrośrodowiska nowotworowego (ang. *tumor microenvironment*, TME), które poprzez hamowanie odpowiedzi odpornościowej umożliwia ucieczkę spod nadzoru immunologicznego. W efekcie opisanych zmian, komórki nowotworowe są zdolne do niekontrolowanej przez układ odpornościowy proliferacji, w wyniku czego następuje szybka progresja objawów klinicznych choroby.



**Ryc. 1.** Udział komórek układu odpornościowego w procesie immunoedycji. Rozwinięcie zastosowanych skrótów przedstawiono w wykazie skrótów. Na podstawie Schreiber i in. 2011.

### 1.1.2. Rola mikrośrodowiska nowotworu w progresji choroby

Powstanie mikrośrodowiska nowotworu bogatego w czynniki o charakterze immunosupresorowym jest etapem, który umożliwia dalszy rozwój choroby. Oprócz komórek nowotworowych, składa się ono z komórek śródbłonna tworzących naczynia krwionośne, fibroblastów związanych z nowotworem (ang. *cancer associated fibroblasts*, CAF) oraz komórek odpornościowych (Hanahan i Coussens 2012). Choć w początkowych etapach rozwoju nowotworu komórki układu odpornościowego są zdolne do eliminacji komórek nowotworowych, to pod wpływem czynników wydzielanych przez TME, aktywność komórek efektorowych zostaje zahamowana, a do nowotworu napływają komórki o charakterze supresorowym. Wydzielane przez komórki nowotworowe cytokiny i czynniki wzrostu, takie jak transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor*, TGF- $\beta$ ), interleukina 10 (IL-10) czy czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) wpływają na zahamowanie aktywności komórek efektorowych o działaniu przeciwnowotworowym (Vesely i in. 2011). Ponadto, aktywność enzymów produkowanych w TME powoduje zmniejszenie dostępności aminokwasów niezbędnych dla efektorowych limfocytów T do prawidłowego funkcjonowania. Degradacja argininy przez arginazę 1 oraz tryptofanu przez 2,3-dioksygenazę indoloaminy (IDO) prowadzi do zahamowania proliferacji oraz anergii tych komórek (Mondanelli i in. 2017). Komórki nowotworowe oraz komórki CAF mogą wykazywać ekspresję cząsteczek takich jak PD-L1, PD-L2 (ang. *programmed death-ligand*) i FasL, które po przyłączeniu do odpowiednich receptorów na powierzchni komórek efektorowych indukują ich apoptozę (Vesely i in. 2011; Lakins i in. 2018). Natomiast, rozpuszczalne formy Fas i FasL (sFas, sFasL), pojawiające się w TME na skutek aktywności metaloproteinaz wydzielanych przez komórki nowotworowe, blokują cząsteczki docelowe uniemożliwiając wykorzystanie tego mechanizmu cytotoksyczności przez CTL (Webb i in. 2002). Z kolei, rozpuszczalne formy kompleksu MICA/B, obniżają poziom ekspresji receptorów NKG2D na powierzchni komórek NK, co prowadzi do hamowania mechanizmów aktywności cytotoksycznej tych komórek warunkowanych przez receptory NKG2D (Baginska i in. 2013).

Za zahamowanie aktywności przeciwnowotworowej komórek efektorowych w TME odpowiedzialne są także komórki układu odpornościowego o charakterze immunosupresorowym, takie jak limfocyty T regulatorowe (ang. *T regulatory*, Treg), komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (ang. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) czy makrofagi związane z nowotworem (ang. *tumor associated macrophages*, TAM), których różnicowanie i rekrutacja do TME jest warunkowana przez cytokiny, chemokiny oraz czynniki wzrostu produkowane przez komórki nowotworowe, jak również przez inne komórki naciekające TME.



### 1.1.2.1. *Limfocyty T regulatorowe*

Limfocyty T regulatorowe są subpopulacją limfocytów T CD4<sup>+</sup>, które mogą powstawać w grasicy jako naturalne limfocyty T regulatorowe (nTreg) i migrować do TME w odpowiedzi na produkowane tam chemokiny lub poprzez różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup> zachodzące pod wpływem IL-10 i TGF- $\beta$  (iTreg) (Peterson 2012). Indukcja limfocytów Treg jest wspierana przez oddziaływanie cząsteczki PD-L1, obecnej na powierzchni komórek nowotworowych lub komórek mieloidalnych o potencjale supresorowym, z receptorem PD-1 występującym na powierzchni limfocytów T. Efektem takich oddziaływań jest zwiększenie ekspresji FoxP3 – czynnika transkrypcyjnego charakterystycznego dla populacji limfocytów Treg (Francisco i in. 2009). Limfocyty Treg indukują immunosupresję poprzez wykorzystanie różnych mechanizmów, zależnych od bezpośredniego kontaktu z komórką docelową, jak i opartych na wydzielaniu czynników rozpuszczalnych (Paluskievicz i in. 2019). Poprzez ekspresję cząsteczek CTLA-4 oddziałujących z CD80/CD86 oraz LAG-3 i Nrp-1, które oddziałują z MHC II, limfocyty Treg hamują dojrzewanie DC uniemożliwiając tym samym prezentację antygenów dziewiczym limfocytom T (Paluskievicz i in. 2019). Limfocyty Treg hamują zdolność komórek DC do aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej również poprzez wydzielanie TGF- $\beta$ , który powoduje obniżenie poziomu ekspresji cząsteczek kostymulujących oraz MHC II przez DC, a także może indukować konwersję prekursorów tych komórek w kierunku populacji DC o właściwościach regulatorowych lub populacji MDSC o aktywności supresorowej (Hargadon 2016). Ponadto, limfocyty Treg oddziałują bezpośrednio na populacje efektorowych limfocytów T. Komórki te są zdolne do wytwarzania perforyny i granzymów, przez co wywołują efekt cytotoksyczny wobec limfocytów T (Cao i in. 2007). Poprzez wysoką ekspresję podjednostki  $\alpha$  receptora dla IL-2 (CD25), wiążą tę cytokinę z wysokim powinowactwem. W rezultacie, jej dostępność dla innych populacji efektorowych limfocytów T jest obniżona, co powoduje zahamowanie ich proliferacji (Busse i in. 2010). Limfocyty Treg wytwarzają również IL-10, której wpływ na odpowiedź przeciwnowotworową został omówiony w dalszej części pracy.

### 1.1.2.2. *Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego*

Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego to heterogenna populacja niedojrzałych komórek, które powstają w procesie mielopozy, zaburzonym przez czynniki pochodzenia nowotworowego, takie jak GM-CSF, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2 oraz białka wiążące wapń S100A8 i S100A9 (Anger i Rossowska 2018). Wśród tych komórek można wyróżnić subpopulacje komórek monocytarnych (M-MDSC) oraz granulocytarnych (PMN-MDSC). U myszy, MDSC identyfikowane są na podstawie ekspresji markerów CD11b, Ly6C oraz Ly6G. M-MDSC charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji Ly6C (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>), natomiast PMN-MDSC wykazują niski poziom ekspresji Ly6C i wysoki Ly6G (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>+</sup>).

MDSC, wykorzystując różne mechanizmy supresji, hamują aktywność komórek immunokompetentnych w TME, promując tym samym ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego. Jednym ze sposobów obniżenia aktywności limfocytów T jest wydzielanie reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS) przez MDSC, które powstają w wyniku reakcji przeprowadzanych przez oksydazę NADPH i syntazę tlenku azotu (Corzo i in. 2009). Stres oksydacyjny wywołany przez ROS może indukować apoptozę limfocytów T. Ponadto, cząsteczki RNS poprzez nitrację reszt tyrozynowych receptorów TCR, cząsteczek MHC I oraz niektórych chemokin obniżają zdolność limfocytów T do oddziaływania z komórkami prezentującymi antygen (ang. *antigen presenting cells*, APC) i komórkami docelowymi, a także redukują zdolności migracyjne komórek w kierunku TME (Nagaraj i in. 2007; De Sanctis i in. 2014). Aktywność enzymatyczna MDSC prowadzi także do deplecji niektórych aminokwasów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania limfocytów T. Wytwarzane przez MDSC arginaza 1 i syntaza tlenku azotu przetwarzają argininę, zmniejszając tym samym dostępność tego aminokwasu w TME. Limfocyty T w środowisku zubożonym o ten aminokwas wykazują obniżony poziom ekspresji łańcucha zeta cząsteczki CD3, przez co nie jest możliwe powstawanie kompleksów TCR/CD3 i aktywacja tych komórek (Rodriguez i in. 2004). MDSC produkują takżeIDO – enzym uczestniczący w konwersji tryptofanu do kinureniny. Rezultatem przeprowadzanej reakcji jest niedobór tryptofanu, który może skutkować zahamowaniem procesu translacji w limfocytach T (Munn i in. 2005). Oprócz tego, kinurenina powoduje zahamowanie aktywności efektorowych limfocytów T poprzez blokowanie ścieżki zależnej od IL-2, a także indukuje ekspresję CTLA-4 i PTEN w limfocytach T CD4<sup>+</sup>, co prowadzi do różnicowania tych komórek w kierunku limfocytów Treg (Routy i in. 2016). Innym aminokwasem, którego dostępność jest ograniczona w wyniku aktywności MDSC jest cysteina. Ze względu na to, że limfocyty T nie są zdolne do syntezy tego aminokwasu, w prawidłowych warunkach jest on im dostarczany przez komórki dendrytyczne lub makrofagi podczas prezentacji antygeny. MDSC są zdolne do pobierania tego aminokwasu, natomiast nie wykazują ekspresji białek transporterowych odpowiedzialnych za jego wydzielanie. W rezultacie, MDSC konkurując o cysteinę z komórkami prezentującymi antygen, zmniejszają jej dostępność limfocytom T, co skutkuje zahamowaniem procesu aktywacji tych komórek (Srivastava i in. 2010). MDSC obniżają zdolności migracyjne dziewiczych limfocytów T poprzez ekspresję błonowego białka ADAM17 (ang. *a disintegrin and metalloproteinase domain 17*) (Hanson i in. 2009). Podczas bezpośredniego kontaktu komórek enzym ten przeprowadza reakcję proteolizy L-selektyny (CD62L), która warunkuje zdolność limfocytów T do migracji w kierunku węzłów chłonnych. W efekcie, proces aktywacji swoistej odpowiedzi odpornościowej zostaje zahamowany. MDSC wykazują także ekspresję cząsteczki PD-L1, której poziom wzrasta pod wpływem czynnika transkrypcyjnego HIF-1 $\alpha$  (ang. *hypoxia-inducible factor  $\alpha$* ), przez co mogą wykazywać silną supresję wobec limfocytów T w warunkach niedoboru tlenu, które często panują w TME (Noman i in. 2014).

### 1.1.2.3. Makrofagi związane z nowotworem

Makrofagi związane z nowotworem to populacja występujących w TME komórek odpornościowych, które wspierają rozwój nowotworu poprzez promowanie neowaskularyzacji, przerzutowania oraz immunosupresji. W początkowej fazie procesu nowotworzenia, w wyniku obecności czynników prozapalnych, takich jak IFN- $\gamma$ , dochodzi do rekrutacji makrofagów typu pierwszego (M1), które wspomagają odpowiedź typu Th1. Poprzez produkcję cytokin prozapalnych takich jak IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-23 oraz wysoką ekspresję cząsteczek MHC I i MHC II, komórki typu M1 są zdolne do aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej (Chanmee i in. 2014). Jednak, wraz z rozwojem nowotworu, w wyniku tworzenia się TME, w którym dominują czynniki o charakterze immunosupresorowym, komórki typu M1 ulegają konwersji do komórek typu M2 o właściwościach pronowotworowych. Zmianę tę promują cytokiny charakterystyczne dla odpowiedzi typu Th2 (IL-4, IL-13), a także IL-10 i TGF- $\beta$  (Biswas i Mantovani 2010). W niektórych przypadkach TAM, z których większość wykazuje właściwości komórek typu M2, mogą stanowić nawet połowę masy guzów (Zheng i in. 2017). TAM wydzielają IL-10, TGF- $\beta$  oraz PGE2, przez co wspierają supresję wobec efektorowych limfocytów Th i CTL. Ponadto, podobnie jak MDSC, poprzez ekspresję arginazy 1 orazIDO powodują deplecję argininy i tryptofanu, hamując aktywację efektorowych limfocytów T (Petty i Yang 2017). TAM promują migrację MDSC oraz limfocytów Treg w kierunku TME. Wydzielane przez nie chemokiny CCL17, CCL18 i CCL22 warunkują rekrutację limfocytów Treg, z kolei produkowana w dużych ilościach CCL2 powoduje migrację M-MDSC (Yang i Zhang 2017; Lesokhin i in. 2012). Wykazano również, że TAM indukują ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3 oraz cząsteczki CTLA-4 w limfocytach T CD4<sup>+</sup> i tym samym promują ich różnicowanie w kierunku limfocytów Treg (Daurkin i in. 2011). Z kolei, poprzez ekspresję cząsteczek PD-L1, CD80 i CD86, które są ligandami dla PD-1 i CTLA-4 występujących na powierzchni efektorowych limfocytów T, TAM hamują swoistą odpowiedź przeciwnowotworową (Petty i Yang 2017). TAM wpływają także na mechanizmy odpowiedzi nieswoistej warunkowanej przez komórki NK. Zaobserwowano bowiem, że poprzez wydzielanie TGF- $\beta$ , TAM hamują aktywność cytotoksyczną komórek NK (Krnetá i in. 2017).

Progresa nowotworu jest silnie związana z rodzajem oddziaływań pomiędzy komórkami tworzącymi TME a cząsteczkami warunkującymi kierunek odpowiedzi odpornościowej podczas procesu kancerogenezy, do których należą cytokiny. Zarówno liczebność wymienionych populacji komórek o charakterze immunosupresorowym, jak i stężenie cytokin promujących rozwój nowotworu należą do czynników prognostycznych. Jedną z cytokin, która bierze udział w supresji indukowanej przez limfocyty Treg, MDSC oraz TAM znajdujących się TME jest interleukina 10.

## 1.2. Wpływ interleukiny 10 na aktywność komórek odpornościowych w mikrośrodkowisku nowotworu

Interleukina 10 jest cytokiną o działaniu plejotropowym, która bierze udział w regulacji procesów zapalnych. Początkowo IL-10 zyskała miano czynnika hamującego syntezę cytokin (ang. *cytokine synthesis inhibitory factor*, CSIF) (Fiorentino i in. 1989). Zidentyfikowana została bowiem jako białko produkowane przez limfocyty Th2 powodujące obniżenie zdolności limfocytów Th1 do produkcji cytokin prozapalnych. Obecnie jednak wiadomo, że producentami IL-10 mogą być również inne populacje komórek układu odpornościowego, a wśród nich limfocyty Treg, Th1, Th17, limfocyty B, limfocyty T cytotoksyczne, komórki dendrytyczne, makrofagi, MDSC, komórki NK, neutrofile, eozynofile czy komórki tłuszczne (Ng i in. 2013). Źródłem tej cytokiny mogą być także keratynocyty, komórki nabłonkowe oraz komórki nowotworowe. Interleukina 10 oddziałuje na komórki poprzez receptor złożony z podjednostek IL-10R1 i IL-10R2, z których IL-10R1 jest podjednostką unikalną dla IL-10, a IL-10R2 występuje również w receptorach innych cytokin (Donnelly i in. 1999; Walter 2014). Ze względu na wielokierunkowe działanie IL-10, jej wpływ na proces kancerogenezy zależy od wielu czynników, takich jak profil cytokinowy i komórkowy mikrośrodkowiska nowotworowego oraz etap odpowiedzi odpornościowej. Należy również podkreślić, że główną rolą IL-10 jest utrzymanie homeostazy w organizmie. Interleukina 10 może zatem promować immunosupresję lub wręcz odwrotnie, działać immunostymulująco. Na rycinie 2 przedstawiono wpływ IL-10 na wybrane populacje komórek w mikrośrodkowisku nowotworu.

### 1.2.1. Właściwości immunosupresyjne IL-10

Dane kliniczne, jak również wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem mysich modeli nowotworów wskazują, że pojawiająca się w TME IL-10 może wykazywać aktywność supresorową wobec komórek układu odpornościowego naciekających guz nowotworowy i tym samym promować progresję choroby. Obecność IL-10 wykazano w tkankach nowotworowych pobranych od pacjentów m. in. z czerniakiem, rakiem jajnika, gruczołu piersiowego, trzustki i płuca (Sato i in. 2011). Analiza danych uzyskanych podczas badań klinicznych potwierdziła również, że podwyższone stężenie IL-10 we krwi pacjentów z chorobami nowotworowymi najczęściej wiąże się ze złymi prognozami (Zhao i in. 2015). Cytokina ta hamuje aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej wpływając na proces dojrzewania i aktywność komórek prezentujących antygen, indukując powstawanie komórek immunosupresyjnych oraz oddziałując na limfocyty T i komórki NK.

Wczesne badania nad rolą IL-10 w procesie różnicowania monocytarnych komórek prezentujących antygen, prowadzone w układzie *in vitro* z wykorzystaniem prekursorów makrofagów i komórek dendrytycznych, wykazały, że IL-10 wpływa na obniżenie poziomu

ekspresji cząsteczki adhezyjnej ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) oraz cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na monocytach, a tym samym hamuje proces ich różnicowania w kierunku komórek zdolnych do aktywacji limfocytów T (Willems i in. 1994). Zaobserwowano również, że cytokina ta indukuje zatrzymanie kompleksów MHC II-peptyd w endosomach redukując akumulację cząsteczek MHC II na powierzchni monocytów (Koppelman i in. 1997). Interleukina 10 wpływa także na dojrzewanie APC warunkowane przez aktywację receptorów toll-podobnych (ang. *toll-like receptors*, TLR). Po przyłączeniu do receptora, IL-10 indukuje fosforylację czynnika transkrypcyjnego STAT3, który następnie stymuluje ekspresję białek biorących udział w zahamowaniu kaskad sygnałowych inicjowanych przez ligandy TLR (Mittal i Roche 2015). Z drugiej strony, zależna od receptorów TLR stymulacja niedojrzałych komórek dendrytycznych prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji IL-10, która z kolei aktywuje białko STAT3 prowadząc do podwyższenia poziomu ekspresji cząsteczki PD-L1 (Wölflle i in. 2011). Co więcej, APC w obecności IL-10 wykazują obniżoną zdolność do produkcji IL-12, cytokiny niezbędnej podczas indukcji odpowiedzi typu Th1 (Ma i in. 2015). Wszystkie zmiany zachodzące w APC pod wpływem IL-10 mogą rzutować na proces aktywacji limfocytów T i powodować obniżenie liczebności komórek immunokompetentnych w TME.

Należy zaznaczyć, że wrażliwość komórek prezentujących antygen na IL-10 jest różna w zależności od stopnia ich zróżnicowania. Prekursory makrofagów i komórek dendrytycznych wykazują wysoki poziom ekspresji podjednostki IL-10R1 receptora, która odpowiada za wiązanie IL-10. Wraz ze wzrostem stopnia dojrzałości makrofagów, poziom ekspresji IL-10R1 na ich powierzchni rośnie, przez co komórki te stają się jeszcze bardziej wrażliwe na działanie cytokiny (von Lanzener i in. 2015). Pod wpływem IL-10 makrofagi ulegają polaryzacji w kierunku komórek typu M2, które same również wydzielają tę cytokinę. Sica i in., wykazali, że IL-10 produkowana przez makrofagi związane z nowotworem, wyizolowane z guzów mysiego włókniakomięsaka, może oddziaływać autokrynnie, powodując obniżenie ekspresji IL-12 w badanych komórkach (Sica i in. 2000). Z drugiej strony, w badaniach przeprowadzonych na mysim modelu raka gruczołu piersiowego stwierdzono, że IL-10 wydzielana przez makrofagi infiltrujące guzy powoduje obniżenie poziomu ekspresji IL-12 w DC, a tym samym hamuje indukcję swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej (Ruffell i in. 2014). Analizy danych pochodzących od pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc wskazują, że podwyższony poziom ekspresji IL-10 w TAM koreluje z zaawansowanym stadium choroby i złymi prognozami (Zeni i in. 2007; Wang i in. 2011).

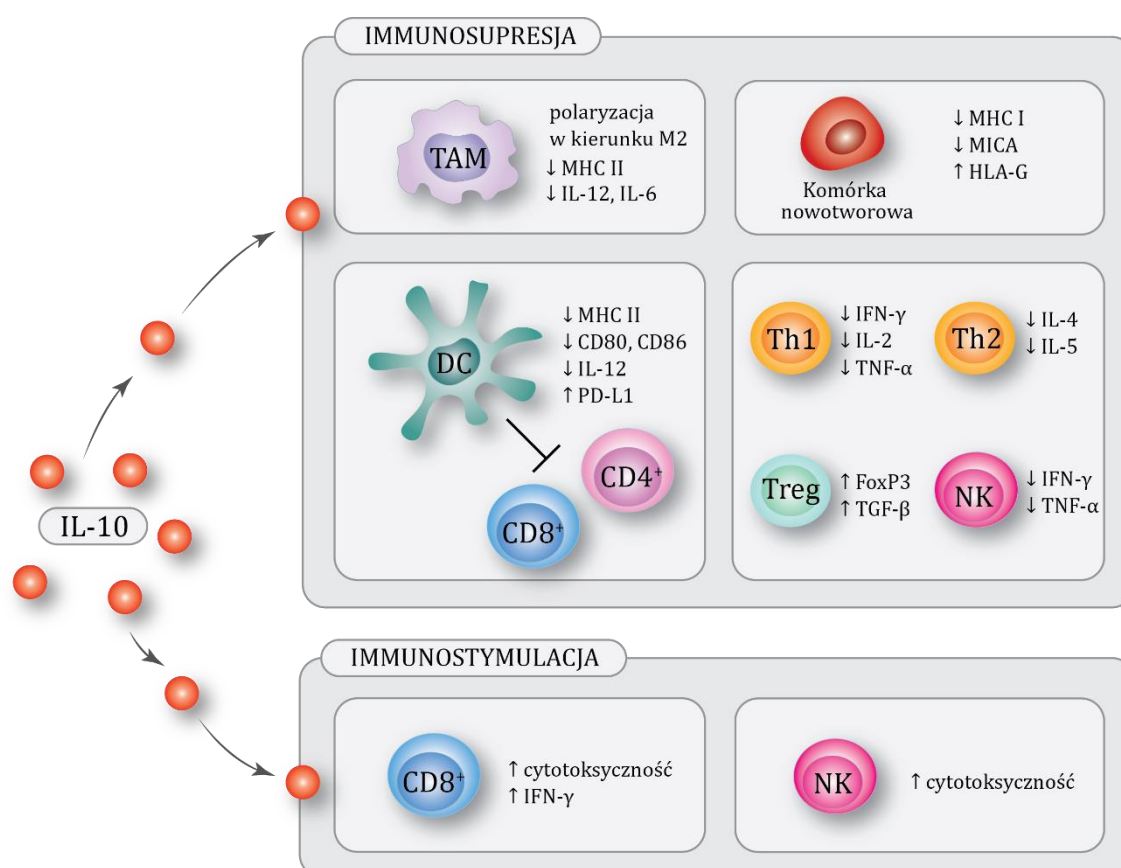
W przeciwieństwie do makrofagów, dojrzałe komórki dendrytyczne są mniej wrażliwe na IL-10, ponieważ wykazują ekspresję IL-10R1 na dużo niższym poziomie niż komórki prekursorowe (von Lanzener i in. 2015). Pomimo to Fujii i in. zaobserwowali, że podanie myszom IL-10 krótko przed oraz po zastosowaniu szczepionek, zawierających dojrzałe DC stymulowane antygenami nowotworowymi, obniżało ich zdolność do indukcji odpowiedzi

przeciwnowotworowej, a wszczepione tydzień po immunizacji komórki nowotworowe tworzyły szybko rozwijające się guzy (Fujii i in. 2001). Komórki dendrytyczne poddane działaniu IL-10, same produkują IL-10, która może oddziaływać autokrynnie, podtrzymując niedojrzały status tych komórek, lub parakrynnie, ukierunkowując polaryzację limfocytów T podczas prezentacji antygenów. Limfocyty T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> aktywowane przez DC wcześniej traktowane IL-10 okazują się anergiczne – niewrażliwe na stymulację antygenową (Steinbrink i in. 2002). Zaobserwowano również, że wyizolowane od myszy DC, które charakteryzują się podwyższonym poziomem ekspresji IL-10, wykazują obniżoną zdolność do aktywacji limfocytów T cytotoksycznych (Llopiz i in. 2016). Ponadto, prezentacja antygenów dziewiczym limfocytom T CD4<sup>+</sup> przez niedojrzałe DC wydzielające IL-10 może prowadzić do polaryzacji limfocytów w kierunku Treg, zdolnych do produkcji IL-10 oraz TGF- $\beta$  (Dennis i in. 2013).

Interleukina 10 może również bezpośrednio hamować aktywację limfocytów T zależną od sygnału kostymulującego przekazywanego przez komórki prezentujące antygen. Oddziaływanie IL-10 z receptorem dla tej cytokiny znajdującym się na powierzchni limfocytu T powoduje defosforylację cząsteczki CD28, co prowadzi do zahamowania ścieżki sygnałowej uruchamianej podczas oddziaływania CD28 z cząsteczkami kostymulującymi CD80/CD86 obecnymi na powierzchni komórek prezentujących antygen (Taylor i in. 2007). Ponadto, IL-10 może wpływać na aktywność efektorowych limfocytów Th. Już pierwsze badania na temat działania tej cytokiny wykazały, że obniża ona zdolność limfocytów Th1 do produkcji cytokin prozapalnych takich jak IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  (Fiorentino i in. 1989). Interleukina 10 może również hamować wydzielanie IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  przez komórki NK, co wiąże się z obniżeniem ich potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej (Conti i in. 2003). Odnotowano również wpływ IL-10 na obniżenie aktywności limfocytów Th2. Komórki te, poddane działaniu tej cytokiny wykazują niższy poziom produkcji IL-4 i IL-5. Ponadto wykazano, że IL-10 hamuje proliferację limfocytów Th1 i Th2 zależną od swoistej stymulacji antygenowej (Del Prete i in. 1993). Podobnie jak w przypadku populacji komórek monocytarnych, wrażliwość limfocytów T na IL-10 jest różna w zależności od stopnia aktywacji tych komórek. Komórki pamięci wykazują obniżony poziom ekspresji receptora IL-10, przez co są mniej wrażliwe na oddziaływanie tej cytokiny niż dziewicze limfocyty T (Dennis i in. 2013).

Interleukina 10, wpływając na fenotyp komórek nowotworowych, może pośrednio hamować zdolność komórek efektorowych do rozpoznawania komórek docelowych. Wykazano, że komórki czerniaka poddane działaniu IL-10 wykazują obniżony poziom ekspresji białek TAP1/TAP2 (ang. *transporter associated with antigen processing*), które biorą udział w procesie transportu peptydów z cytoplazmy do retikulum endoplazmatycznego. W wyniku tej zmiany, na powierzchni komórek występuje mniej cząsteczek MHC I związanych z antygenami, co powoduje, że komórki nowotworowe są rozpoznawane przez limfocyty T cytotoksyczne z dużo mniejszą wydajnością, a z drugiej strony są bardziej wrażliwe na działanie komórek NK (Kurte i in. 2004). Zaobserwowano

jednak, że IL-10 wpływa również na obniżenie poziomu ekspresji białka MICA, ligandu dla receptora NKG2D, na powierzchni komórek nowotworowych, co prowadzi do zahamowania aktywności cytotoksycznej komórek NK (Serrano i in. 2011). Ponadto, IL-10 indukuje w komórkach nowotworowych ekspresję cząsteczek HLA-G (ang. *human leukocyte antigen-G*), które należą do nieklasycznych antygenów HLA I (Urosevic i Dummer 2003). Oddziaływanie cząsteczek HLA-G z receptorami ILT2 i ILT4 (ang. *immunoglobulin-like transcript*) może prowadzić do zahamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od aktywności komórek NK, limfocytów T oraz DC (Rouas-Freiss i in. 2014).



**Ryc. 2.** Immunosupresorowy i immunostymulujący wpływ IL-10 na wybrane populacje komórek mikrośrodowiska nowotworu. Rozwinięcie zastosowanych skrótów przedstawiono w wykazie skrótów. Opracowanie własne.

### 1.2.2. Właściwości immunostymulujące IL-10

Wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem doświadczalnych modeli nowotworów wskazują, że IL-10 może wykazywać także właściwości immunostymulujące, przez co może wspierać odpowiedź przeciwnowotworową. Już wczesne badania nad rolą IL-10 w aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej wykazały, że IL-10 wydzielana przez komórki nowotworowe przyczynia się do indukcji limfocytów T CD8<sup>+</sup> o aktywności cytotoksycznej, a także wpływa na

wykształcenie pamięci immunologicznej (Giovarelli i in. 1995). W doświadczeniach prowadzonych z wykorzystaniem myszy z nokautem genu *il10* (IL-10<sup>-/-</sup>), u których chemicznie indukowano nowotwory skóry zaobserwowano, że guzy rozwijały się intensywniej, a także szybciej tworzyły przerzuty niż u myszy typu dzikiego (Mumm i in. 2011). Natomiast, podskórne podanie IL-10 prowadziło do zahamowania wzrostu guzów, a nawet całkowitego wyleczenia myszy z rozwijającym się rakiem gruczołu sutkowego oraz rakiem kolczystokomórkowym skóry, czemu towarzyszyło pobudzenie swoistych wobec antygenów nowotworowych CTL (Emmerich i in. 2012; Mumm i in. 2011). Odnotowano również, że IL-10 indukowała fosforylację STAT3 oraz STAT1 w limfocytach T CD8<sup>+</sup> znajdujących się w TME, co skutkowało wzmożoną produkcją IFN- $\gamma$  przez te komórki. Takiego efektu nie uzyskano jednak w przypadku limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> zidentyfikowanych w narządach limfatycznych (Emmerich i in. 2012). Fu i in. zaobserwowali, że choć IL-10 obniża skuteczność aktywacji CTL w wyniku krzyżowej prezentacji antygenów przez DC, to jest ona niezbędna do utrzymania ich funkcji po klonalnej ekspansji (Fu i in. 2015). Ponadto, wykazano, że IL-10 wspiera aktywację CTL pamięci, zarówno tę zachodzącą w wyniku powtórnego kontaktu z antygenem, jak również niezależną od stymulacji TCR i indukowaną przez IL-15 (Fujii i in. 2001; Nizzoli i in. 2016).

Interleukina 10 może także wspierać mechanizmy odpowiedzi wrodzonej, zależne od aktywności komórek NK. W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem mysich modeli czerniaka i raka gruczołu sutkowego zaobserwowano, że IL-10 hamuje proces przerzutowania, a efekt działania tej cytokiny jest zależny od obecności komórek NK (Zheng i in. 1996; Kundu i in. 1996). Wykazano bowiem, że pod wpływem tej cytokiny, komórki NK charakteryzują się zwiększoną aktywnością cytotoksyczną, a ponadto wykazują podwyższony poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za ich zdolności migracyjne (Mocellin i in. 2004).

### 1.3. Immunoterapia przeciwnowotworowa

Koncepcja wykorzystania naturalnych właściwości układu odpornościowego do walki z nowotworem powstała już pod koniec XIX w., kiedy to William Coley zaobserwował, że rozwijająca się u pacjenta z mięsakiem infekcja bakteryjna doprowadziła do całkowitego zaniku nowotworu. W ramach terapii przeciwnowotworowej, postanowił on wstrzykiwać mieszaninę martwych bakterii *Streptococcus pyogenes* oraz *Serratia marcescens* bezpośrednio do guzów, powodując pobudzenie układu odpornościowego. Choć nie u wszystkich pacjentów terapia przyniosła oczekiwany efekt, u niektórych doprowadziła do całkowitego wyleczenia. Prowadzone przez wiele lat badania z zakresu immunologii nowotworów znacznie poszerzyły wiedzę na temat mechanizmów odporności biorących udział w procesie kancerogenezy, a immunoterapia stała się obecnie jedną z najbardziej obiecujących strategii stosowanych w walce z chorobami nowotworowymi.



Wśród strategii terapeutycznych opartych na wykorzystaniu komponentów układu odpornościowego można wyróżnić dwie formy immunoterapii: bierną i czynną. W immunoterapii biernej efekt leczniczy uzyskuje się poprzez bezpośrednie oddziaływanie na komórki nowotworowe. W tym rodzaju terapii wykorzystywane są zarówno przeciwciała monoklonalne wykazujące swoistość wobec antygenów nowotworowych lub receptorów występujących na powierzchni komórek nowotworowych, jak również aktywowane lub modyfikowane w warunkach *in vitro* komórki układu odpornościowego np. komórki typu TIL (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*) lub limfocyty CAR-T (ang. *chimeric antigen receptor T cells*) (Galluzzi i in. 2014). W immunoterapii czynnej, efekt terapeutyczny uzyskuje się natomiast w sposób pośredni, poprzez aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza. W metodzie tej stosowane są czynniki immunostymulujące w postaci rekombinowanych cytokin, przeciwciał hamujących szlaki immunologicznych punktów kontroli lub inhibitorów cytokin supresorowych. Ponadto, wykorzystywane są komórkowe szczepionki przeciwnowotworowe zawierające napromieniowane, autologiczne lub allogeniczne komórki nowotworowe, stanowiące bezpośrednio źródło antygenów nowotworowych, bądź komórki dendrytyczne, stymulowane w warunkach *in vitro*, zdolne do prezentacji antygenów nowotworowych i skutecznej aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej (Galluzzi i in. 2014). Oprócz komponentów układu odpornościowego, coraz częściej rozważa się stosowanie cytostatyków w niskich dawkach jako uzupełnienie schematów immunoterapii przeciwnowotworowej. Wykazano bowiem, że niektóre z powszechnie stosowanych leków, w tym antracykliny, pochodne platyny oraz leki o działaniu alkilującym, mogą działać immunomodulująco, jeśli zostaną podane w odpowiedniej dawce (Opzooomer i in. 2019). Z uwagi na coraz to większą różnorodność form immunoterapii oraz ze względu na tematykę niniejszej pracy, poniżej omówiono wybrane zagadnienia dotyczące możliwości wykorzystania w immunoterapii szczepionek komórkowych zawierających DC, inhibitorów IL-10, jak również cyklofosfamidu (CY) stosowanego w dawkach wspomagających skuteczną reaktywację układu odpornościowego.

### **1.3.1. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii**

#### *1.3.1.1. Rola komórek dendrytycznych w indukcji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej*

Komórki dendrytyczne, obok limfocytów B oraz makrofagów, stanowią populację profesjonalnych komórek prezentujących antygen, które są odpowiedzialne za aktywację i regulację swoistej odpowiedzi odpornościowej. Wśród DC można wyróżnić dwie główne subpopulacje komórek: mieloidalne, zwane także konwencjonalnymi (cDC) oraz plazmocytoidalne (pDC) (Strioga i in. 2013). Komórki dendrytyczne powstają w szpiku kostnym z mieloidalnych (cDC, pDC) oraz limfoidalnych (pDC) komórek progenitorowych. Plazmocytoidalne DC, które po opuszczeniu szpiku trafiają do naczyń krwionośnych i migrują do tkanek limfatycznych, biorą

udział przede wszystkim w odpowiedzi przeciwwirusowej, mogą jednak również wspomagać odpowiedź przeciwnowotworową poprzez wydzielanie interferonów typu I. Konwencjonalne DC stanowią natomiast populację komórek wyspecjalizowanych w pochłanianiu, przetwarzaniu i prezentacji antygenów, dlatego też zasiedlają zarówno tkanki limfatyczne, jak i Nielimfatyczne (Gardner i Ruffell 2016; Merad i in. 2013). W trakcie wędrówki po organizmie, niedojrzałe DC pochłaniają napotkane antygeny wykorzystując mechanizmy fagocytozy i makropinocytozy (Mellman 2013). Pochłonięte antygeny są przetwarzane i w postaci krótkich peptydów tworzą kompleksy z cząsteczkami MHC I i MHC II, które następnie są prezentowane na powierzchni DC (Vyas i in. 2008). Chociaż DC w formie niedojrzałej wykazują ekspresję MHC, to na tym etapie pochłanianie antygenów są wolno procesowane, a tworzenie kompleksów peptyd-MHC jest mało wydajne. Niedojrzałe DC wykazują również niewielką zdolność do wydzielania cytokin oraz niski poziom ekspresji cząsteczek kostymulujących, co powoduje, że nie są one zdolne do aktywacji limfocytów T (Mellman 2013). Proces dojrzewania DC jest inicjowany przez czynniki rozpoznawane jako obce lub związane z uszkodzeniem tkanek. Cząsteczki pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego, zaliczane do tzw. molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMP) są ligandami receptorów rozpoznających wzorce (ang. *pattern-recognition receptors*, PRR), do których należą m. in. receptory toll-podobne występujące na powierzchni DC. Do tzw. wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMP) zalicza się natomiast występujące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej ATP, białko HMGB1 (ang. *high mobility group box 1*), wolne DNA i RNA oraz obecne na powierzchni martwych komórek białka szoku cieplnego i kalretikulinę. Komórki dendrytyczne mogą rozpoznawać jako DAMP także zmienione antygeny własne, które występują na powierzchni komórek nowotworowych (Strioga i in. 2013). Podczas dojrzewania DC tracą zdolność do pochłaniania nowych antygenów. Pochłonięte antygeny są przetwarzane, a następnie prezentowane w kontekście MHC na powierzchni komórek. Rośnie poziom ekspresji cząsteczek kostymulujących, a także zdolność DC do wydzielania cytokin. Ponadto, poprzez zwiększoną ekspresję receptora CCR7, którego ligandami są chemokiny CCL19 i CCL21 wydzielane przez komórki śródbłonna naczyń limfatycznych oraz komórki strefy przykorowej węzłów chłonnych, DC migrują w kierunku wtórnych narządów limfatycznych (Worbs i in. 2017).

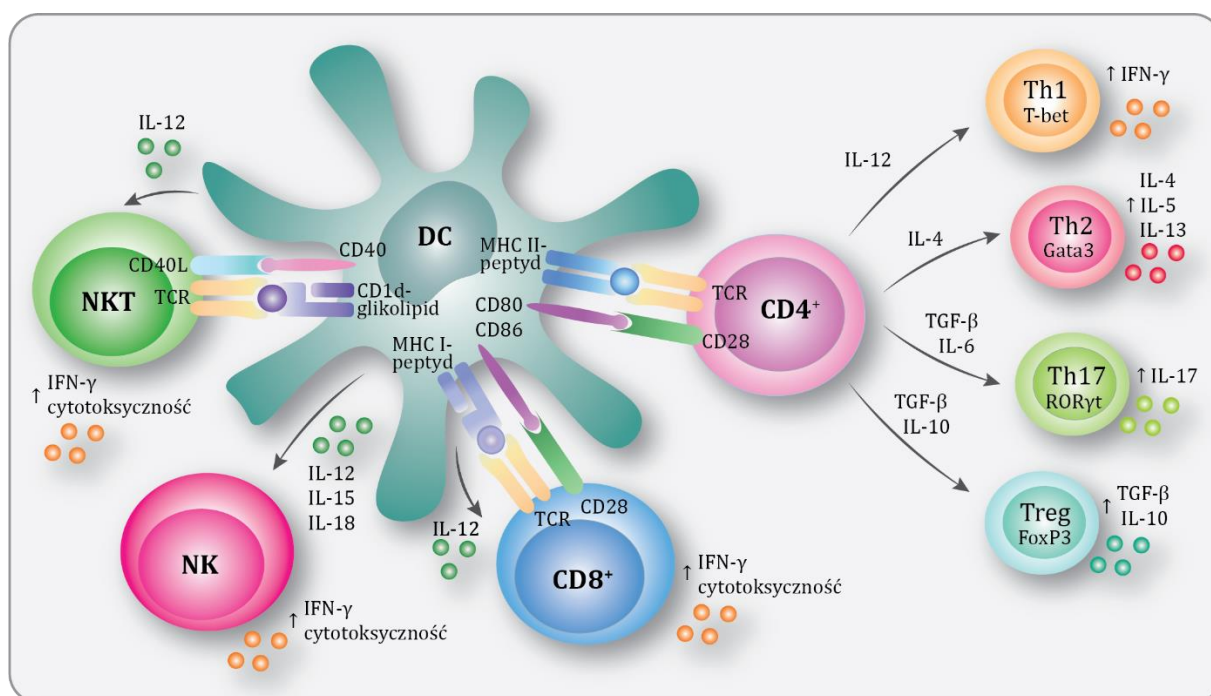
Po dotarciu do węzłów chłonnych, dojrzałe i pobudzone DC prezentują antygeny limfocytom T poprzez utworzenie synapsy immunologicznej w miejscu bezpośredniego kontaktu dwóch komórek. W procesie tworzenia funkcjonalnej synapsy biorą udział receptory oraz ligandy obecne na powierzchni DC i limfocytów T, a także liczne integryny, które stabilizują połączenie pomiędzy komórkami (Dustin 2014). Centrum synapsy stanowią kompleksy peptyd-MHC, które oddziałują z receptorami TCR obecnymi na powierzchni limfocytów T. Jest to tzw. pierwszy sygnał niezbędny do utworzenia synapsy, który zapewnia rozpoznanie antygeny. Do aktywacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> dochodzi podczas prezentacji antygenów egzogennych w kontekście cząsteczek MHC II. Z kolei, limfocyty T CD8<sup>+</sup> są aktywowane na skutek prezentacji antygenów endogennych

w kontekście cząsteczek MHC I. DC wykorzystują również zjawisko prezentacji krzyżowej, podczas której antygeny egzogenne są prezentowane limfocytom T CD8<sup>+</sup> w kontekście cząsteczek MHC I. Ma to szczególne znaczenie w procesie aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od CTL. Oprócz rozpoznania kompleksu MHC-peptyd przez TCR, do prawidłowej aktywacji dziewiczych limfocytów T konieczne jest oddziaływanie między cząsteczkami kostymulującymi występującymi na powierzchni APC i limfocyta T. Oddziaływania te zapewniają tzw. drugi sygnał, który gwarantuje skuteczną prezentację antygeny. Do najważniejszych cząsteczek kostymulujących należą białka B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86), które oddziałują z cząsteczką CD28 obecną na powierzchni limfocytów T (Hathcock i in. 1994) (ryc. 3). Do sygnałów wpływających na zwiększenie wydajności aktywacji limfocytów T należy także oddziaływanie cząsteczki CD40 z CD40L na powierzchni limfocytów T, które prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji cząsteczek kostymulujących na powierzchni DC, podwyższenia zdolności do produkcji cytokin, a także promowania prezentacji krzyżowej antygenów egzogennych w kontekście cząsteczek MHC I (Elgueta i in. 2009). Brak sygnału kostymulującego podczas prezentacji antygeny prowadzi do przerwania kontaktu pomiędzy dziewiczym limfocytym T a DC i przejściem limfocyta w stan anergii (Lechner i in. 2011).

Trzeci sygnał warunkujący prawidłowe funkcjonowanie synapsy immunologicznej stanowią cytokiny, które nadają kierunek polaryzacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> (ryc. 3). Interleukina 12, wytwarzana przez DC, indukuje za pośrednictwem STAT4 ekspresję czynnika transkrypcyjnego T-bet w limfocytach T CD4<sup>+</sup>, który powoduje ich różnicowanie w kierunku komórek typu Th1 zdolnych do wydzielania IFN- $\gamma$  (Lazarevic i in. 2013). Limfocyty Th1 promują odpowiedź komórkową biorącą udział w eliminacji patogenów wewnątrzkomórkowych, indukują także odpowiedź przeciwnowotworową, przez co ich aktywacja jest pożądanym efektem w immunoterapii (Terhune i in. 2013). Z kolei, w obecności IL-4 dziewicze limfocyty T CD4<sup>+</sup> różnicują się w kierunku komórek typu Th2 odpowiedzialnych za pobudzenie odpowiedzi humoralnej. Oddziaływanie IL-4 z receptorem powoduje uruchomienie szlaku sygnałowego zależnego od STAT6, który indukuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego GATA3 odpowiadającego za zdolność limfocytów typu Th2 do produkcji IL-4, IL-5 oraz IL-13 (Zhu 2018). Natomiast cytokiny o aktywności supresorowej, takie jak TGF- $\beta$  i IL-10 indukują ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w dziewiczych limfocytach T CD4<sup>+</sup>, przez co różnicują się one w kierunku limfocytów Treg zdolnych do produkcji IL-10 i TGF- $\beta$ . Gdy w środowisku, oprócz TGF- $\beta$  obecne są takie cytokiny jak IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-21 i IL-23 zachodzi polaryzacja w kierunku Th17. Pod wpływem czynnika transkrypcyjnego ROR $\gamma$ t, limfocyty Th17 wydzielają IL-17, która promuje produkcję cytokin i chemokin odpowiedzialnych za rekrutację neutrofilów w miejsce występowania infekcji bakteryjnej czy grzybiczej. Limfocyty Th17 obecne w TME pobudzają natomiast komórki śródbłonna i fibroblasty do produkcji VEGF i tym samym indukują proces neowaskularyzacji (Guéry i Hugues 2015; Martin-Orozco i in. 2009). Należy podkreślić, że

ekspresja czynników transkrypcyjnych warunkujących przynależność limfocytu T CD4<sup>+</sup> do subpopulacji o określonej funkcji może podlegać dynamicznym zmianom, co determinuje zmienność funkcjonalną limfocytów T CD4<sup>+</sup> znajdujących się w określonych warunkach (Zhu 2018).

Komórki dendrytyczne, oprócz aktywacji limfocytów T są zdolne również do pobudzenia komórek NK i NKT (ryc. 3). Wydzielane przez DC IL-12, IL-18, IL-15 oraz IFN typu I stymulują proliferację komórek NK, wpływają także na zwiększenie ich aktywności cytotoksycznej oraz zdolności do produkcji IFN- $\gamma$  (Ferlazzo i Morandi 2014). Z drugiej strony, komórki NK wspomagają dojrzewanie DC poprzez wydzielanie IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , mogą również regulować odpowiedź poprzez eliminację DC wykazujących niski poziom ekspresji MHC I (Gerosa i in. 2002; Moretta 2002). Z kolei, komórki NKT są aktywowane przez DC podczas prezentacji antygenów glikolipidowych w kontekście cząsteczek CD1d. Wydzielana przez DC IL-12 stymuluje komórki NKT do produkcji IFN- $\gamma$  (Keller i in. 2017). Natomiast poprzez oddziaływanie cząsteczek CD40 i CD40L, komórki NKT indukują wydzielanie IL-12 przez DC i promują ich dojrzewanie (Wolf i in. 2018).



**Ryc. 3.** Aktywacja limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, komórek NK i NKT przez komórki dendrytyczne. Rozwinięcie zastosowanych skrótów przedstawiono w wykazie skrótów. Opracowanie własne.

### 1.3.1.2. Metody przygotowania szczepionek terapeutycznych zawierających komórki dendrytyczne

Pierwsze próby wykorzystania komórek dendrytycznych w celu aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej u pacjentów zostały przeprowadzone w połowie lat 90.

(Mukherji i in. 1995). Od tamtej pory przeprowadzono kilkaset prób klinicznych, których celem było sprawdzenie bezpieczeństwa stosowania i skuteczności szczepionek zawierających komórki dendrytyczne. Z bazy badań klinicznych (ClinicalTrials.gov) wynika, że ponad 20 zarejestrowanych prób klinicznych dotyczących stosowania DC w formie terapii u pacjentów z rakiem jelita grubego, rakiem prostaty, czerniakiem, glejakiem wielopostaciowym, rakiem jajnika, niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz rakiem nerki jest w III lub IV fazie badań.

Najczęściej wykorzystywaną metodą pozyskiwania DC do terapii przeciwnowotworowej jest ich różnicowanie z komórek prekursorowych w warunkach *ex vivo*. W przypadku badań prowadzonych na mysich modelach nowotworów, DC uzyskuje się w trakcie hodowli komórek izolowanych ze szpiku kostnego prowadzonej w obecności GM-CSF i IL-4. Metoda ta pozwala na otrzymanie dużej liczby niedojrzałych konwencjonalnych DC, które poddane odpowiedniej stymulacji stają się zdolne do indukcji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej (Mayordomo i in. 1997). W badaniach klinicznych najczęściej wykorzystywanym sposobem pozyskiwania DC jest utrzymywanie monocytów CD14<sup>+</sup>, izolowanych z krwi obwodowej pacjentów lub dawców, w kilkudniowej hodowli zawierającej GM-CSF i IL-4. Istnieje również możliwość różnicowania DC w warunkach *ex vivo* z prekursorowych komórek hematopoetycznych CD34<sup>+</sup>, których separacja z krwi obwodowej wymaga uprzedniej mobilizacji komórek szpiku kostnego za pomocą G-CSF (Sabado i in. 2017). Skuteczność immunoterapii na bazie DC jest uzależniona od zdolności tych komórek do indukowania swoistych wobec antygenów nowotworowych limfocytów T cytotoksycznych oraz limfocytów Th1. Dlatego też, niezbędnym etapem w procedurze wytwarzania szczepionkowych komórek dendrytycznych jest dostarczenie antygenów związanych z nowotworem (ang. *tumor-associated antigens*, TAA). Najczęściej, niedojrzałe DC poddaje się stymulacji antygenami w postaci pojedynczych peptydów, całych białek lub lizatu komórek nowotworowych. Inną strategią jest wprowadzenie mRNA kodującego wybrany antygen nowotworowy do DC za pomocą transfekcji lub transdukcji wektorami wirusowymi (Constantino i in. 2016).

Immunoterapia oparta na komórkach dendrytycznych jest bezpieczna i najczęściej wywołuje jedynie łagodne efekty uboczne, takie jak wysypka i ból w miejscu iniekcji oraz objawy grypopodobne (Anguille i in. 2014). Pierwsza zatwierdzona przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) szczepionka zawierająca komórki dendrytyczne Sipuleucel-T jest uzyskiwana podczas hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej prowadzonej w obecności rekombinowanego białka fuzyjnego złożonego z kwaśnej fosfatazy prostaty i GM-CSF. Zastosowanie w ten sposób przygotowanej szczepionki komórkowej podczas trwającej 36 miesięcy III fazy prób klinicznych u pacjentów z hormonoopornym rakiem prostaty powodowało przedłużenie czasu przeżycia pacjentów o 4,1 miesiąca oraz zwiększenie odsetka pacjentów, którzy przeżyli czas obserwacji do 31,7% w porównaniu do 23% uzyskanego u pacjentów otrzymujących placebo (Kantoff i in. 2010). Jednym z powodów ograniczonej

skuteczności terapeutycznej DC jest obecność czynników immunosupresorowych w TME, które uniemożliwiają prawidłową aktywację mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej. W związku z tym, podejmowane są próby opracowania protokołów terapii skojarzonych, w których podania szczepionek zawierających DC uzupełnia się o inhibitory cytokin supresorowych, leki wspomagające eliminację komórek supresorowych, czy też przeciwciała blokujące szlaki sygnałowe immunologicznych punktów kontroli (Constantino i in. 2016).

### **1.3.2. Redukcja stężenia IL-10 w TME jako element terapii przeciwnowotworowej**

Interleukina 10, która hamuje proces aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej może być jednym z celów molekularnych terapii wspomagającej egzogenne DC. W badaniach przedklinicznych wykorzystuje się przeciwciała skierowane przeciwko IL-10 lub receptorowi tej cytokiny, wektory wyciszające ekspresję jednego z tych białek lub czynniki blokujące szlaki biorące udział w procesie wytwarzania cytokiny (Llopiz i in. 2018). Na rycinie 4 przedstawiono strategię terapeutyczne omówione w niniejszym podrozdziale.

We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez nasz zespół, oceniono wpływ ogólnoustrojowej eliminacji IL-10 na skuteczność terapii przeciwnowotworowej z udziałem cyklofosfamidu i DC. Doświadczenia prowadzone na modelu mysiego raka jelita grubego wykazały, że zastosowanie przeciwciał neutralizujących IL-10 przed podaniem szczepionek komórkowych przyczynia się do znacznej poprawy efektu terapeutycznego uzyskanego po leczeniu za pomocą CY i szczepionek zawierających DC. Rezultat ten był związany z obniżoną aktywnością supresorową MDSC i pobudzeniem cytotoksyczności komórek NK (Rossowska i in. 2015). Kalli i in. wykazali natomiast, że zastosowanie przeciwciał neutralizujących IL-10 u myszy obciążonych czerniakiem prowadzi do aktywacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> wykazujących ekspresję granzymów, a jednocześnie powoduje redukcję liczebności limfocytów Treg. Gdy myszy dodatkowo poddano immunizacji za pomocą komórek dendrytycznych stymulowanych peptydem gp100, obserwowano całkowite odrzucenie komórek nowotworowych (Kalli i in. 2013). Przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi IL-10 wpływały na aktywność DC infiltrujących guzy mysiego raka gruczołu piersiowego, co stwierdzili Ruffell i in. Zablockowanie oddziaływań IL-10 z receptorem powodowało zwiększenie produkcji IL-12 przez DC, a w rezultacie komórki te były zdolne do aktywacji limfocytów T cytotoksycznych. Pobudzenie odpowiedzi odpornościowej zależnej od CTL przyczyniło się do poprawy skuteczności chemioterapii z udziałem paklitakselu (Ruffell i in. 2014).

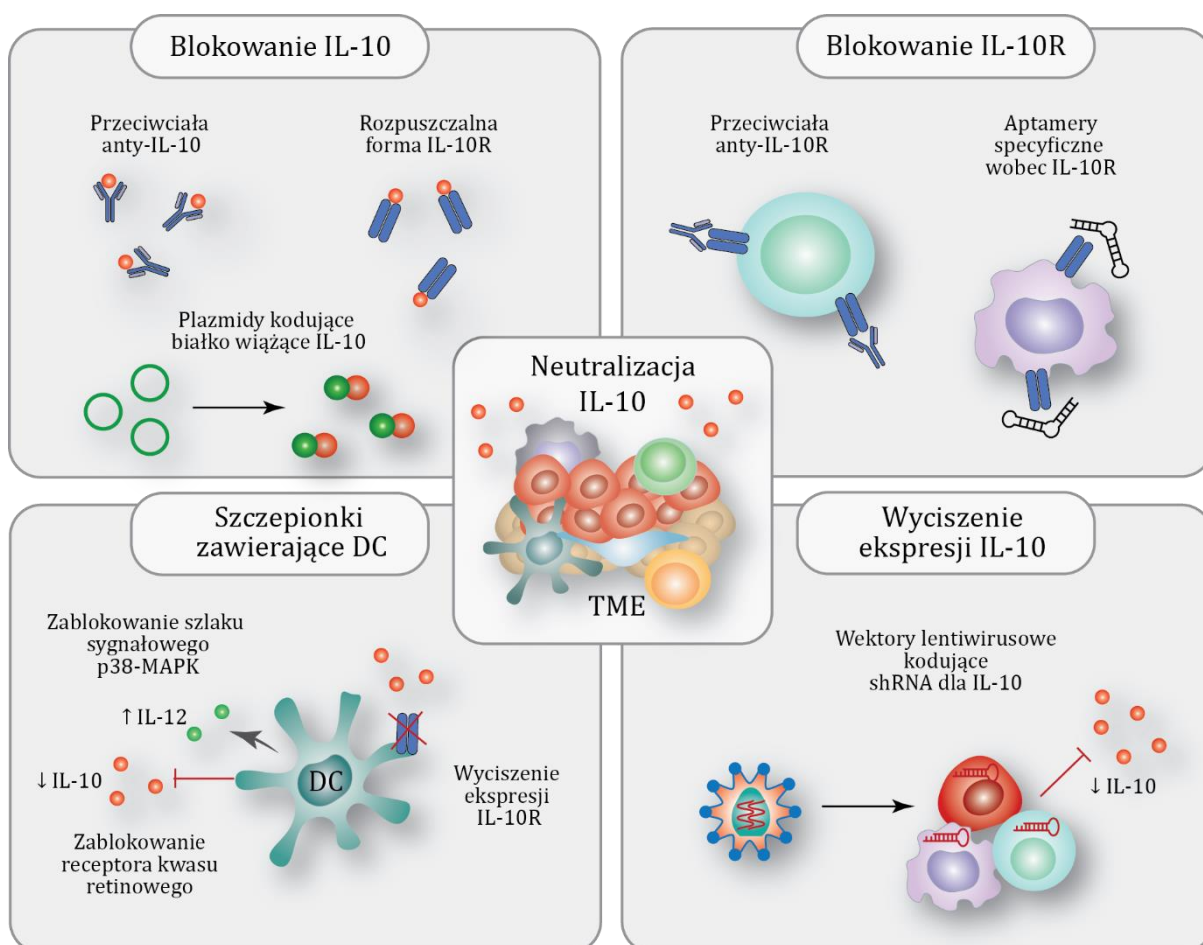
Alternatywą dla blokowania IL-10 za pomocą przeciwciał monoklonalnych, mogą być aptamery o strukturze RNA wiążące receptor IL-10 z wysoką specyficznością, które zastosowano w modelu mysiego raka jelita grubego. Zablockowanie u myszy oddziaływań IL-10 z receptorem za pomocą tych aptamerów skutkowało zahamowaniem wzrostu guzów podobnym do tego, które

uzyskano po podaniu przeciwciał anti-IL-10R (Berezhnoy i in. 2012). Ciekawą metodę neutralizacji IL-10 zaproponowali Shen i in., którzy zaprojektowali nanocząstki, składające się z plazmidów kodujących białko wiążące IL-10 umieszczonych w sferycznych nanonośnikach. Po podaniu opracowanych nanocząstek myszom z rakiem trzustki obserwowano ich akumulację w guzach nowotworowych. Blokowanie IL-10 w TME przyczyniło się do redukcji liczebności MDSC i makrofagów typu M2 o aktywności supresorowej, a indukowana odpowiedź przeciwnowotworowa zależna od CTL powodowała istotne zahamowanie wzrostu guzów (Shen i in. 2018). Marchi i in. opracowali szczepionki komórkowe zawierające DC modyfikowane genetycznie do produkcji rozpuszczalnej formy receptora tej cytokiny. Podskórne podanie myszom tak przygotowanych komórek przed wszczęciem komórek czerniaka wywołało wydłużenie czasu przeżycia zwierząt (Marchi i in. 2011).

Szczepionkowe DC mogą być poddane modyfikacjom genetycznym również w celu ograniczenia ich wrażliwości na działanie IL-10. Wyciszenie ekspresji receptora dla IL-10 w DC, poprzez wprowadzenie do komórek plazmidów kodujących sekwencje siRNA skierowane przeciwko IL-10R, znacznie zwiększyło ich potencjał do indukowania swoistych wobec antygenów nowotworowych limfocytów T cytotoksycznych (Kim i in. 2011; Ahn i in. 2015). Ponadto, podejmowane są próby wykorzystania DC, które na skutek odpowiedniej stymulacji w warunkach *ex vivo* wykazują zmieniony profil ekspresji cytokin. Zablockowanie szlaku sygnałowego p38-MAPK lub receptora kwasu retinowego w DC, które prowadziło do obniżenia poziomu produkcji IL-10, jednocześnie spowodowało zwiększenie poziomu wydzielania IL-12 przez te komórki. Po zastosowaniu przygotowanych w ten sposób DC w terapii myszy z czerniakiem obserwowano polaryzację odpowiedzi typu Th1 przy jednoczesnym obniżeniu liczebności limfocytów Treg (Jarnicki i in. 2008; Galvin i in. 2013).

Inhibitory IL-10 mogą być również wprowadzone do protokołów immunoterapii w sytuacji, gdy efektem wdrożonego leczenia jest wzmożona produkcja IL-10 przez aktywowane komórki układu odpornościowego. Llopiz i in. zaobserwowali, że szczepionki zawierające antygeny nowotworowe oraz ligandy receptora TLR7, zastosowane w mysim modelu czerniaka lub raka płuc, indukowały wzrost stężenia IL-10 w surowicy, a w rezultacie odnotowali jedynie niewielkie zahamowanie wzrostu guzów. Jednak po rozszerzeniu terapii o podawanie przeciwciał anti-IL-10R, blokujących oddziaływanie IL-10 z komórkami docelowymi, uzyskano znacząco poprawę efektu terapeutycznego, a analiza aktywności DC i limfocytów T w węzłach chłonnych wykazała pobudzenie odpowiedzi typu Th1 (Llopiz i in. 2015). Podwyższone stężenie IL-10 w surowicy oraz płynie wysiękowym odnotowano również u myszy obarczonych rakiem jajnika, które otrzymały immunoterapię w postaci przeciwciał anti-PD-1 (Lamichhane i in. 2017). Neutralizacja pojawiającej się w nadmiarze cytokiny skutkowałą zwiększoną aktywacją limfocytów T i B identyfikowanych w płynie wysiękowym, a jednocześnie redukcją liczebności MDSC infiltrujących guzy nowotworowe. Rezultatem obserwowanych zmian w odpowiedzi

odpornościowej było znaczne zwiększenie przeżywalności myszy, w porównaniu do myszy nietraktowanych, jak i otrzymujących przeciwciała anti-PD-1 w postaci monoterapii (Lamichhane i in. 2017).



**Ryc. 4.** Strategie terapeutyczne mające na celu redukcję aktywności supresorowej IL-10 w TME, stosowane w badaniach przedklinicznych. Rozwinięcie zastosowanych skrótów przedstawiono w wykazie skrótów. Opracowanie własne.

Należy również podkreślić, że ze względu na rolę IL-10 w hamowaniu nadmiernej reakcji układu odpornościowego, stosowanie ogólnoustrojowej neutralizacji IL-10 w terapii może prowadzić do pojawienia się efektów ubocznych związanych z autoagresją. Ponadto, biorąc pod uwagę, że IL-10 ma udowodnione znaczenie w funkcjonowaniu już aktywowanych limfocytów T cytotoksycznych, miejscowa redukcja stężenia tej cytokiny przed zastosowaniem szczepionek zawierających DC wydaje się być lepszym rozwiązaniem. Jedną z metod pozwalających na uzyskanie takiego efektu jest wyciszenie ekspresji genu IL-10 za pomocą dostarczanych miejscowo cząsteczek warunkujących interferencję RNA. Poniżej przedstawiono najważniejsze informacje związane ze zjawiskiem interferencji RNA oraz sposobami jego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej.



### 1.3.2.1. Interferencja RNA

Zjawisko interferencji RNA (RNAi) to mechanizm posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, który po raz pierwszy został wyjaśniony w 1998 r. przez zespół Fire'a i Mello (Fire i in. 1998). Wykorzystując w swoich badaniach nicienie *C. elegans* wykazali oni, że po iniekcji do dorosłego osobnika cząsteczek dwuniciowego RNA (ang. *double strand RNA*, dsRNA) komplementarnych do mRNA kodującego docelowe białko, zachodzą w nim zmiany fenotypowe świadczące o obniżonym poziomie ekspresji genu. Za swoje odkrycie, naukowcy zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Dalsze badania dowiodły, że ten proces może zachodzić również w komórkach ssaczy, co było podstawą do pierwszych prób wykorzystania technologii RNAi w eksperymentalnej terapii pacjentów cierpiących na nowotwory lite (Elbashir i in. 2001; Davis i in. 2010).

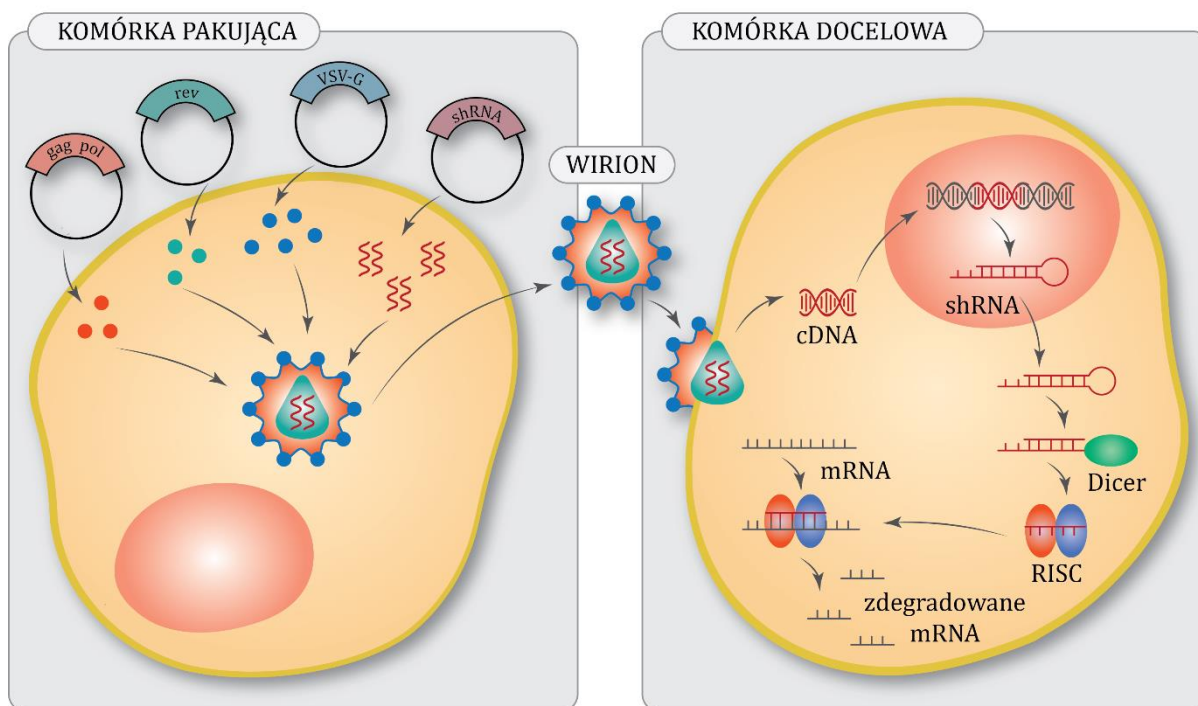
W zjawisku RNAi biorą udział cząsteczki krótkiego niekodującego RNA o długości 20-30 nukleotydów o sekwencji zbliżonej lub komplementarnej do sekwencji genu docelowego. W warunkach prawidłowych, do regulacji ekspresji genów komórki eukariotyczne wykorzystują endogenne cząsteczki mikroRNA (miRNA). W komórce mogą pojawić się także egzogenne cząsteczki siRNA (ang. *small interfering RNA*), powstałe w wyniku cięcia wirusowego dsRNA lub wprowadzone sztucznie w postaci wolnych cząsteczek albo za pomocą modyfikacji genetycznej prowadzącej do ekspresji shRNA (ang. *short hairpin RNA*) (Tomari i Zamore 2005; Bofill-De Ros i Gu 2016). Prekursory cząsteczek miRNA powstają w jądrze komórkowym w procesie transkrypcji przeprowadzanej przez polimerazę II w postaci cząsteczek pri-miRNA, które są następnie przekształcane w pre-miRNA zawierające strukturę spinki do włosów złożoną z fragmentu dwuniciowego RNA oraz pętli. Z kolei, transkrypcja wprowadzonej do genomu sekwencji kodującej shRNA, najczęściej jest przeprowadzana przez polimerazę III, która syntezuje cząsteczkę przypominającą swoją strukturą pre-miRNA (Bofill-De Ros i Gu 2016). W cytoplazmie, cząsteczki pre-miRNA lub shRNA są pozbawiane pętli przez endonukleazę Dicer zawierającą domenę rybonukleazy III rozpoznającą dwuniciowe RNA (Wilson i Doudna 2013). Tak przygotowane krótkie dwuniciowe cząsteczki RNA łączą się z białkiem Argonaute 2 (Ago2), które razem z białkiem wiążącym dsRNA (ang. *dsRNA-binding protein*, dsRBP) oraz Dicer tworzy kompleks RLC (ang. *RISC-loading complex*). Wiodąca nić RNA (ang. *guide strand*), która warunkuje selektywność mechanizmu interferencji RNA, jest rozpoznawana przez domeny PAZ i Mid białka Ago2, wiążące jej koniec 3' i 5' (Carthew i Sontheimer 2009). Druga z nici, zwana nicią towarzyszącą (ang. *passenger strand*) ulega natomiast degradacji. Białko Ago2 z przyłączoną wiodącą nicią RNA stanowi kompleks indukujący wyciszenie RISC (ang. *RSC-induced silencing complex*), który oddziałuje z docelową cząsteczką mRNA. W przypadku, gdy sekwencja nici wiodącej kompleksu RISC jest całkowicie komplementarna do fragmentu cząsteczki docelowej, następuje hydroliza mRNA przeprowadzona przez białko Ago2, które wykazuje aktywność

endonukleazy. W sytuacji, gdy sekwencja przyłączona do kompleksu RISC nie jest w pełni komplementarna do docelowego mRNA, może zachodzić zahamowanie translacji. Ten mechanizm jest najczęściej wykorzystywany przez endogenne miRNA identyfikowane u zwierząt (Fabian i in. 2010). Natomiast, w celu uzyskania wysokiej wydajności wyciszenia docelowego genu, wprowadzane do komórek sekwencje siRNA powinny być w pełni komplementarne do docelowego mRNA. Tak zaprojektowane cząsteczki siRNA oddziałują w sposób wysoce selektywny z mRNA, co minimalizuje ryzyko wyciszenia ekspresji genów innych niż docelowy, a także zapewnia, że w komórce mRNA ulegnie degradacji przez kompleks RISC, co jest wydajniejszym mechanizmem niż proces prowadzący do zahamowania translacji (Bofill-De Ros i Gu 2016). Na rycinie 5 przedstawiono schemat mechanizmu wyciszenia ekspresji docelowego genu poprzez shRNA.

### 1.3.2.2. Metody dostarczania siRNA

Wraz z postępem w rozumieniu mechanizmów uczestniczących w procesie RNAi, metody oparte na tym zjawisku stały się nie tylko preferencyjnym narzędziem stosowanym do analizy funkcji genów, ale również znalazły zastosowanie w nowych terapiach genowych. Dzięki opracowaniu metod dostarczania cząsteczek efektorowych RNAi, w ostatnich latach podjęto próby zastosowania tej technologii w terapiach przeciwnowotworowych, które są przedmiotem licznych badań klinicznych (Chen i in. 2018).

Zastosowanie wolnych cząsteczek siRNA wiąże się z wieloma ograniczeniami. Przede wszystkim, cząsteczki te wykazują ujemny ładunek, a także są silnie hydrofilowe, przez co wykazują niewielką zdolność do przekraczania błony komórkowej. Ponadto, wykazują one bardzo niską stabilność w układzie *in vivo*. Po podaniu ogólnoustrojowym, są szybko degradowane przez enzymy o aktywności nukleazowej. Mogą być również skutecznie eliminowane przez komórki fagocytyczne, które rozpoznają cząsteczki dsRNA poprzez receptory TLR (Singh i in. 2018; Mansoori i in. 2016). Z tego względu, podjęto próby modyfikacji chemicznych cząsteczek siRNA, a także opracowano nośniki, dzięki którym zwiększono ich biodostępność oraz stabilność. Poddanie odpowiednim modyfikacjom wiązań fosfodiesterowych, grup cukrowych lub przyłączanie dodatkowych grup chemicznych do końców 3' lub 5' cząsteczek siRNA może prowadzić do zwiększenia odporności na działanie nukleaz, a także może zwiększać ich zdolność do przedostawania się do wnętrza komórek (Selvam i in. 2017). Jako nośniki cząsteczek siRNA wykorzystuje się liposomy, organiczne polimery, takie jak cyklodekstryny, dendrymery, polietylenoimina czy chitozan, a także cząsteczki nieorganiczne, takie jak nanorurki, czy nanocząsteczki złota (Singh i in. 2018). Inną strategią dostarczania cząsteczek RNAi jest modyfikacja genetyczna docelowych komórek za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących sekwencję shRNA (ryc. 5).



**Ryc. 5.** Schemat przedstawiający wykorzystanie komórek pakujących do produkcji wektorów lentiwirusowych trzeciej generacji kodujących shRNA wyciszające ekspresję genu w komórce docelowej. Rozwinięcie zastosowanych skrótów przedstawiono w wykazie skrótów. Na podstawie Manjunath i in. 2009.

### 1.3.2.3. Wektory lentiwirusowe jako nośniki shRNA

Zastosowanie wektorów wirusowych do modyfikacji genetycznej komórek niesie ze sobą korzyści związane z naturalnymi właściwościami wirusów, które dostarczają swój materiał genetyczny do komórki, a następnie wykorzystują jej maszynę białkową do dalszej replikacji. Rozwój technik molekularnych, a także dokładne poznanie biologii wirusów umożliwiło opracowanie nośników informacji genetycznej opartych na tych cząsteczkach. Najpowszechniej stosowanymi wektorami wirusowymi są te pochodzące z rodziny *retroviridae*, do których należą proste  $\gamma$ -retrowirusy i bardziej złożone lentiwirusy. Wirusy z rodziny *retroviridae* są zdolne do integracji informacji genetycznej z genomem gospodarza, co czyni je użytecznym narzędziem do modyfikacji genetycznych skutkujących stabilną i długotrwałą ekspresją wbudowanych genów. Jednak, pierwsze próby kliniczne z zastosowaniem wektorów opartych na  $\gamma$ -retrowirusach pokazały, że choć poprzez dostarczenie genów możliwe jest leczenie schorzeń o podłożu genetycznym, taka terapia może wywołać niepożądane efekty uboczne w postaci rozwoju chorób rozrostowych układu krążenia (Cavazzana-Calvo i in. 2000; Hacein-Bey-Abina i in. 2003; Howe i in. 2008). Ze względu na tendencję  $\gamma$ -retrowirusów do integracji w pobliżu sekwencji protoonkogenów, mogą one powodować mutagenезę insercyjną, która prowadzi do transformacji nowotworowej zainfekowanych komórek. Inną wadą wektorów opartych na  $\gamma$ -retrowirusach jest ich niezdolność do wbudowania przenoszonej informacji do materiału genetycznego komórek dzielących się. Nie posiadają one bowiem mechanizmu umożliwiającego przedostanie się

wirusowego cDNA przez błonę jądrową, co powoduje, że integracja może zachodzić tylko podczas podziałów mitotycznych komórek. Tych problemów można uniknąć stosując wektory oparte na lentiwirusach. Wyróżniają się one bardziej złożonym genomem niż  $\gamma$ -retrowirusy, zawierającym dodatkowe geny odpowiedzialne za regulację poszczególnych etapów infekcji. Choć z jednej strony wiąże się to z koniecznością stosowania bardziej skomplikowanego systemu do uzyskania funkcjonalnych wektorów lentiwirusowych, z drugiej strony umożliwia większą regulację procesu transdukcji komórek docelowych, a także pozwala na przenoszenie transgenów o długości aż do 9 kbp (Vannucci i in. 2013). Najczęściej integracja materiału genetycznego przenoszonego przez lentiwirusy zachodzi w aktywnych transkrypcyjnie regionach chromatyny, a nie w pobliżu promotorów genów, dzięki czemu wykorzystanie wektorów lentiwirusowych niesie ze sobą niższe ryzyko mutageny inercyjnej (Desfarges i Ciuffi 2010). Ponadto, wykształciły one mechanizm pozwalający na transport kompleksu przedintegracyjnego (ang. *preintegration complex*, PIC) zawierającego wirusowe cDNA przez błonę jądrową, dzięki czemu są zdolne do transdukcji zarówno dzielących, jak i dzielących się komórek (Piller, Caly, i Jans 2003). Najczęściej stosowane wektory lentiwirusowe oparte są na genomie ludzkiego wirusa niedoboru odporności 1 (ang. *human immunodeficiency virus 1*, HIV-1).

Materiał genetyczny wirusa HIV-1 jest złożony z dwóch kopii jednoniciowego RNA o dodatniej polarności ((+)ssRNA). Po fuzji osłonki wirusowej z błoną komórki docelowej i przemieszczeniu się do cytoplazmy otoczonego przez kapsyd materiału genetycznego wirusa HIV-1, ulega on odwrotnej transkrypcji. Zsyntezowane cDNA jest transportowane do jądra, a następnie ulega integracji z genomem gospodarza i jako prowirus zawierający własne elementy regulatorowe jest przekazywany do komórek potomnych. Genom wirusa HIV-1 zawiera sekwencje genów *gag*, *pol* i *env*, które kodują białka odpowiedzialne za strukturę, integrację oraz replikację wirusa. Białka strukturalne, do których należą białka macierzy i kapsydu, są kodowane przez gen *gag*. Gen *pol* koduje białka biorące udział w procesie odwrotnej transkrypcji i integracji materiału genetycznego oraz dojrzewania wirionów. Z kolei, gen *env* koduje glikoproteiny, z których zbudowana jest otoczka lentiwirusów determinująca ich tropizm (Liechtenstein i in. 2013). Prowirus HIV-1 zawiera również sekwencje genów kodujących białka regulatorowe i pomocnicze, do których należą *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *rev* oraz *tat*. Na końcu 5' oraz 3' prowirusa znajdują się sekwencje LTR (ang. *long terminal repeats*), złożone z regionów U3, R oraz U5, zawierających elementy *cis* regulujące transkrypcję oraz integrację. Do elementów *cis* należą także znajdujące się poza regionami LTR sygnały pakowania ( $\Psi$ ) i dimeryzacji RNA (ang. *dimeryzation signal*, DIS), polipurynowy region centralny (ang. *central polypurine tract*, cPPT), centralna sekwencja terminacyjna (ang. *central termination sequence*, CTS), element odpowiedzi Rev (ang. *Rev response element*, RRE) oraz region bogaty w zasady purynowe (ang. *polypurine tract*, PPT) (Pluta i Kacprzak 2009).

Aby zminimalizować ryzyko, jakie niesie ze sobą zastosowanie wektorów wirusowych, przez lata udoskonalano system dostarczania elementów genomu wirusowego do komórek pakujących, kolejno usuwając sekwencje odpowiedzialne za wirulencję. Wraz z kolejnymi generacjami systemu lentiwirusowego, dokonano rozdziału elementów regulatorowych *cis* oraz białek strukturalnych i pomocniczych oddziałujących w układzie *trans*, które umieszczono na oddzielnych plazmidach. Początkowo wektory lentiwirusowe zawierały pełną sekwencję cDNA wirusów, z której usunięto jedynie gen *env*, a glikoproteiny otoczki wirusa dostarczano przez zastosowanie komórek pakujących wykazujących ekspresję glikoprotein otoczki lub kotransfekcję drugim plazmidem. Zastąpienie genu glikoproteiny wirusa HIV-1 genem kodującym białko otoczki pochodzącym z innego wirusa, zwane pseudotypowaniem, umożliwia poszerzenie tropizmu lentiwirusów. Już w latach 90. dowiedziono, że możliwe jest otrzymanie funkcjonalnych wirionów zawierających w otoczce zmodyfikowane lub pochodzące z innego wirusa białko (Page i in. 1990; Landau i in. 1991). Do dziś, jednym z najczęściej stosowanych genów kodujących otoczkę wektorów lentiwirusowych jest gen glikoproteiny G wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. *vesicular stomatitis virus G glycoprotein*, VSV-G), która oddziałuje z receptorem LDL (ang. *low density lipoprotein*) występującym na wielu rodzajach komórek (Burns i in. 1993). Prace nad opracowaniem wektorów lentiwirusowych niezdolnych do replikacji doprowadziły do powstania systemu złożonego z trzech składowych: plazmidu transferowego, zawierającego elementy LTR, sygnał  $\Psi$ , RRE oraz transgen, plazmidu pakującego oraz plazmidu kodującego otoczkę. Plazmid pakujący zawierał sekwencje genów *gag*, *pol*, *rev* oraz *tat*, a w systemie drugiej generacji został pozbawiony genów *vif*, *vpr*, *vpu* i *nef* kodujących białka pomocnicze (Zufferey i in. 1997). Poprzez dalsze modyfikacje opracowano system trzeciej generacji, w którym otrzymuje się wektory samoinaktywujące (ang. *self-inactivating vectors*, SIN). Tę cechę uzyskano dzięki wprowadzeniu delekcji w regionie U3 3'LTR kodowanym przez plazmid transferowy. Podczas infekcji komórki docelowej, wadliwy fragment 3'LTR jest przenoszony do regionu 5'LTR w trakcie odwrotnej transkrypcji, przez co po integracji z genomem, transkrypcja pełnego prowirusa nie jest możliwa, a zachodzi jedynie ekspresja transgeny kontrolowana przez wewnętrzny promotor (Zufferey i in. 1998). Ponadto, system pakujący rozdzielono na dwa plazmidy, z których jeden koduje geny *gag* i *pol*, a drugi *rev*. Brak konieczności umieszczenia genu *tat* uzyskano poprzez częściowe zastąpienie regionu 5'LTR silnym promotorem, takim jak CMV lub RSV. Czwarty plazmid koduje glikoproteiny otoczki, najczęściej VSV-G, co warunkuje zdolność uzyskanych wektorów do infekcji szerokiego spektrum komórek. Wektory lentiwirusowe są produkowane przez komórki pakujące kotransfekowane wymienionymi plazmidami. W komórkach tych następuje złożenie niezdolnych do replikacji wirionów, dzięki czemu po transdukcji komórek docelowych, uzyskuje się jedynie ekspresję genów zawartych w wektorze transferowym.

Zastosowanie wektorów lentiwirusowych do dostarczania cząsteczek efektorowych RNAi umożliwia uzyskanie długoterminowego efektu wyciszenia ekspresji docelowego genu. Cząsteczki

siRNA mogą być dostarczane do komórek docelowych w postaci sekwencji kodującej shRNA, które po transkrypcji jest przetwarzane przez endogenne białka biorące udział w procesie kontroli ekspresji genów przez miRNA (Paddison i in. 2002). Fragment plazmidu transferowego, kodujący cząsteczkę shRNA zawiera sekwencję nici towarzyszącej siRNA, po której następuje krótki fragment stanowiący strukturę pętli, sekwencja nici wiodącej siRNA komplementarna do docelowego mRNA oraz sekwencja terminatorowa zawierająca pięć tymidyn (Bofill-De Ros i Gu 2016). Aby uzyskać w komórce ekspresję cząsteczek niekodującego RNA, niezbędne jest wykorzystanie sekwencji promotora rozpoznawanego przez polimerazę RNA III. Cząsteczka shRNA zsyntezowana przez polimerazę III nie zawiera kapu na końcu 5' oraz ogona Poli-A na końcu 3', dzięki czemu może być poddana dalszemu procesowaniu przez endonukleazę Dicer (Manjunath i in. 2009). Najczęściej stosowanymi do ekspresji shRNA promotorami są U6 oraz H1. Wykorzystanie jednego z tych promotorów gwarantuje uzyskanie wydajnej produkcji cząsteczek shRNA, jednak U6 jest silniejszy, przez co może powodować toksyczność związaną z wysyceniem maszyneryi białkowej uczestniczącej w procesowaniu endogennego miRNA.

### **1.3.3. Immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu**

Cyklofosfamid jest cytostatykiem z grupy oksazafosforyn o działaniu alkilującym. Lek jest podawany w nieaktywnej farmakologicznie formie, a następnie ulega zmianom metabolicznym w wątrobie w wyniku działania oksydaz cytochromu P450. Powstały w ten sposób 4-hydroksycyklofosfamid ulega w komórkach rozpadowi na akroleinę oraz iperyt fosfoamidowy, które są odpowiedzialne za alkilację DNA i powstanie połączeń krzyżowych w obrębie helisy. W wyniku tych zmian dochodzi do zahamowania proliferacji komórek i indukcji apoptozy (Emadi i n. 2009). Cyklofosfamid stosowany w wysokich dawkach powoduje śmierć komórek nowotworowych, ale prowadzi także do uszkodzenia szpiku kostnego i związanej z tym pancytopenii i silnej immunosupresji. Natomiast, podczas terapii opartych na niskich dawkach tego leku, cyklofosfamid wykazuje działanie immunomodulujące względem komórek układu odpornościowego, przyczyniając się do aktywacji mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej (Abu Eid i in. 2016).

Jednym z mechanizmów warunkujących zdolność cyklofosfamidu do odnowy odpowiedzi przeciwnowotworowej jest selektywna eliminacja limfocytów T regulatorowych. Wykazano, że wielokrotne podania CY w niskich dawkach pacjentom z przerzutującymi nowotworami litymi, powodowały obniżenie liczebności limfocytów Treg, czemu towarzyszyło przywrócenie aktywności komórek NK oraz swoistych wobec antygenów nowotworowych limfocytów T (Ghiringhelli i in. 2007; Ge i in. 2012). Przyczyną wysokiej wrażliwości limfocytów Treg na cyklofosfamid jest prawdopodobnie obniżona zdolność tych komórek do neutralizacji cytostatyku. Jednym z mechanizmów umożliwiających usunięcie toksycznych dla komórki metabolitów

cyklofosfamidu jest koniugacja tych pochodnych z glutationem. Wykazano jednak, że limfocyty Treg charakteryzują się obniżonym poziomem wewnątrzkomórkowego ATP, co przekłada się na niewielką wydajność syntezy glutationu (Zhao i in. 2010). Niższy niż w innych komórkach poziom ATP w limfocytach Treg jest związany z jednym z mechanizmów immunosupresji wykorzystywanych przez te komórki. Limfocyty Treg wykazują bowiem ekspresję cząsteczek CD39 i CD73, które są ektonukleotydzami przeprowadzającymi konwersję ATP do ADP. Produktem tej reakcji jest adenozyzna, która hamuje proliferację efektorowych limfocytów T (Whiteside i in. 2011).

Cyklofosfamid bierze również udział w indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez wspomaganie aktywności DC. Wykazano, że cytostatyk indukuje proces immunogennej śmierci komórek nowotworowych (ang. *immunogenic cell death*, ICD), w wyniku którego w TME następuje akumulacja cząsteczek DAMP odpowiedzialnych za aktywację DC. Podczas ICD wywoływanej przez cyklofosfamid, dochodzi do translokacji kalretikuliny z retikulum endoplazmatycznego na powierzchnię komórki nowotworowej, co jest sygnałem dla DC do fagocytozy. Ponadto, dochodzi do uwalniania z martwych komórek białka HMGB1, które jest ligandem receptora TLR4 występującego na powierzchni DC. W efekcie, DC wydajnie pochłaniają antygeny nowotworowe, a następnie poprzez prezentację krzyżową aktywują swoistą odpowiedź przeciwnowotworową zależną od aktywności CTL (Schiavoni i in. 2011; Obeid i in. 2007; Apetoh i in. 2007). Zaobserwowano, że u myszy traktowanych cyklofosfamidem aktywacja DC zdolnych do krzyżowej prezentacji antygenów jest zależna od interferonów typu I, które pośrednio warunkują powstawanie odpowiedzi typu Th1 oraz różnicowanie limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> w komórki pamięci (Schiavoni i in. 2011; Sistigu i in. 2011). Radojcić i in. udowodnili również, że choć cyklofosfamid może powodować obniżenie liczebności komórek mieloidalnych, a w tym komórek dendrytycznych, to krótko po zastosowaniu cytostatyku następuje wzmożona proliferacja szpikowych komórek prekursorowych i ich różnicowanie w kierunku dojrzałych DC. Komórki te, zdolne do aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, są rekrutowane do TME, gdzie zastępują pulę wcześniej wyeliminowanych DC (Radojcić i in. 2010).

Ze względu na potencjał cyklofosfamidu do wspomagania odnowy odpowiedzi przeciwnowotworowej, obecnie prowadzone są badania nad opracowaniem protokołów terapii z udziałem tego cytostatyku w skojarzeniu z przeciwciałami skierowanymi na immunologiczne punkty kontroli, innymi cytostatykami, cytokinami immunostymulującymi lub transferem adopcyjnym limfocytów CAR-T. Trwają także badania kliniczne nad zastosowaniem cyklofosfamidu w połączeniu ze szczepionkami zawierającymi komórki dendrytyczne w terapii pacjentów z glejakiem wielopostaciowym, czerniakiem, rakiem gruczołu piersiowego czy pierwotnym rakiem wątroby (Vanmeerbeek i in. 2020).

Przytoczone wyniki badań przedklinicznych nad zastosowaniem inhibitorów IL-10 sugerują, że taka forma leczenia wspomaga mechanizmy odpowiedzi przeciwnowotworowej, dzięki czemu może stać się elementem schematów skojarzonych terapii. Dotychczas wykazano, że neutralizacja IL-10 może przyczynić się do zwiększenia skuteczności immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych, jak również konwencjonalnej chemioterapii (Ruffell i in. 2014; Kalli i in. 2013; Rossowska i in. 2015). Niniejsza praca stanowi próbę odpowiedzi na pytanie, czy zmiany zachodzące pod wpływem miejscowego wyciszenia ekspresji IL-10 oraz indukowane poprzez zastosowanie immunomodulującej dawki cyklofosfamidu, pozwolą na zniesienie supresji w mikrośrodkowisku nowotworu, a w rezultacie umożliwią szczepionkowym komórkom dendrytycznym pobudzenie silnej, swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej.



## 2. Założenia i cel pracy

Wieloletnie badania z zakresu immunologii nowotworów pozwoliły na opracowanie strategii terapeutycznych opartych na wykorzystaniu komponentów układu odpornościowego. Jedną z form immunoterapii przeciwnowotworowej są szczepionki zawierające komórki dendrytyczne. Poddane odpowiedniej stymulacji w warunkach *ex vivo*, DC są zdolne do aktywacji limfocytów T poprzez wydajną prezentację antygenów nowotworowych. Z przeprowadzonych do tej pory prób klinicznych wynika, że choć w większości przypadków DC pobudzają swoistą odpowiedź przeciwnowotworową, to długotrwały efekt terapeutyczny w postaci zahamowania rozwoju choroby jest obserwowany jedynie u niewielkiej części pacjentów. Jedną z przyczyn niezadowalającego efektu leczenia jest silnie immunosupresorowe mikrośrodowisko nowotworu, które powoduje zahamowanie aktywności komórek efektorowych aktywowanych przez szczepionkowe DC. Dlatego też, podejmowane są próby opracowania protokołów terapii skojarzonych, w których podaniem szczepionek komórkowych towarzyszy neutralizacja czynników supresorowych w nowotworze. Potencjalnym celem takiej immunoterapii jest interleukina 10, która wykazuje właściwości pronowotworowe poprzez promowanie powstawania supresorowych TAM i limfocytów Treg, blokowanie wytwarzania cytokin typu Th1, a także hamowanie dojrzewania DC. Obecnie, schematy immunoterapii rozszerza się również o zastosowanie chemioterapeutyków, takich jak cyklofosfamid, który zastosowany w odpowiedniej dawce eliminuje komórki o charakterze supresorowym oraz indukuje proces immunogennej śmierci komórek nowotworowych, przez co przyczynia się do odnowy odpowiedzi odpornościowej.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu redukcji stężenia IL-10 w mikrośrodowisku nowotworowym na skuteczność chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamid i komórek dendrytycznych stosowanej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38. W doświadczeniach wykorzystano wektory lentiwirusowe trzeciej generacji kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko mRNA dla IL-10. Kolejne etapy badań obejmowały:

1. Określenie skuteczności wybranych sekwencji shRNA w wyciszaniu ekspresji IL-10;
2. Określenie aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10 w warunkach *in vitro*, a w tym:
  - ocenę wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania komórek dendrytycznych;
  - ocenę zdolności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10 do indukcji swoistej odpowiedzi komórkowej;

- 
3. Określenie aktywności komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego z wyciszoną ekspresją IL-10 w warunkach *in vitro*, a w tym:
    - ocenę wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania MDSC;
    - ocenę aktywności supresorowej MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 wobec limfocytów T;
  4. Określenie zmian w aktywności komórek układu odpornościowego zachodzących pod wpływem doguzowego podania wektorów wyciszających ekspresję IL-10, stosowanych samodzielnie lub w połączeniu z cyklofosfamidem, a w tym:
    - ocenę miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej na podstawie aktywności komórek układu odpornościowego w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych;
    - ocenę ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej określonej na podstawie aktywności komórek śledzionowych;
  5. Określenie efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających IL-10 oraz chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu, komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających IL-10, a w tym:
    - ocenę wpływu terapii na zahamowanie wzrostu guzów MC38;
    - ocenę miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej na podstawie analizy nacieku leukocytnego w guzach;
    - ocenę ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej na podstawie analizy aktywności komórek śledzionowych.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Materiały

#### 3.1.1. Myszy

W doświadczeniach wykorzystano 8-12 tygodniowe myszy szczepu C57BL/6 pochodzące z hodowli prowadzonej przez Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Doświadczenia przeprowadzono za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu (nr zgody 11/2015 oraz 33/2018).

#### 3.1.2. Podłoża hodowlane i czynniki wzrostowe

- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 GlutaMAX – Gibco; podłoże uzupełniano dodając roztwór pirogronianu sodu (Sigma, 1 mM), 2-merkaptoetanol (Sigma, 0,5  $\mu$ M), streptomycynę (Sigma, 100  $\mu$ g/ml) oraz penicylinę (Sigma, 100 U/ml);
- D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN; podłoże uzupełniano o glukozę (4,5 g/l), roztwór pirogronianu sodu (1 mM), L-glutaminę (Sigma, 2 mM), streptomycynę (100  $\mu$ g/ml) i penicylinę (100 U/ml);
- Opti-MEM GlutaMAX – Gibco; podłoże uzupełniano dodając streptomycynę (100  $\mu$ g/ml) i penicylinę (100 U/ml);
- FBS (Fetal Bovine Serum) – Sigma; inaktywowana bydlęca surowica płodowa
- rm GM-CSF (rekombinowany mysi czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów) – ImmunoTools;
- rm IL-4 (rekombinowana mysia interleukina 4) – ImmunoTools;
- rh IL-2 (rekombinowana ludzka interleukina 2) – ImmunoTools.

### 3.1.3. Linie komórkowe

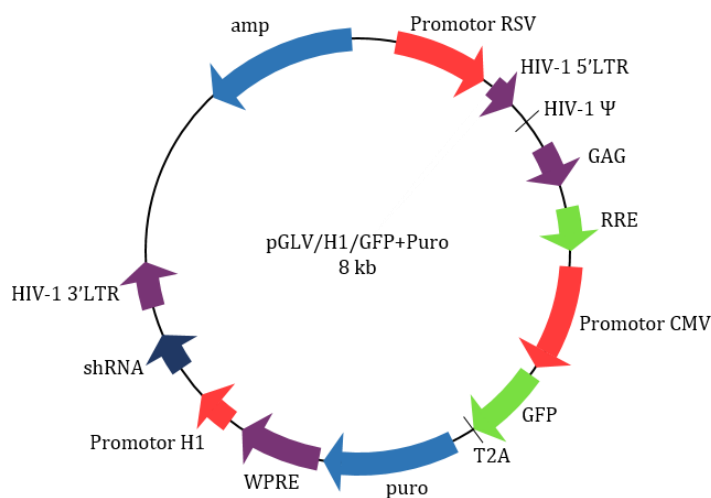
Tabela 1. Charakterystyka stosowanych linii komórkowych

Linia komórkowa	Charakterystyka	Sposób prowadzenia hodowli	Pochodzenie
MC38	Komórki mysiego raka jelita grubego uzyskane w wyniku naprzemiennych pasaży <i>in vivo/in vitro</i> wyprowadzone z wyindukowanego chemicznie przez Corbetta nowotworu	Komórki hodowano w uzupełnionym podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 5% FBS	IITD PAN (Pajtasz-Piasecka, 2004)
Lenti-X™ 293T	Komórki pakujące stosowane do produkcji wektorów lentiwirusowych wyselekcjonowane z transfekowanych ludzkich komórek zarodkowych nerki HEK293	Komórki hodowano w uzupełnionym podłożu DMEM z dodatkiem 10% FBS	Clontech

### 3.1.4. Plazmidy

Tabela 2. Plazmidy wchodzące w skład systemu lentiwirusowego trzeciej generacji

Plazmid	Charakterystyka	Pochodzenie
<b>pGLV3/H1/GFP+puro</b>	plazmid transferowy z wklonowanym genem oporności na puromycynę, białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (EGFP) i sekwencją shRNA	Ezbiolab
<b>pMD2.G</b>	plazmid kodujący gen białka otoczki wirusa VSV	Didier Trono, Addgene
<b>pMDLg/pRRE</b>	plazmid pakujący, kodujący geny <i>gag</i> i <i>pol</i>	Didier Trono, Addgene
<b>pRSV-Rev</b>	plazmid pakujący kodujący gen <i>rev</i>	Didier Trono, Addgene



Ryc. 6. Mapa plazmidu transferowego pGLV3/H1/GFP+puro wykorzystanego w systemie lentiwirusowym trzeciej generacji do ekspresji shRNA.

Tabela 3. Sekwencje docelowe shRNA wklonowanych do plazmidu pGLV3/H1/GFP+puro

Nazwa	Gen docelowy	Sekwencja
shN	ludzkie GAPDH	TATGACAACAGCCTCAAG
shIL-10-1	mysia IL-10	GGTGAAGACTTTCTTTCAAAC
shIL-10-2	mysia IL-10	GCCAAGCCTTATCGGAAATGA
shIL-10-3	mysia IL-10	GGGATCTTAGCTAACGGAAAC

### 3.1.5. Odczynniki i płyny

- 5(6)-CFDA-SE – barwnik fluorescencyjny stosowany do oznaczenia proliferacji komórek (Molecular Probes);
- Błękit trypanu – 20% roztwór w soli fizjologicznej (Sigma);
- Brefeldyna A (eBioscience)
- Bufor do transfekcji – 150 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7.5 (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław)
- CellROX Deep Red Reagent – barwnik fluorescencyjny stosowany do oznaczeń wydzielania reaktywnych form tlenu metodą cytometrii przepływowej (Invitrogen);
- Cyklofosfamid – chemioterapeutyk (Endoxan Baxter Oncology);
- DiO<sub>18</sub>C(3) – barwnik fluorescencyjny (Molecular Probes);
- DMSO – dimetylosulfotlenek, 10% – krioprotektant (Sigma);
- Ester forbolu (PMA) (Sigma);
- Jodek propidyny (PI) (Sigma);
- Jonomycyna (IM) (Sigma);
- Konkanawalina A – mitogen limfocytów T (Sigma);
- Mitomycyna C - związek hamujący proliferację komórek nowotworowych (Sigma);
- Monenzyna (eBioscience);
- PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław);
- PEG 6000 BioUltra – glikol polietylenowy (Sigma);
- Polibren (Sigma);
- Polietylenoimina (PEI) (Polysciences);
- Roztwór trypsyny 0,25% z EDTA 0,05% (Gibco);

### Zestawy odczynników stosowane do oznaczeń ekspresji mRNA

- Nucleospin RNA – zestaw do izolacji RNA (Macherey-Nagel);
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit – zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji (ThermoFisher);
- TaqMan Gene Expression Master Mix – odczynnik do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Applied Biosystem);
- TaqMan Gene Expression Assay – sondy do oznaczeń ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (Applied Biosystem). Numery identyfikacyjne zastosowanych sond przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Sondy do oznaczeń ekspresji genów metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Gen	Nr sondy
HPRT	Mm00446968_m1
IL-10	Mm01288386_m1

### Odczynniki stosowane do oznaczeń z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej

- DAPI (Molecular Probes) – barwnik fluorescencyjny stosowany do oznaczenia martwych komórek;
- LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) – barwnik fluorescencyjny stosowany do oznaczenia martwych komórek w utrwalanych próbkach;
- Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) – zestaw odczynników do utrwalania i permeabilizacji komórek.

### Odczynniki stosowane w teście immunoenzymatycznym ELISA

- Bufor oplatczający – 0,1 M węglan sodu, pH 9,5 lub 0,2 M fosforan wapnia, pH 6,5 (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław);
- Bufor blokujący tło – PBS z dodatkiem 10% FBS, pH 7,0;
- Bufor do przemywania – PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20 (Sigma);
- BD OptEIA ELISA set – zestaw do oznaczania stężenia danego białka w teście ELISA zawierający przeciwciała oplatczające, przeciwciała do detekcji skoniugowane z biotyną, koniugat awidyny i peroksydazy chrzanowej oraz rekombinowane białko o znanym stężeniu do przygotowania krzywej standardowej (BD Pharmingen);
- Invitrogen Uncoated ELISA Kit – zestaw do oznaczania stężenia danego białka w teście ELISA zawierający bufor oplatczający, bufor blokujący tło, przeciwciała oplatczające, przeciwciała

do detekcji skoniugowane z biotyną, koniugat awidyny i peroksydazy chrzanowej, roztwór substratu TMB oraz rekombinowane białko o znanym stężeniu do przygotowania krzywej standardowej (Invitrogen, dawniej eBioscience;

- Roztwór substratu – tetrametylobenzodyna (TMB) i nadtlenek wodoru w stosunku objętościowym 1:1 (BD Pharmingen);
- Roztwór zatrzymujący reakcję – 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN Wrocław);

Tabela 5. Zestawy ELISA wykorzystane do oznaczenia stężeń wybranych cytokin

Cytokina	Producent
IL-4	BD Pharmingen
IL-10	BD Pharmingen
IFN- $\gamma$	Invitrogen (eBioscience)

### 3.1.6. Przeciwciała monoklonalne

Tabela 6. Przeciwciała monoklonalne stosowane do oznaczeń cytometrycznych oraz separacji magnetycznej

Antygen	Charakterystyka przeciwciała	Klasa przeciwciała (Klon)	Fluorochromy	Stosowane rozcieńczenie	Producent
Przeciwciała monoklonalne stosowane do oznaczeń cytometrycznych					
<b>CD45</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2b, $\kappa$ (30-F11)	V500 BV 605 PE-Cy7	1:200	BD Horizon BioLegend BioLegend
<b>CD11b</b>	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2b, $\kappa$ (M1/70)	PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
<b>CD11c</b>	Chomicze anty-mysz	IgG (N418)	BV 650	1:200	BioLegend
<b>F4/80</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, $\kappa$ (BM8)	Alexa Fluor 700	1:200	BioLegend
<b>Ly6C</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2c, $\kappa$ (HK1.4)	PE BV 510	1:400 1:200	BioLegend
<b>Ly6G</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, $\kappa$ (1A8)	APC-Cy7 BV 605	1:200	BioLegend
<b>MHC II</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2b, $\kappa$ (M5/114.15.2) (i.c. RTK4530)	FITC APC-Cy7	1:200	BioLegend
<b>CD80</b>	Chomicze anty-mysz	IgG (16-10A1) (i.c. HTK888)	PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
<b>CD86</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, $\kappa$ (GL-1) (i.c. RTK2758)	PE-Cy7	1:200	BioLegend
<b>PD-L1 (CD274)</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2b, $\kappa$ (10F.9G2) (i.c. RTK4530)	APC	1:200	BioLegend

<b>CD206</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (C068C2) (i.c. RTK2758)	APC	1:50	BioLegend
<b>CD3e</b>	Chomicze anty-mysz	IgG1, κ (145-2C11)	PE-CF594	1:200	BD Biosciences
<b>CD3</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (17A2)	BV 605 FITC	1:200	BioLegend
<b>CD4</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (RM4-5)	FITC APC PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
<b>CD8a</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (53-6.7)	PE-Cy7 APC/Fire 750	1:200	BioLegend
<b>CD49b</b>	Szczurze anty-mysz	IgM, κ (DX5)	PE-CF594	1:200	BD Biosciences
<b>CD25</b>	Szczurze anty-mysz	IgG1, λ (PC61)	PE	1:200	BioLegend
<b>CD62L</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (MEL-14)	PerCP-Cy5.5 BV 605	1:200	BioLegend
<b>CD44</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (IM7)	FITC PE-Cy7	1:200	BioLegend
<b>FoxP3</b>	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2a, κ (FJK-16s) (i.c. eBR2a)	APC	1:100	eBioscience
<b>IRF8</b>	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG1, κ (V3GYWCH) (i.c. P3.6.2.8.1)	APC	1:100	eBioscience
<b>Ki67</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (16A8) (i.c. RTK2758)	APC	1:200	BioLegend
<b>CD107a</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (1D4B) (i.c. RTK2758)	APC	1:200	BioLegend
<b>T-bet</b>	Mysie anty-mysz/człowiek	IgG1, κ (4B10) (i.c. P.3.6.2.8.1.)	PE-Cy7	1:100	eBioscience
<b>IFN-γ</b>	Szczurze anty-mysz	IgG1, κ (XMG1.2) (i.c. eBRG1)	PE	1:100	eBioscience
<b>CD16/ CD32</b>	Szczurze anty-mysz	IgG2a, λ (93)	-	1:50	eBioscience
Przeciwciała monoklonalne stosowane do separacji magnetycznej					
<b>CD11b</b>	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2b, κ (M1/70)	(cząsteczki magnetyczne BD Imag)	-	BD Biosciences

i.c. – kontrola izotypowa (ang. *isotype control*);

APC – alofikocyjanina; BV – Brilliant Violet; Cy – cyjanina; FITC – izotiocyanian fluoresceiny; PE – fikoerytryna; PerCP – białko perydynowo-chlorofilowe



## 3.2. Metody

### 3.2.1. Produkcja i zagęszczanie wektorów lentiwirusowych

#### 3.2.1.1. Produkcja wektorów lentiwirusowych

Wektory lentiwirusowe pozyskano z nadsączy znad komórek pakujących Lenti-X™ 293T kotransfekowanych plazmidami wchodzącymi w skład systemu lentiwirusowego trzeciej generacji (tabela 2). Hodowlę komórek Lenti-X założono na szalkach o powierzchni 150 cm<sup>2</sup> w podłożu hodowlanym DMEM uzupełnionym o 10% FBS. Po osiągnięciu 80% konfluencji, komórki kotransfekowano za pomocą roztworu DNA i polietylenoiminy (PEI). Roztwory DNA oraz PEI sporządzono w buforze do transfekcji i inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej (RT). Po tym czasie roztwór PEI wkraplano do roztworu DNA wytrząsając przez 3 min. i inkubowano 15 min. w RT. Następnie, mieszaninę DNA-PEI dodawano do hodowli komórek pakujących. Po 24 h na szalkach wymieniono podłoże hodowlane na Opti-MEM uzupełnione o 5% FBS

#### 3.2.1.2. Zagęszczanie wektorów lentiwirusowych

Po 48 h zebrano nadsącz komórkowy zawierający wektory lentiwirusowe, a szalki uzupełniono o świeże podłoże hodowlane. Nadsącz komórkowy odwirowano (20 min., 2000 x g) w celu oczyszczenia z komórek. Następnie, do nadsączy dodano mieszaninę glikolu polietylenowego 6000, NaCl i PBS i inkubowano 90 min. w 4°C wytrząsając co 30 min. Po tym czasie, mieszaninę odwirowano (80 min., 3800 x g). Uzyskany pelet zawierający wektory lentiwirusowe zawieszono w PBS i przechowywano w -80°C.

#### 3.2.1.3. Określenie miana zagęszczonych wektorów lentiwirusowych

Miano oczyszczonych i zagęszczonych wektorów lentiwirusowych określono metodą seryjnych rozcieńczeń z wykorzystaniem linii komórek MC38. W tym celu, komórki MC38 nałożono na płytkę 24-dołkową (Costar) w gęstości 0,1x10<sup>6</sup> kom./0,5 ml/dołek. Po 24 h, na płytce wymieniono podłoże na RPMI uzupełnione o 5% FBS i 10 µg/ml polibrenu. Do pierwszego dołka dodano po 5 µl wektorów lentiwirusowych, a następnie do dwóch kolejnych dołków przenoszono po 50 µl rozcieńczonych wektorów uzyskując szereg rozcieńczeń. Po 24 h wymieniono podłoże hodowlane na świeże. Po kolejnych 48 h zebrano komórki z dołków na pomocą roztworu trypsyny z EDTA, odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszono w PBS z dodatkiem 2,5% FBS. Odsetek komórek wykazujących ekspresję EGFP określono za pomocą cytometru przepływowego FACS

Calibur z oprogramowaniem Cell Quest (Becton Dickinson). Miano wektorów lentiwirusowych wyznaczano wykorzystując wzór:

$$M \left[ \frac{TU}{ml} \right] = \frac{C \times G \times F}{V}$$

$M$  – miano wektorów lentiwirusowych (TU/ml) (TU, ang. *transducing units*);

$C$  – średnia liczba komórek przypadająca na dołek;

$G$  – stosunek liczby komórek EGFP<sup>+</sup> do wszystkich komórek w próbce;

$F$  – rozcieńczenie wektorów lentiwirusowych;

$V$  – objętość w dołku.

### 3.2.2. Izolacja i hodowla mysich komórek szpikowych

Komórki szpikowe izolowano z kości udowych i piszczelowych zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6. Po izolacji, komórki odplukano trzykrotnie w podłożu hodowlanym, za każdym razem wirując (7 min., 192 x g), a następnie mrożono w roztworze 90% FBS i 10% DMSO i przechowywano w ciekłym azocie.

#### 3.2.2.1. Różnicowanie komórek szpikowych w kierunku komórek dendrytycznych

Komórki BMDC uzyskiwano podczas hodowli *ex vivo* komórek szpikowych prowadzonej w obecności rm GM-CSF oraz rm IL-4. W tym celu, komórki szpikowe rozmrażano, zawieszono w podłożu hodowlanym RPMI uzupełnionym o 10% FBS, 40 ng/ml rm GM-CSF i 10 ng/ml rm IL-4, a następnie założono hodowlę w gęstości  $10 \times 10^6$  kom./10 ml w butelkach o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> (Corning). Hodowlę prowadzono w warunkach standardowych (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności powietrza). Po dwóch dniach hodowli, w butelkach podwojono objętość podłoża hodowlanego. Po czterech dniach hodowli, z butelek odebrano połowę zawiesiny komórek, odwirowano (7 min., 192 x g), komórki zawieszono w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego i zawrócono do butelek. Po sześciu dniach hodowli, pasażowano komórki z użyciem roztworu trypsyny z EDTA i zawieszono w RPMI uzupełnionym o 40 ng/ml GM-CSF i 5 ng/ml IL-4. Komórki wykorzystano do transdukcji wektorami lentiwirusowymi (sposób transdukcji opisano w podrozdziale 3.2.3.) lub założono hodowlę w nowych butelkach w gęstości  $20 \times 10^6$  kom./20 ml w celu sporządzenia szczepionek terapeutycznych. Po 24 h do hodowli w butelkach dodano antygenów nowotworowych w postaci lizatu z komórek MC38 (10% objętości). Lizat otrzymano poprzez pięciokrotne naprzemienne zamrażanie w ciekłym azocie i rozmrażanie w 37°C zawiesiny komórek MC38 o gęstości  $5 \times 10^6$  kom./ml, procedurę zakończono 2-godziną sonikacją. Po 24 h

stymulacji antygenami nowotworowymi, BMDC zdjęto z butelek z użyciem roztworu trypsyny z EDTA, zawieszono w soli fizjologicznej i stosowano jako szczepionki terapeutyczne.

### 3.2.2.2. Różnicowanie komórek szpikowych w kierunku komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego

MDSC uzyskano podczas hodowli *ex vivo* komórek pochodzenia szpikowego prowadzonej w podłożu kondycjonującym zawierającym rm GM-CSF oraz nadsącz z hodowli komórek nowotworowych MC38. W celu uzyskania nadsączy niezbędnych do przygotowania podłoża kondycjonującego, komórki MC38 zawieszono w RPMI uzupełnionym o 5% FBS i założono hodowlę w butelkach 75 cm<sup>2</sup> w gęstości 10x10<sup>6</sup> kom./10 ml. Hodowlę prowadzono przez 48 h w warunkach hipoksji (1% O<sub>2</sub>). Po tym czasie nadsącz zebrano, odwirowano dwukrotnie w celu oczyszczenia z komórek (10 min., 2000 x g) i wykorzystano do hodowli komórek szpikowych. Komórki szpikowe rozmrożono i zawieszono w podłożu kondycjonującym składającym się z 75% nadsączy z hodowli komórek MC38, 10% FBS i 80 ng/ml rm GM-CSF. Pozostałą część stanowiło RPMI. Komórki hodowano na płytce 6-dołkowej (Costar) w gęstości 1x10<sup>6</sup> kom./1 ml/dołek w warunkach standardowych (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności powietrza). Po dwóch dniach hodowli, dołki uzupełniono o 1 ml podłoża kondycjonującego. Po czterech dniach, z dołków zebrano po 1 ml zawiesiny komórek, odwirowano, a powstały osad komórkowy zawieszono w świeżo przygotowanym podłożu kondycjonującym i zawrócono do dołków. Po sześciu dniach hodowli zebrano uzyskane MDSC poprzez przepłukiwanie dołków, odwirowano, zawieszono w RPMI uzupełnionym o 5% FBS i 80 ng/ml rm GM-CSF i wykorzystano do transdukcji za pomocą wektorów lentiwirusowych.

### 3.2.3. Transdukcja BMDC i MDSC uzyskanych w warunkach *in vitro*

Sześciodniowe BMDC i MDSC zawieszono w odpowiednim podłożu hodowlanym nałożono na płytki 6-dołkowe w gęstości 2x10<sup>6</sup> kom./1 ml/dołek. Do dołków dodano zawiesinę zawierającą zagęszczone wektory lentiwirusowe kodujące shRNA wyciszające ekspresję IL-10 (LV shIL-10) lub kontrolne (LV shN) w liczbie 4 TU/kom. dla BMDC lub 8 TU/kom. dla MDSC. Do każdego dołka dodano roztwór polibrenu, którego końcowe stężenie w hodowli wynosiło 10 µg/ml. Po 24 h od transdukcji, z dołków zebrano zawiesinę komórkową, odwirowano i zawieszono w 2 ml odpowiedniego podłoża hodowlanego, a następnie zawrócono na płytkę. W przypadku BMDC, stosowano RPMI uzupełnione o 40 ng/ml rm GM-CSF i 5 ng/ml rm IL-4. MDSC zawieszono w podłożu kondycjonującym uzupełnionym o 80 ng/ml rm GM-CSF. Komórki hodowano przez kolejne 24 h, a następnie zebrano za pomocą roztworu trypsyny z EDTA, zawieszono w RPMI, liczone i wykorzystano do przeprowadzenia testów funkcjonalnych.

### 3.2.4. Ocena wydajności wyciszenia ekspresji IL-10 w transdukowanych BMDC i MDSC metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym

#### 3.2.4.1. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z BMDC i MDSC za pomocą zestawu Nucleospin RNA (Mecherey-Nagel). W tym celu,  $1 \times 10^6$  komórek przełożono do probówki typu eppendorf, odpłukano dwukrotnie w PBS za każdym razem wirując (7 min., 192 x g) i zawieszono w 350  $\mu$ l buforu lizującego RA1 uzupełnionego o 1% 2-merkaptioetanolu. Lizat komórkowy nałożono na kolumnę filtrującą i wirowano (1 min., 11000 x g). Do przesączu dodano 350  $\mu$ l 70% roztworu alkoholu etylowego, a następnie mieszaninę nałożono na kolumnę wiążącą RNA i wirowano (30 s, 11000 x g). Po przeniesieniu kolumny do nowej probówki, na membranę dodano 350  $\mu$ l buforu MDB (ang. *Membrane Desalting Buffer*) i ponownie wirowano (1 min, 11000 x g). Na membranę nałożono 95  $\mu$ l roztworu DNazy i inkubowano 15 min. w RT. Następnie, enzym inaktywowano nakładając 200  $\mu$ l buforu RA2, wirowano (30 s, 11000 x g) i płukano dwukrotnie membranę za pomocą 600  $\mu$ l buforu RA3 za każdym razem wirując (30 s, 11000 x g). Po odpłukaniu, osuszono membranę poprzez wirowanie (3 min., 11000 x g), a następnie przełożono kolumnę do probówki typu eppendorf i eluowano związane RNA nakładając 60  $\mu$ l wody wolnej od RNaz i wirując (1 min., 11000 x g).

#### 3.2.4.2. Pomiar stężenia RNA

Stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA określono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali równej 260 nm oraz 280 nm. Stężenie RNA wyznaczono wykorzystując zależność absorbancji światła o długości fali 260 nm od stężenia RNA (absorbancja dla roztworu RNA o stężeniu 40 ng/ml wynosi 1). Czystość wyizolowanego RNA oznaczono na podstawie współczynnika absorbancji przy długości fali 260 nm do absorbancji przy długości fali 280 nm (czyste RNA charakteryzuje się współczynnikiem A260/A280 wynoszącym ok. 2).

#### 3.2.4.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z wykorzystaniem zestawu ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher). Do probówki pobrano 1 mg wyizolowanego RNA i dopełniono wodą wolną od RNaz do 11  $\mu$ l. Następnie dodano 1  $\mu$ l roztworu starterów oligo(dT)<sub>18</sub> oraz 8  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 4  $\mu$ l buforu do reakcji (5x), 1  $\mu$ l roztworu inhibitorów RNaz RiboLock (20 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ l mieszaniny dNTP (10 mM) i 1  $\mu$ l roztworu odwrotnej transkryptazy RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ L). Reakcję prowadzono w 42°C przez 60 min., a następnie zakończono reakcję poprzez inkubację w 70°C przez 5 min.

#### 3.2.4.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Do mieszaniny reakcyjnej TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), zawierającej polimerazę DNA AmpliTaq Gold®, mieszaninę dNTP, dTTP/dUTP, glikozylazę uracylo-DNA, barwnik referencyjny ROX oraz inne składniki, dodano cDNA (50 ng/reakcję) oraz odpowiednie sondy wymienione w tabeli 4. Na płytkę 96-dołkową MicroAmp™ (Applied Biosystems) nakładano po 20 µl/dołek mieszaniny reakcyjnej. Analizę prowadzono wykorzystując ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Poziom ekspresji IL-10 w transdukowanych BMDC i MDSC oszacowano względem komórek nietransdukowanych stosując metodę komparatywną ( $\Delta\Delta Ct$ ). Jako gen referencyjny stosowano Hprt.

#### 3.2.5. Ocena wydajności wyciszenia ekspresji IL-10 w transdukowanych BMDC i MDSC metodą ELISA

Za pomocą testu ELISA określono stężenie IL-10 w nadsączach znad 24-godzinnej hodowli transdukowanych BMDC i MDSC zakładanej na płytkach 24-dołkowych w gęstości  $0,25 \times 10^6$  kom./0,5 ml/dołek w RPMI uzupełnionym o 10% FBS oraz 40 ng/ml rm GM-CSF i 5 ng/ml rm IL-4 (BMDC) lub 80 ng/ml rm GM-CSF (MDSC).

W pierwszym etapie, na płytce 96-dołkowej (Costar) nałożono po 100 µl/dołek roztworów przeciwciał pierwszej warstwy (opłaszczających) sporządzonych w buforze opłaszczającym i inkubowano przez noc w 4°C. Następnie płytki płukano trzykrotnie buforem do przemywania, osuszono, nałożono po 200 µl/dołek buforu blokującego tło i inkubowano przez 1 h w RT. Na trzykrotnie przepłukane i osuszone płytki nałożono po 100 µl/dołek badanych nadsączy, których odpowiednie rozcieńczenia dobrano doświadczalnie. W celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej, na każdą płytkę naniesiono roztwory wzorcowe cytokin przygotowane metodą seryjnych rozcieńczeń. Płytki inkubowano przez 2 h w RT, a następnie usunięto niezwiązane białka poprzez pięciokrotne płukanie buforem do przemywania. Na osuszoną płytkę nałożono po 100 µl/dołek mieszaniny przeciwciał drugiej warstwy (detekcyjnych) i enzymu i inkubowano 60 min. w RT. Po tym czasie płytki odpłukano siedmiokrotnie, za każdym razem pozostawiając bufor przemywający w dołkach przez 1 min. Po osuszeniu, nakładano po 100 µl/dołek roztworu substratu i inkubowano przez 15 min. w ciemności. Reakcję barwną zatrzymano przez dodanie po 50 µl/dołek 1 M roztworu  $H_3PO_4$ . Bezzwłocznie dokonano pomiaru absorbancji dla długości fali 450 nm i 570 nm za pomocą czytnika mikroplatek (Thermo Labsystem Multiscan).

#### 3.2.6. Określenie fenotypu powierzchniowego BMDC po transdukcji

Transdukowane wektorami kodującymi shRNA BMDC przełożono do probówek do cytometru przepływowego ( $0,2 \times 10^6$  kom./probówkę), odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS

i odwirowano (7 min., 192 x g). Po rozbiciu peletu, w celu zablokowania niespecyficznych oddziaływań przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami z komórkami, do każdej probówki dodano po 50 µl roztworu przeciwciał monoklonalnych anty-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 min. w 4°C. Nadmiar przeciwciał odpłukano w PBS z 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Po rozbiciu peletu, do każdej probówki dodano po 50 µl roztworu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami: anty-CD11c BV 650, anty-F4/80 Alexa Fluor 700, anty-MHC II APC-Cy7, anty-CD80 PerCP-Cy5.5, anty-CD86 PE-Cy7, anty-PD-L1 APC (charakterystykę przeciwciał zamieszczono w tabeli 6). Do każdej próbki sporządzono kontrolę izotypową (i.c.). Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie odpłukano nadmiar niezwiązanych przeciwciał w PBS z 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszono komórki w 300 µl PBS z 2,5% FBS. Bezpośrednio przed analizą do każdej probówki dodano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml) w celu wykluczenia martwych komórek. Komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

### **3.2.7. Ocena zdolności transdukowanych BMDC do pierwotnej stymulacji limfocytów T**

#### *3.2.7.1. Hodowla mieszana transdukowanych BMDC i splenocytów*

BMDC transdukowane wektorami kodującymi shRNA i stymulowane antygenami nowotworowymi nałożono na płytkę 12-dołkową (Nunc) w gęstości  $1,8 \times 10^5$  kom./0,5 ml/dołek. Splenocyty uzyskane od zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6 i przechowywane w ciekłym azocie rozmrożono, odwirowano (7 min., 192 x g), zawieszono w RPMI uzupełnionym o 10% FBS i nałożono po  $1,8 \times 10^6$  kom./0,5 ml/dołek na płytce z komórkami BMDC. Kontrolnie, zawiesinę splenocytów nałożono do dołeków niezawierających komórek BMDC uzupełnionych o 0,5 ml podłoża. Dołki uzupełniono o rh IL-2, której końcowe stężenie wynosiło 200 U/ml. Hodowlę mieszaną transdukowanych BMDC i splenocytów prowadzono przez 5 dni w warunkach standardowych.

#### *3.2.7.2. Określenie aktywności cytotoksycznej stymulowanych komórek śledzionowych*

Po 5 dniach stymulacji, splenocyty zebrano, zawieszono w RPMI z dodatkiem 10% FBS i policzono. Docelowe komórki MC38 zdjęto z butelek, policzono i przygotowano zawiesinę o gęstości  $1 \times 10^6$  kom./ml sporządzoną w RPMI z dodatkiem 5% FBS i 10 µl/ml barwnika DiO<sub>18</sub>C(3). Komórki inkubowano przez 20 min. w 37°C, a następnie trzykrotnie odpłukano w podłożu hodowlanym za każdym razem wirując (7 min., 192 x g). Znakowane komórki zawieszono w RPMI z dodatkiem 10% FBS i nałożono na okrągłodenne płytki 96-dołkowe

(Greiner) po  $1 \times 10^4$  kom./100  $\mu$ l/dołek. Na tak przygotowane płytki nałożono po  $1 \times 10^5$  kom./100  $\mu$ l/dołek lub po  $3 \times 10^5$  kom./100  $\mu$ l/dołek zawiesiny splenocytów. Stosunek komórek efektorowych do komórek docelowych wynosił 10:1 lub 30:1. Każdy dołek uzupełniono o rh IL-2, której końcowe stężenie wynosiło 200 U/ml. Komórki inkubowano przez 4 h w 37°C, a następnie zdjęto z dołków, umieszczono w probówkach do cytometru przepływowego, odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Komórki zawieszono w 200  $\mu$ l roztworu jodku propidyny o stężeniu 7,5 nM, sporządzonego w PBS z dodatkiem 2,5% FBS. Po 10 min. inkubacji w 37°C próbki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur (Becton Dickinson). Aktywność cytotoksyczną komórek efektorowych określono jako odsetek martwych komórek docelowych pomniejszony o odsetek martwych komórek docelowych, które kontrolnie inkubowano bez komórek efektorowych.

### 3.2.7.3. Ocena ekspresji cząsteczek CD107a na powierzchni komórek efektorowych

Na płaskodenne płytki 96-dołkowe z uprzednio przygotowaną jednowarstwową hodowlą komórek MC38 nakładano po 100  $\mu$ l zawiesiny stymulowanych splenocytów o gęstości  $2 \times 10^6$  kom./ml (stosunek liczbowy komórek nowotworowych do splenocytów wynosił 1:5). Do dołków dodano roztwór przeciwciał monoklonalnych anti-CD107a skoniugowanych z fluorochromem APC, PMA (stężenie końcowe 50 mg/ml), jonomycyny (stężenie końcowe 1  $\mu$ g/ml) oraz rh IL-2 (stężenie końcowe 200 U/ml). Inkubowano przez 2 h w 37°C, a następnie komórki zebrano, odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g) i znakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami: anti-CD45 V500, anti-CD4 BV605, anti-CD8a PE-Cy7 (charakterystykę przeciwciał oraz zastosowane rozcieńczenia przedstawiono w tabeli 6). Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie odpłukano nadmiar niezwiązanych przeciwciał w PBS z 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g), zawieszono komórki w 300  $\mu$ l PBS z 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa. W celu identyfikacji martwych komórek, bezpośrednio przed analizą do próbek dodano po 50  $\mu$ l roztworu barwnika DAPI (1  $\mu$ g/ml).

### 3.2.8. Określenie fenotypu powierzchniowego MDSC po transdukcji

MDSC transdukowane wektorami kodującym shRNA przełożono do probówek do cytometru przepływowego, odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Po rozbiciu peletu, w celu zablokowania niespecyficznego oddziaływania przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami z komórkami, do każdej probówki dodano po 50  $\mu$ l roztworu przeciwciał monoklonalnych anti-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 min. w 4°C. Nadmiar przeciwciał odpłukano w PBS z 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Po rozbiciu peletu, do każdej probówki dodano po 50  $\mu$ l roztworu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych

z fluorochromami: anty-CD11b PerCP-Cy5.5, anty-CD11c BV 650, anty-F4/80 Alexa Fluor 700, anty-Ly6C BV 510, anty-Ly6G BV 605, anty-MHC II APC-Cy7, anty-CD86 PE-Cy7, anty-PD-L1 APC (charakterystykę przeciwciał zamieszczono w tabeli 6). Do każdej próbki sporządzono kontrolę izotypową (i.c.). Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie odplukano nadmiar niezwiązanych przeciwciał w PBS z 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszono komórki w 300 µl PBS z 2,5% FBS. Bezpośrednio przed analizą do każdej próbki dodano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml) w celu wykluczenia martwych komórek. Komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

### 3.2.9. Ocena aktywności supresorowej transdukowanych MDSC

Wykorzystując procedurę opisaną w podrozdziale 3.2.8., transdukowane MDSC wyznakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami: anty-CD11b PerCP-Cy5.5, anty-CD11c BV 650, anty-Ly6C PE, anty-Ly6G APC-Cy7 (charakterystykę przeciwciał zamieszczono w tabeli 6). Następnie, komórki zawieszono w PBS z dodatkiem 2,5% FBS doprowadzając do gęstości  $5 \times 10^6$  kom./ml. Za pomocą sortera FACS Aria wyizolowano M-MDSC ( $CD11b^+CD11c^-Ly6C^+$ ) oraz PMN-MDSC ( $CD11b^+CD11c^-Ly6G^+$ ) wykazujące ekspresję białka EGFP. Aktywność supresorową uzyskanych M-MDSC i PMN-MDSC określano na podstawie ich zdolności do hamowania proliferacji splenocytów uzyskanych od zdrowej myszy szczepu C57BL/6 znakowanych za pomocą barwnika fluorescencyjnego CFDA-SE.

#### 3.2.9.1. Przygotowanie splenocytów znakowanych barwnikiem CFDA-SE

Splenocyty uzyskane od zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6 i przechowywane w ciekłym azocie rozmrożono, odwirowano (7 min., 192 x g), zawieszono w PBS i ponownie odwirowano. Komórki policzono i zawieszono w roztworze CFDA-SE o stężeniu 0,5 µM, sporządzonym w PBS, doprowadzając do gęstości  $5 \times 10^6$  kom./ml. Splenocyty inkubowano przez 15 min w 37°C, a następnie odplukano w RPMI z dodatkiem 10% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Komórki zawieszono w RPMI i inkubowano przez 30 min. w 37°C. Po tym czasie, znakowane splenocyty odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszono w RPMI uzupełnionym o 10% FBS, konkanawalinę A (ConA; 4 µg/ml) oraz hIL-2 (400 U/ml).

#### 3.2.9.2. Prowadzenie hodowli mieszanej MDSC i znakowanych splenocytów

Wyizolowane M-MDSC i PMN-MDSC nałożono na okrągłodenne płytki 96-dołkowe. M-MDSC nakładano w liczbie  $1 \times 10^5$  kom./100 µl/dołek, a do dołek dodawano znakowane



splenocyty w liczbie  $1 \times 10^5$  kom./100  $\mu$ l/dołek lub  $2 \times 10^5$  kom./100  $\mu$ l/dołek. Ze względu na niewielką liczbę wyizolowanych PMN-MDSC, komórki te nałożono w liczbie  $1 \times 10^4$  kom./100  $\mu$ l/dołek, a liczba dodanych splenocytów wynosiła  $1 \times 10^4$  kom./100  $\mu$ l/dołek lub  $2 \times 10^4$  kom./100  $\mu$ l/dołek. Stosunek liczbowy MDSC i splenocytów wynosił 1:1 lub 1:2, a końcowe stężenie konkanawaliny A i hIL-2 wynosiło odpowiednio 2  $\mu$ g/ml oraz 200 U/ml. Hodowlę mieszaną prowadzono w warunkach standardowych przez 72 h.

### 3.2.9.3. Ocena proliferacji splenocytów w obecności MDSC

Po zakończeniu hodowli, płytkę odwirowano (7 min., 192 x g), nadsącz zebrano i przechowywano w 4°C, a komórki zdjęto z dołków, umieszczono w probówkach do cytometru przepływowego i wyznakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami: anty-CD11b PerCP-Cy5.5, anty-CD4 APC, anty-CD8 PE-Cy7. Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 45 min. w 4°C, a następnie odpłukano nadmiar niezwiązanych przeciwciał w PBS z 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszono komórki w 300  $\mu$ l PBS z 2,5% FBS. Analizę przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa. W celu identyfikacji martwych komórek, bezpośrednio przed analizą do próbek dodano po 50  $\mu$ l roztworu barwnika DAPI (1  $\mu$ g/ml). W nadsączach znad mieszanej hodowli oszacowano stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10 za pomocą testu ELISA, według procedury opisanej w podrozdziale 3.2.5.

## 3.2.10. Doświadczenia terapeutyczne

### 3.2.10.1. Wszczepienie komórek nowotworowych

Hodowane *in vitro* komórki linii mysiego raka jelita grubego MC38 zdjęto z butelek za pomocą roztworu trypsyny z EDTA i odpłukiwano w soli fizjologicznej. Po odwirowaniu (7 min., 192 x g), komórki zawieszono w soli fizjologicznej i wszczepiono myszom szczepu C57BL/6 pod skórę prawego boku w liczbie  $1,1 \times 10^6$  kom./0,2 ml/mysz. Gdy guzy były palpacyjnie wyczuwalne (12-21 dni po wszczepieniu komórek MC38), dokonano randomizacji myszy na podstawie pomiaru objętości guzów i rozpoczynano terapię.

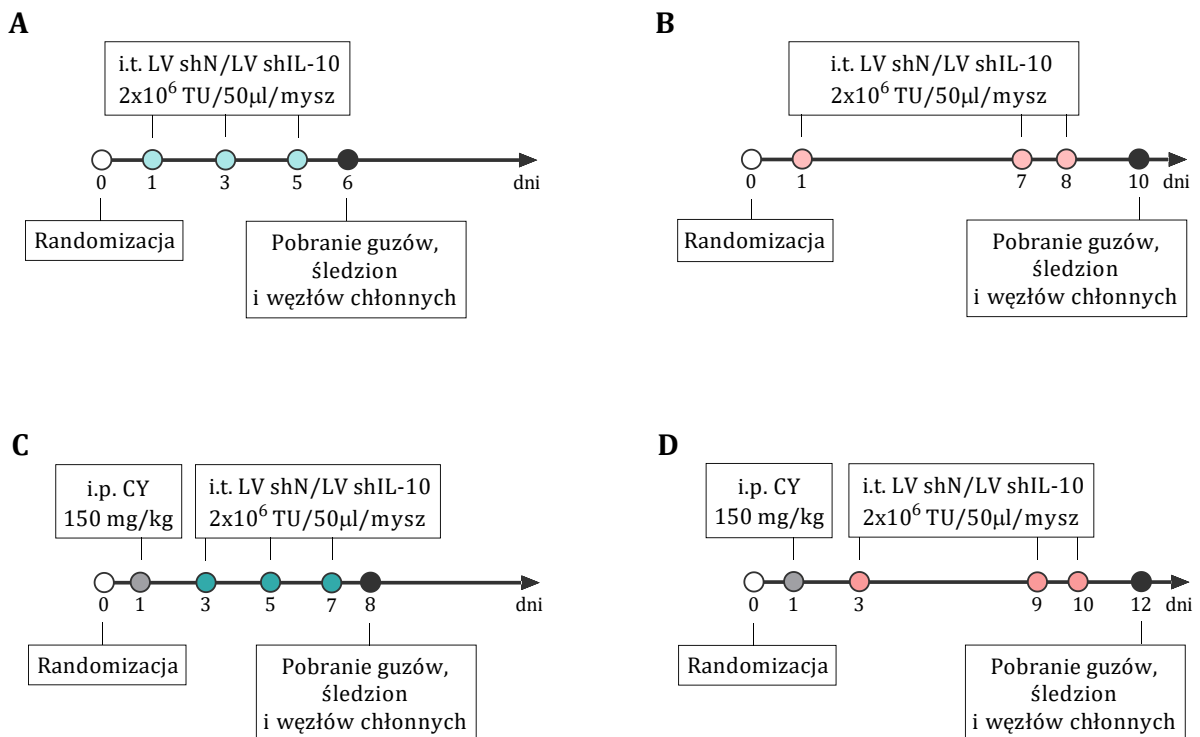
### 3.2.10.2. Określenie efektu podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10

Myszom podawano wektory lentiwirusowe kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko mRNA dla mysiej IL-10 (shIL-10). Jako kontrolę zastosowano wektory lentiwirusowe kodujące shRNA skierowane przeciwko mRNA dla ludzkiego białka GAPDH (shN). Wektory lentiwirusowe zawieszono w PBS podawano doguzowo (i.t.) w liczbie  $2 \times 10^6$  TU/50  $\mu$ l/mysz trzykrotnie według schematu przedstawionego na rycinie 7. Szóstego (ryc. 7 A) lub dziesiątego

(ryc. 7 B) dnia terapii, od myszy pobrano guzy, wartownicze węzły chłonne oraz śledziony. Guzy zważono, a następnie przetarto przez jałowe filtry do osocza. Uzyskaną zawiesinę komórek odplukano trzykrotnie w RPMI z dodatkiem 3% FBS za każdym razem wirując (7 min., 192 x g), zawieszono w RPMI uzupełnionym o 10% FBS doprowadzając do gęstości 200 mg/ml i poddano analizom opisanym w podrozdziałach od 3.2.11 do 3.2.15. Węzły chłonne przetarto przez jałowe filtry do osocza, odplukano trzykrotnie w RPMI z dodatkiem 3% FBS za każdym razem wirując (7 min., 192 x g) i zawieszono w RPMI uzupełnionym o 10% FBS. Następnie policzono uzyskane komórki i przeprowadzono analizy opisane w podrozdziałach 3.2.16 i 3.2.17. Śledziony przetarto przez jałowe filtry do osocza, zawiesinę komórek odplukano dwukrotnie i zamrażano w oparach ciekłego azotu w RPMI uzupełnionym o 50% FBS i 10% DMSO. Po upływie 1,5 h przełożono do ciekłego azotu. Splenocyty poddano analizom opisanym w podrozdziałach 3.2.18 i 3.2.19.

### 3.2.10.3. Określenie efektu podania cyklofosfamidu i wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10

Schemat traktowania myszy przedstawiony w poprzednim paragrafie rozszerzono o dootrzewnowe (i.p.) podanie cyklofosfamidu, który zastosowano w dawce 150 mg/kg m.c. dwa dni przed pierwszym podaniem wektorów lentiwirusowych. Ósmego (ryc. 7 C) lub dwunastego (ryc. 7 D) dnia terapii, od myszy pobrano guzy, wartownicze węzły chłonne oraz śledziony, które następnie traktowano zgodnie z procedurą opisaną w poprzednim paragrafie.



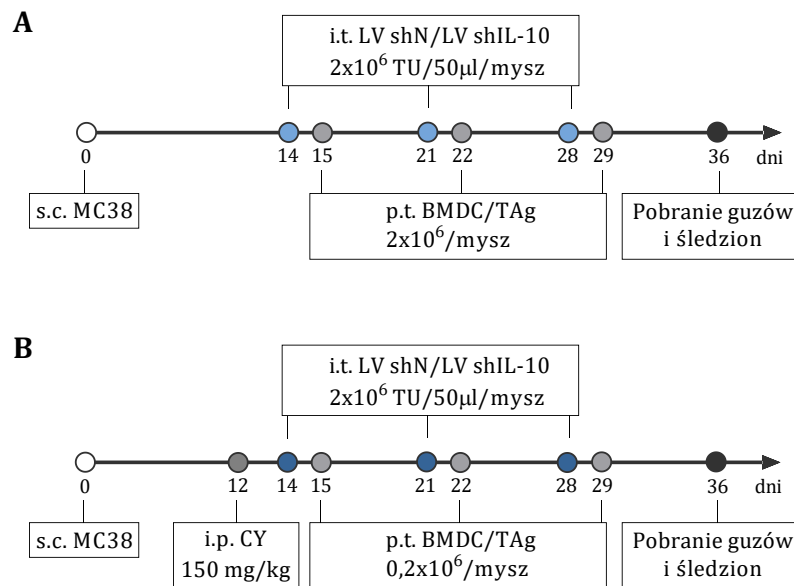
**Ryc. 7.** Schematy doświadczeń *in vivo* mających na celu określenie efektu podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 stosowanych samodzielnie (A, B) lub w połączeniu z cyklofosfamidem (C, D).

*3.2.10.4. Określenie efektu skojarzonej immunoterapii złożonej z wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych*

Wektory lentiwirusowe zawieszono w PBS podawano myszom doguzowo (i.t.) w liczbie  $2 \times 10^6$  TU/50  $\mu$ l/mysz trzykrotnie w odstępach tygodniowych według schematu przedstawionego na rycinie 8 A. Dzień po każdym podaniu wektorów, myszom podano okołoguzowo (p.t.) szczepionki zawierające komórki dendrytyczne stymulowane antygenami nowotworowymi w liczbie  $2 \times 10^6$  kom./0,2 ml/mysz. Pomiarów guzów dokonano w odstępach 2-3-dniowych przez cały czas trwania doświadczenia. Objętość guzów obliczono według wzoru:  $\frac{1}{2} a \times b^2$ , gdzie „a” jest dłuższym, a „b” – krótszym wymiarem. Ocenę skuteczności zastosowanych schematów terapeutycznych przeprowadzono w oparciu o TGI – zahamowanie wzrostu guzów w odniesieniu do guzów z grupy kontrolnej, wyliczane według wzoru:  $100 - (T/C \times 100)$ , gdzie T oznacza medianę objętości guzów myszy leczonych, a C – medianę objętości guzów kontrolnych myszy nieleczonych. Tydzień po zakończeniu terapii, od myszy pobrano guzy oraz śledziony, które następnie przetarto przez jałowe filtry do osocza. Zawiesinę komórek uzyskaną z guzów i śledziony odpłukano dwukrotnie w RPMI z dodatkiem 3% FBS za każdym razem wirując (7 min., 192 x g) i zamrożono w oparach ciekłego azotu w RPMI uzupełnionym o 50% FBS i 10% DMSO. Po upływie 1,5 h przełożono do ciekłego azotu. Guzy oraz śledziony poddano analizom opisanym w podrozdziałach 3.2.11, 3.2.18 i 3.2.19.

*3.2.10.5. Określenie efektu skojarzonej chemioimmunoterapii złożonej z cyklofosfamidu, wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych*

Schemat terapeutyczny opisany w poprzednim paragrafie rozszerzono o dootrzewnowe (i.p) podanie cyklofosfamidu, który zastosowano w dawce 150 mg/kg m.c. dwa dni przed pierwszym podaniem wektorów lentiwirusowych (ryc. 8 B). Ocenę skuteczności zastosowanych schematów terapeutycznych przeprowadzono w oparciu o TGI oszacowane w odniesieniu do guzów z grupy traktowanej cyklofosfamidem. Tydzień po zakończeniu terapii od myszy pobrano guzy oraz śledziony, które traktowano zgodnie z procedurą opisaną w poprzednim paragrafie, a następnie poddano analizom opisanym w podrozdziałach 3.2.11 oraz 3.2.18-3.2.20.



**Ryc. 8.** Schematy doświadczeń *in vivo* mających na celu określenie efektu skojarzonej terapii złożonej z wektorów wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych stosowanych jako immunoterapia (A) lub chemioimmunoterapia w połączeniu z cyklofosfamidem (B).

### 3.2.11. Oznaczenie nacieków limfocytów i komórek mieloidalnych w guzach metodą cytometrii przepływowej

Komórki wyizolowane z guzów znakowano za pomocą barwnika LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Life Technologies) służącego do identyfikacji martwych komórek. W tym celu, komórki odwirowano w PBS, zawieszono w PBS z dodatkiem barwnika i inkubowano 30 min. w RT. Następnie komórki odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g), dodano 50  $\mu$ l roztworu przeciwciał anti-CD16/CD32 i inkubowano 15 min. w 4°C. Po odpłukaniu, komórki znakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami. W tym celu, do komórek dodano roztworu odpowiednich przeciwciał (tabela 7) i inkubowano przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie komórki odpłukano i utrwalono za pomocą Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) poprzez zawieszenie w Fixation Buffer i inkubację przez 30 min. w 4°C. Następnie komórki odpłukano w Permeabilization Buffer, odwirowano (7 min., 300 x g), dodano roztwór przeciwciał anti-CD16/CD32 i inkubowano 15 min. w 4°C. Po odpłukaniu w Permeabilization Buffer, do komórek dodano roztworu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wewnątrzkomórkowym (tabela 7) i inkubowano przez 45 min. w 4°C. Komórki odpłukano dwukrotnie w Permeabilization Buffer, zawieszono w 300  $\mu$ l PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem FACS Diva (Becton Dickinson).

W przypadku doświadczeń, których schematy przedstawiono na rycinie 7, w celu zidentyfikowania komórek EGFP<sup>+</sup>, dokonano oznaczeń w próbkach nieutrwalonych. Procedurę rozpoczęto od inkubacji komórek z roztworem przeciwciał anti-CD16/CD32, następnie wykonano

znakowanie za pomocą koktajlu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami (tabela 7), a po odplukaniu nadmiaru przeciwciał, komórki zawieszano w 300 µl PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru LSR Fortessa. W celu identyfikacji martwych komórek, bezpośrednio przed analizą do próbek dodano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml). W tabeli 8 przedstawiono charakterystykę fenotypową identyfikowanych populacji, według której przeprowadzono analizę.

**Tabela 7.** Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami zastosowane w poszczególnych doświadczeniach. Schematy doświadczeń 1A-D przedstawiono na rycinie 7, a doświadczeń 2A-B na rycinie 8.

Antygen	Doświadczenie					
	1 A	1 B	1 C	1 D	2 A	2 B
Oznaczenie komórek mieloidalnych (panel I, próbki utrwalane)						
<b>CD45</b>	-	PE-Cy7	-	PE-Cy7	BV605	BV605
<b>CD11b</b>	-	PerCP-Cy5.5	-	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
<b>CD3e</b>	-	FITC	-	FITC	PE-CF594	PE-CF594
<b>CD19</b>	-	FITC	-	FITC	PE-CF594	PE-CF594
<b>CD49b</b>	-	-	-	-	PE-CF594	PE-CF594
<b>CD11c</b>	-	BV650	-	BV650	BV650	BV650
<b>F4/80</b>	-	AF700	-	AF700	AF700	AF700
<b>Ly6C</b>	-	PE	-	PE	PE	PE
<b>Ly6G</b>	-	APC-Cy7	-	APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7
<b>MHC II</b>	-	-	-	-	FITC	FITC
<b>CD206/ Ki67/ IRF8</b>	-	APC (CD206 lub Ki67 lub IRF8)	-	APC (CD206 lub Ki67 lub IRF8)	APC (CD206)	APC (CD206)
Oznaczenie komórek mieloidalnych (panel II, próbki nieutrwalane)						
<b>CD45</b>	V500	V500	V500	V500	-	-
<b>CD11b</b>	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	-	-
<b>CD3e</b>	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	-	-
<b>CD19</b>	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	-	-
<b>CD49b</b>	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	-	-
<b>CD11c</b>	BV650	BV650	BV650	BV650	-	-
<b>F4/80</b>	AF700	AF700	AF700	AF700	-	-
<b>Ly6C</b>	BV510	PE	PE	PE	-	-
<b>Ly6G</b>	BV605	BV605	BV605	BV605	-	-
<b>MHC II</b>	APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7	-	-
<b>CD86</b>	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	-	-

Oznaczenie limfocytów (próbki utrwalane)						
<b>CD45</b>	BV605	BV605	BV605	BV605	BV605	BV605
<b>CD3e</b>	BV650	BV650	BV650	BV650	BV650	BV650
<b>CD4</b>	FITC	FITC	FITC	FITC	FITC	FITC
<b>CD8a</b>	APC/Fire 750	APC/Fire 750	APC/Fire 750	APC/Fire 750	APC/Fire 750	APC/Fire 750
<b>CD19</b>	AF700	AF700	AF700	AF700	AF700	AF700
<b>CD49b</b>	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594
<b>CD25</b>	PE	PE	PE	PE	PE	PE
<b>CD44</b>	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
<b>CD62L</b>	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
<b>FoxP3</b>	APC	APC	APC	APC	APC	APC

**Tabela 8.** Charakterystyka fenotypowa populacji komórek identyfikowanych podczas analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej

Populacja	Markery
Oznaczenia komórek mieloidalnych	
Komórki mieloidalne	CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup> CD19 <sup>-</sup> CD49b <sup>-</sup>
DC	CD11c <sup>+</sup> F4/80 <sup>int</sup> MHCII <sup>+</sup>
TAM	CD11c <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup>
M-MDSC	CD11c <sup>-</sup> F4/80 <sup>-</sup> Ly6C <sup>+</sup> Ly6G <sup>-</sup>
PMN-MDSC	CD11c <sup>-</sup> F4/80 <sup>-</sup> Ly6C <sup>int</sup> Ly6G <sup>+</sup>
Oznaczenia limfocytów	
NK	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD49b <sup>+</sup>
NKT	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>+</sup>
Limfocyty T CD8 <sup>+</sup>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>
Limfocyty T CD4 <sup>+</sup>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>
Limfocyty Treg	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>
Limfocyty T efektorowe	CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>

### 3.2.12. Ocena zdolności komórek wyizolowanych z guzów do produkcji IL-10

Z zawiesiny komórek wyizolowanych z guzów pobranych od myszy, pobrano 50  $\mu$ l i założono hodowlę na płytkach 24-dołkowych w RPMI uzupełnionym o 10% FBS (10 mg tkanki/ml/dołek). Po 24 h zebrano nadsącz z nad hodowli, odwirowano (7 min., 192 x g), przenoszono do nowej próbki i przechowywano w 4°C. W nadsączach oszacowano stężenie IL-10 za pomocą testu ELISA, który przeprowadzano według procedury opisanej w podrozdziale 3.2.5.

### 3.2.13. Izolacja komórek CD11b<sup>+</sup> z guzów pobranych od myszy

Zawiesinę komórek wyizolowanych z guzów odpłukano w PBS z dodatkiem 2 mM EDTA i 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Do komórek dodano 50 µl roztworu przeciwciał anty-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 min. w 4°C. Ponownie odpłukano w PBS z 2 mM EDTA i 2,5% FBS i odwirowano. Na pelet dodano po 100 µl przeciwciał monoklonalnych anty-CD11b skoniugowanych z cząsteczkami magnetycznymi i inkubowano przez 30 min. w 4°C. Komórki zawieszono w 3 ml PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS, a następnie próbki umieszczono w separatorze magnetycznym (BD Biosciences) i pozostawiano na 8 min. Po tym czasie, z próbek delikatnie usuwano negatywną frakcję komórek, a pozostałe komórki zawieszono w 3 ml PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i ponownie umieszczano w separatorze. Procedurę oczyszczania powtórzono trzykrotnie. Wyizolowane komórki CD11b<sup>+</sup> zawieszono w RPMI z dodatkiem 10% FBS i odwirowano. Komórki ponownie zawieszono w podłożu hodowlanym, liczono i wykorzystano do testów opisanych w podrozdziałach 3.2.14 i 3.2.15.

### 3.2.14. Ocena zdolności komórek CD11b<sup>+</sup> izolowanych z guzów do wytwarzania reaktywnych form tlenu

Komórki CD11b<sup>+</sup> wyizolowane z guzów w liczbie 0,1x10<sup>6</sup> odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Na pelet dodano 50 µl roztworu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami: anty-CD45 PE-Cy7, anty-CD3 PE-CF594, anty-CD19 PE-CF594, anty-CD49b PE-CF594, anty-CD11c BV650, anty-F4/80 AF700, anty-Ly6C BV510, anty-Ly6G BV605. Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 45 min. w 4°C, a następnie odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Komórki zawieszono w 500 µl roztworu barwnika CellROX o stężeniu 5 µM sporządzonego w RPMI uzupełnionym o 10% FBS oraz PMA w stężeniu 30 ng/ml i inkubowano przez 30 min. w 37°C. Po tym czasie dwukrotnie odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS za każdym razem wirując (7 min., 192 x g) i zawieszono w 300 µl PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru LSR Fortessa. W celu identyfikacji martwych komórek, bezpośrednio przed analizą do próbek dodano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml).

### 3.2.15. Ocena aktywności supresorowej komórek CD11b<sup>+</sup> wyizolowanych z guzów

Aktywność supresorową komórek CD11b<sup>+</sup> określono na podstawie ich zdolności do hamowania proliferacji splenocytów, uzyskanych od zdrowej myszy szczepu C57BL/6, znakowanych za pomocą barwnika fluorescencyjnego CFDA-SE. Splenocyty znakowano stosując procedurę opisaną w punkcie 3.2.9., a następnie doprowadzono do gęstości 0,5x10<sup>6</sup> kom./ml podłoża hodowlanego uzupełnionego o ConA (4 µg/ml) oraz rh IL-2 (400 U/ml). Na okrągłodenną

płytkę 96-dołkową nałożono po 100 µl/dołek sporządzonej zawiesiny splenocytów oraz 100 µl/dołek ( $0,5 \times 10^6$  kom./ml) zawiesiny komórek CD11b<sup>+</sup> wyizolowanych z guzów. Stosunek liczby komórek CD11b<sup>+</sup> oraz wyznakowanych splenocytów wynosił 1:1. Hodowlę mieszaną prowadzono w warunkach standardowych przez 72 godziny. Po zakończeniu hodowli, płytkę odwirowano (7 min., 192 x g), nadsącz zbierano i przechowywano w 4°C, a komórki zdejmowano z dołków i znakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanymi z fluorochromami: anty-CD11b PerCP-Cy5.5, anty-CD4 APC, anty-CD8 PE-Cy7. Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie odpłukano nadmiar niezwiązanych przeciwciał w PBS z 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszono komórki w 300 µl PBS z 2,5% FBS. Analizę przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa. W celu identyfikacji martwych komórek, bezpośrednio przed analizą do próbek dodano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml). W nadsączach z nad mieszanej hodowli oszacowano stężenie IFN-γ i IL-10 za pomocą testu ELISA, według procedury opisanej w podrozdziale 3.2.5.

### 3.2.16. Ocena fenotypu limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych wyizolowanych od myszy po terapii

Wśród komórek wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych pobranych od myszy podczas doświadczeń, oznaczono populacje limfocytów T, stosując roztwór przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami (tabela 9). Podczas znakowania komórek stosowano procedurę opisaną w podrozdziale 3.2.11.

**Tabela 9.** Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami zastosowane do oznaczeń komórek znajdujących się w węzłach chłonnych pobranych od myszy podczas poszczególnych doświadczeń, których schematy przedstawiono na rycinie 7.

Antygen	Doświadczenie			
	1 A	1 B	1 C	1 D
Oznaczenie limfocytów (próbki utrwalane)				
<b>CD4</b>	APC	PerCP-Cy5.5	FITC	PerCP-Cy5.5
<b>CD8</b>	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
<b>CD44</b>	PE	FITC	PE	FITC
<b>CD62L</b>	-	BV605	BV605	BV605
<b>Ki67</b>	-	APC	APC	APC



### **3.2.17. Ocena zdolności komórek wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych do produkcji cytokin**

Komórki wyizolowane z węzłów chłonnych w liczbie  $1 \times 10^6$  nałożono na płytkę 24-dołkową i uzupełniono RPMI z dodatkiem 10% FBS do objętości 1 ml. Komórki hodowano przez 24 h w warunkach standardowych, a następnie nadsącz zebrało, odwirowano (7 min., 192 x g), przeniesiono do nowej probówki i przechowywano w 4°C. W nadsączach oceniono stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10, za pomocą testu ELISA, który przeprowadzono według procedury opisanej w podrozdziale 3.2.5.

### **3.2.18. Restymulacja komórek śledzionowych uzyskanych od myszy po terapii**

Splenocyty uzyskane od myszy po terapii poddano pięciodniowej restymulacji *in vitro* w obecności komórek nowotworowych MC38. Po tym czasie oceniono aktywność restymulowanych komórek efektorowych.

#### *3.2.18.1. Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek MC38*

Komórki MC38 zdjęto z butelek za pomocą roztworu trypsyny z EDTA, odwirowano (7 min., 192 x g) i zawieszano w RPMI z dodatkiem 5% FBS i 50  $\mu\text{g/ml}$  mitomycyny C, doprowadzając do gęstości  $3 \times 10^6$  kom./ml. Po 30 min. inkubacji w 37°C, komórki odpłukano trzykrotnie w RPMI, za każdym razem wirując (7 min., 192 x g). Następnie komórki zawieszono w RPMI z dodatkiem 5% FBS i nałożono na płytki 24-dołkowe po  $0,1 \times 10^6$  kom./ml/dołek. Hodowlę prowadzono w warunkach standardowych przez 24 h.

#### *3.2.18.2. Przygotowanie komórek efektorowych, zakładanie pięciodniowej hodowli mieszanej*

Splenocyty uzyskane od myszy po terapii i przechowywane w ciekłym azocie rozmrożono w RPMI z dodatkiem 3% FBS i odwirowano (7 min., 192 x g). Komórki zawieszono w RPMI z dodatkiem 10% FBS, liczono i nałożono na przygotowane 24 h wcześniej płytki z jednowarstwową hodowlą komórek MC38, w liczbie  $2 \times 10^6$  kom./ml/dołek. Dodatkowo, dołki uzupełniono o rh IL-2, której końcowe stężenie wynosiło 200 U/ml. Hodowlę mieszaną splenocytów i komórek MC38 prowadzono przez pięć dni w warunkach standardowych.

### **3.2.19. Ocena aktywności restymulowanych komórek efektorowych**

Oceniono aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów wobec docelowych komórek MC38 oraz ekspresję cząsteczek CD107a na powierzchni komórek CD8<sup>+</sup> oraz CD49b<sup>+</sup> uzyskanych w trakcie restymulacji splenocytów stosując procedury opisane w podrozdziale 3.2.7.

Za pomocą testu ELISA, w nadsączach znad pięciodniowej hodowli mieszanej splenocytów oraz komórek MC38 określono stężenia IFN- $\gamma$ , IL-4 oraz IL-10. Test ELISA przeprowadzono według procedury opisanej w podrozdziale 3.2.5.

### 3.2.20. Ocena polaryzacji śledzionowych limfocytów T

Zawiesinę rozmrożonych splenocytów przygotowaną według procedury opisanej w podrozdziale 3.2.18. nałożono na płytki 48-dółkowe (Costar) w liczbie  $0,5 \times 10^6$  kom./0,5 ml/dółek. Do dołek dodano po 50  $\mu$ l roztworu ConA i hIL-2, których końcowe stężenia wynosiły odpowiednio 0,5  $\mu$ g/ml i 200 U/ml. Hodowlę prowadzono przez 48 h w warunkach standardowych. Po tym czasie, do dołek dodano roztwór brefeldyny A i monenzyny o końcowym stężeniu odpowiednio 10  $\mu$ g/ml i 2  $\mu$ M i inkubowano w 37°C przez 1 h. Komórki zdjęto z dołek i znakowano za pomocą barwnika LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Life Technologies) oraz przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym i wewnątrzkomórkowym stosując procedurę opisaną w podrozdziale 3.2.11. Komórki znakowano powierzchniowo za pomocą przeciwciał: anty-CD4 FITC, anty-CD8 APC/Fire 750, a po utrwaleniu zastosowano mieszaninę przeciwciał: anty-T-bet PE-Cy7, anty-FoxP3 APC, anty-IFN- $\gamma$  PE. Wyznakowane splenocyty analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem FACS Diva (Becton Dickinson).

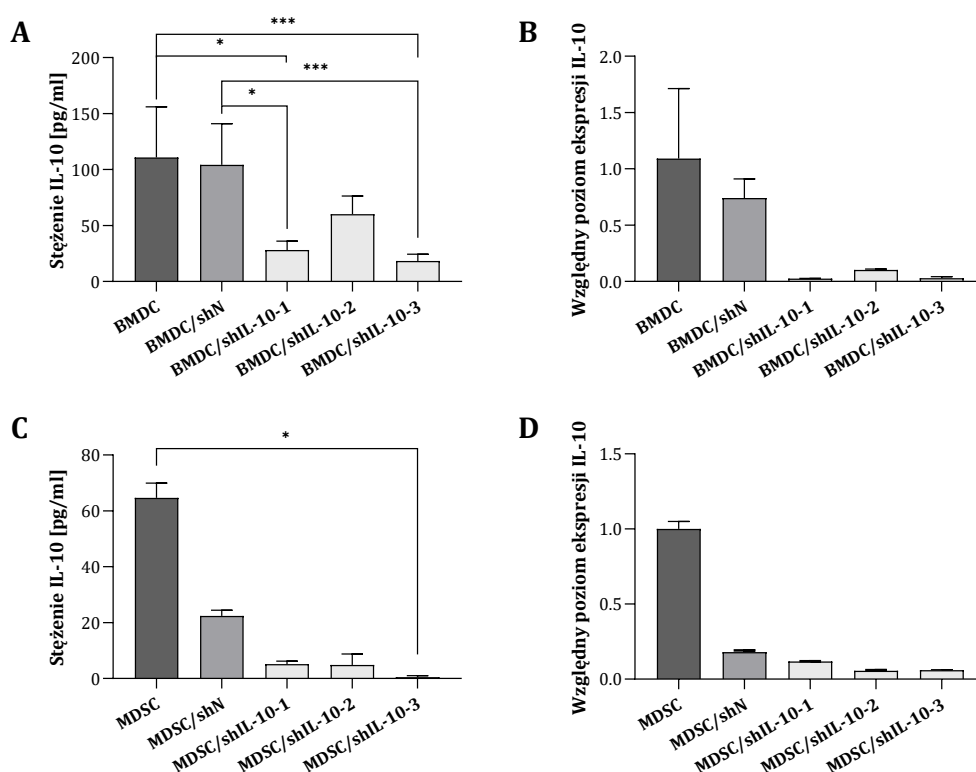
### 3.2.21. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną prowadzono w programie GraphPad Prism 8. Ze względu na małą liczebność grup, analizę wykonano za pomocą testów nieparametrycznych. Do analizy wyników pochodzących z doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vitro* oraz wyników analiz *ex vivo* materiału uzyskanego od zwierząt doświadczalnych stosowano nieparametryczny test ANOVA Kruskalla-Wallis i test *post hoc* Dunna. Analizę statystyczną pomiarów objętości guzów prowadzonych przez cały czas trwania doświadczeń terapeutycznych wykonano za pomocą testu ANOVA Friedmana i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$  zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

## 4. Wyniki

### 4.1. Określenie skuteczności wybranych sekwencji shRNA w wyciszaniu ekspresji IL-10

Celem przeprowadzonych badań był wybór sekwencji shRNA o największej skuteczności w wyciszaniu ekspresji mysiej interleukiny 10. Trzy wybrane sekwencje shRNA (shIL-10-1, shIL-10-2, shIL-10-3) skierowane przeciwko mRNA dla mysiej IL-10 zostały wklonowane do lentiwirusowych plazmidów transferowych. Oprócz wektorów zawierających sekwencje shRNA dla IL-10, w badaniach stosowano również wektory kontrolne kodujące sekwencję shRNA skierowaną przeciwko mRNA dla ludzkiego GAPDH (shN). Zdolność wektorów LV shIL-10 do wyciszenia ekspresji IL-10 oceniono w komórkach dendrytycznych oraz komórkach supresorowych pochodzenia mieloidalnego różnicowanych z komórek szpikowych samic myszy szczepu C57BL/6, w trakcie krótkotrwałej hodowli prowadzonej w warunkach *in vitro* (ryc. 9).



Ryc. 9. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w BMDC i MDSC transdukowanych w warunkach *in vitro* wektorami kodującymi trzy różne sekwencje shRNA dla IL-10 (shIL-10-1, shIL-10-2, shIL-10-3). Jako kontrolę procesu transdukcji zastosowano wektor kodujący negatywną sekwencję shRNA (shN). Stężenie IL-10 w nadsączach pochodowlanych określono za pomocą testu ELISA (A, C). Względny poziom ekspresji mRNA dla IL-10 określono metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (B, D). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Wydajność wyciszenia IL-10 w komórkach określono na podstawie stężenia IL-10 w nadsączach hodowlanych (ryc. 9 A, C) oraz poziomu ekspresji mRNA dla IL-10 (ryc. 9 B, D).

Z uwagi na to, że zarówno w BMDC, jak i w MDSC największą wydajność wyciszenia IL-10 uzyskano po transdukcji wektorami zawierającymi trzecią sekwencję shRNA (shIL-10-3), to te wektory wybrano do dalszych etapów badań.

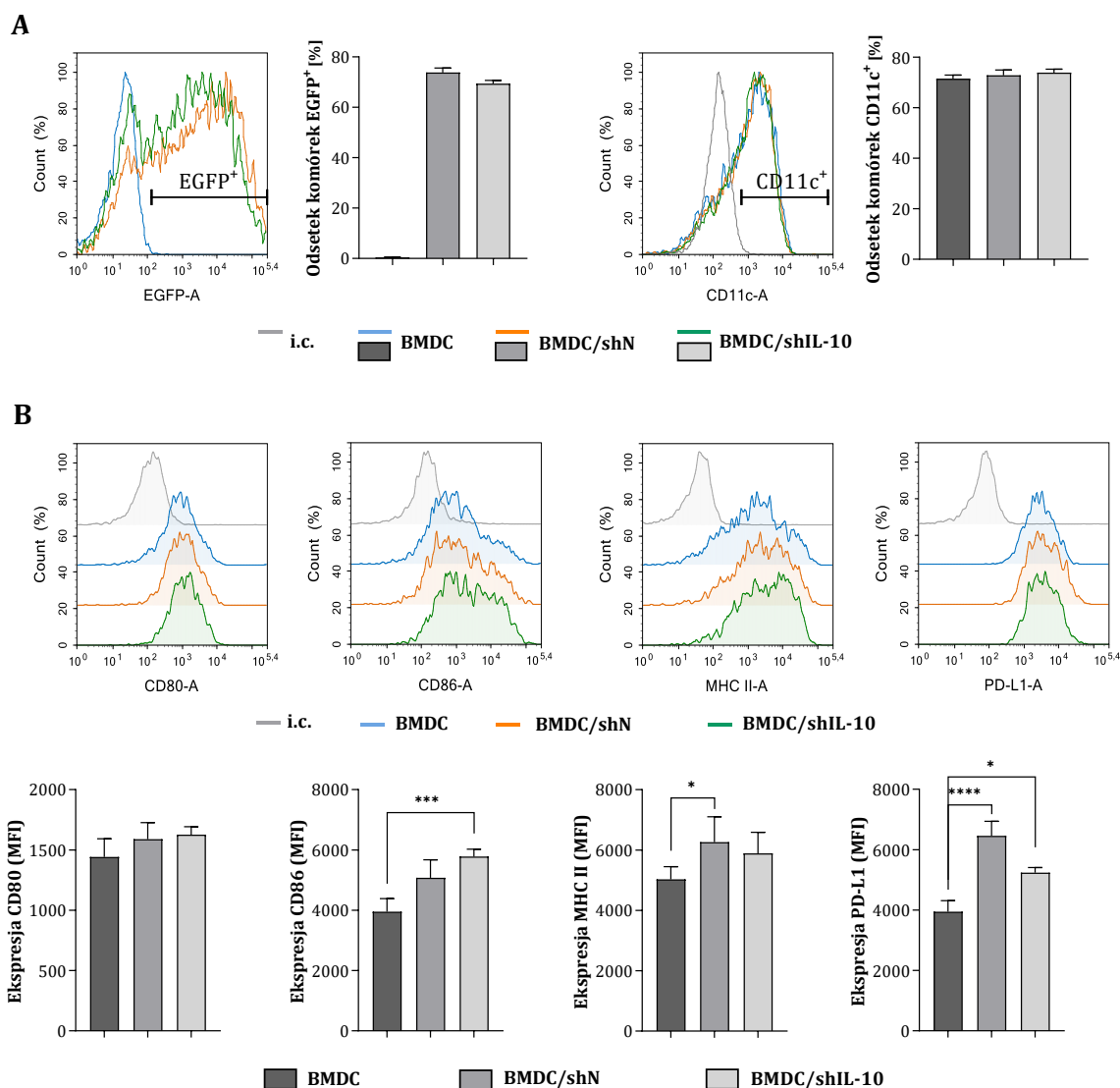
## 4.2. Określenie aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10 w warunkach *in vitro*

W kolejnym etapie badań, określono zmiany zachodzące w aktywności mysich komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego pod wpływem transdukcji wybranymi wektorami wyciszającymi ekspresję IL-10 (BMDC/shIL-10), w porównaniu do komórek transdukowanych wektorami kontrolnymi (BMDC/shN) oraz nietransdukowanych (BMDC). Oceniono poziom zróżnicowania komórek na podstawie ekspresji cząsteczek kostymulujących i głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II, a także zdolność transdukowanych komórek dendrytycznych do pierwotnej stymulacji swoistej odpowiedzi komórkowej.

### 4.2.1. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania BMDC

Do transdukcji wykorzystano komórki dendrytyczne różnicowane w trakcie sześciodniowej hodowli mysich komórek szpikowych, prowadzonej w obecności rm GM-CSF i rm IL-4. Dwa dni po transdukcji, komórki wyznakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami, a następnie przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej. Na podstawie poziomu ekspresji białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (EGFP), które zastosowano w wektorach jako marker selekcyjny, oznaczono również wydajność transdukcji.

Analiza ekspresji EGFP w komórkach wykazała wysoką wydajność transdukcji (na poziomie 70%) zarówno po zastosowaniu wektorów LV shN, jak i LV shIL-10 (ryc. 10 A). Na podstawie ekspresji markera CD11c<sup>+</sup> oznaczono odsetek komórek dendrytycznych w hodowli, który wynosił około 70% i nie zmieniał się po transdukcji komórek (ryc. 10 A). Analiza poziomu ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86, cząsteczek MHC II oraz cząsteczek PD-L1 umożliwiła natomiast określenie stopnia zróżnicowania komórek z wyciszoną ekspresją IL-10 w odniesieniu do komórek transdukowanych wektorami kontrolnymi oraz nietransdukowanych (ryc. 10 B). Po transdukcji nie wykazano znaczących zmian w ekspresji CD80, natomiast zaobserwowano istotny wzrost poziomu ekspresji CD86 na powierzchni BMDC/shIL-10. Transdukcja wpłynęła również na zmiany w ekspresji cząsteczek MHC II, nie były one jednak zależne od wyciszenia ekspresji IL-10, a od kontaktu komórek z wektorami lentiwirusowymi. Na powierzchni BMDC/shN wykazano istotnie wyższy niż na BMDC poziom ekspresji markera PD-L1. Po transdukcji wektorami LV shIL-10 także zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji PD-L1 w porównaniu do komórek nietransdukowanych, jednak efekt nie był tak znaczny jak dla wektorów kontrolnych.



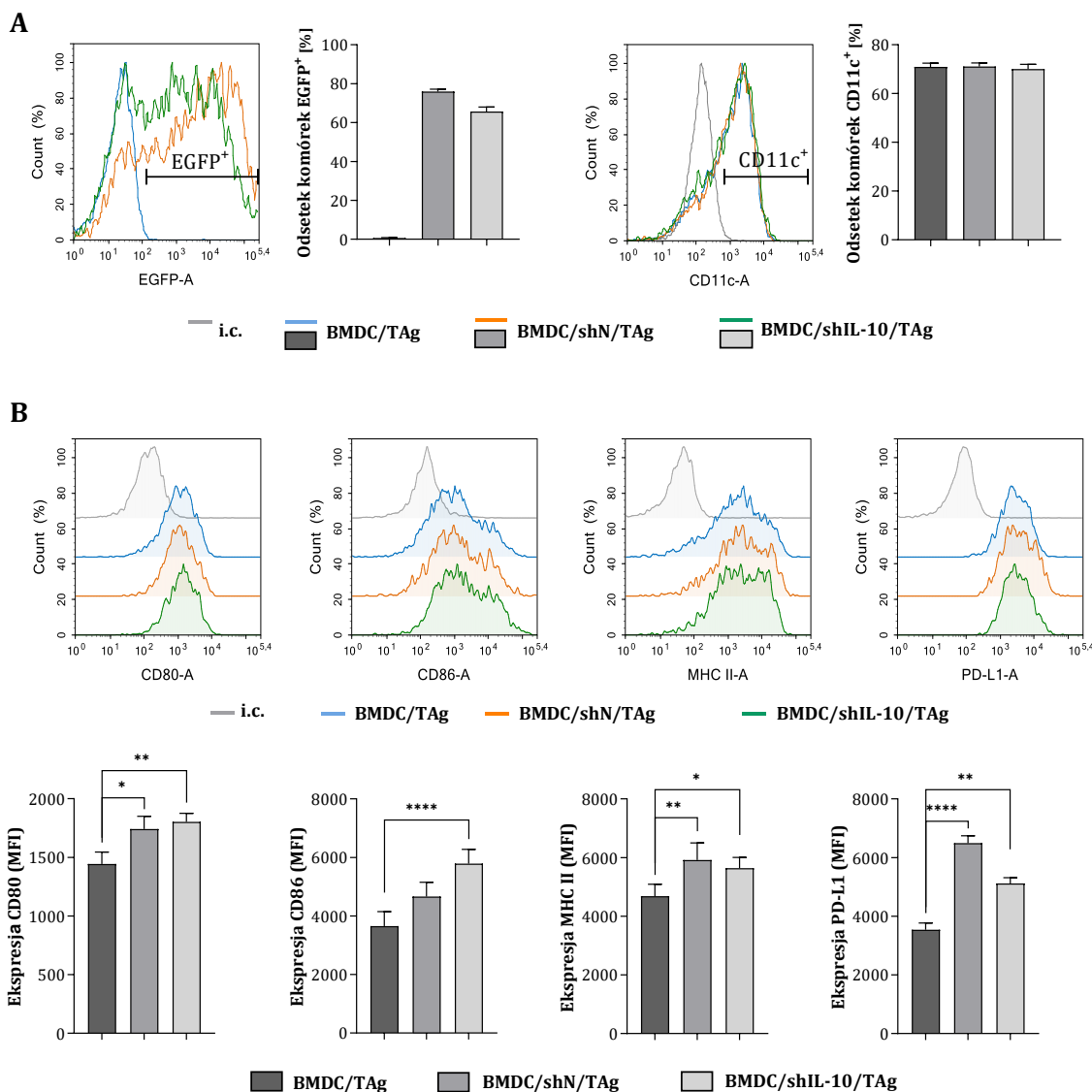
**Ryc. 10. Charakterystyka fenotypowa BMDC transdukowanych wektorami kodującymi shRNA dla IL-10.** Niedojrzałe BMDC transdukowano 6-go dnia hodowli wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA dla IL-10 (shIL-10) oraz wektorami kontrolnymi (shN). Po 48 godzinach określono wydajność transdukcji oraz odsetek komórek dendrytycznych (CD11c<sup>+</sup>) uzyskanych w trakcie hodowli (A). Na podstawie ekspresji cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86), cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) oraz ligandu dla receptora PD-1 (PD-L1), przedstawionej jako średnia intensywność fluorescencji (MFI), oceniono poziom zróżnicowania komórek (B). Na rycinie przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

#### 4.2.2. Ocena zdolności BMDC z wyciszoną ekspresją IL-10 do indukcji swoistej odpowiedzi komórkowej

W celu określenia wpływu wyciszenia IL-10 na zdolność BMDC do pierwotnego pobudzenia limfocytów T, transdukowane BMDC były dodatkowo stymulowane antygenami nowotworowymi w postaci lizatu z komórek mysiego raka jelita grubego MC38 (TAg).

Charakterystyka fenotypowa tak przygotowanych komórek dendrytycznych, a jednocześnie ocena wydajności transdukcji wykazały, że odsetek komórek EGFP<sup>+</sup> w hodowli transdukowanej

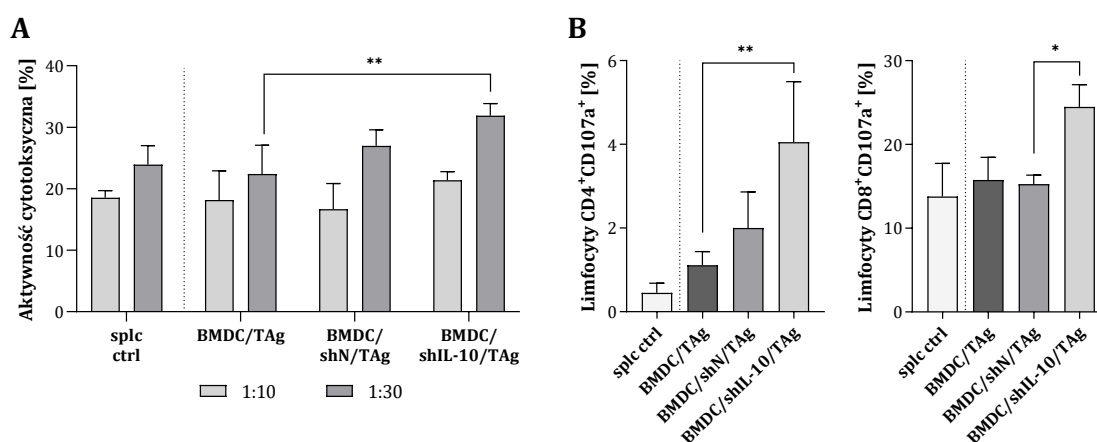
wektorami LV shIL-10 był nieco niższy niż w hodowli transdukowanej wektorami LV shN i wynosił odpowiednio 66% i 76% (ryc. 11 A). Podobnie jak w przypadku komórek niestymulowanych antygenami nowotworowymi, analiza poziomu ekspresji markera CD11c<sup>+</sup> nie wykazała zmian w odsetku komórek dendrytycznych pod wpływem transdukcji (ryc. 11 A).



**Ryc. 11. Charakterystyka fenotypowa BMDC z wyciszoną ekspresją IL-10 stymulowanych antygenami nowotworowymi.** Niedojrzałe BMDC transdukowano 6-go dnia hodowli wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA dla IL-10 (shIL-10) oraz wektorami kontrolnymi (shN). Po 24 godzinach, po odplukaniu cząstek wirusowych, do hodowli dodano antygeny nowotworowe, a 24 godziny później określono wydajność transdukcji oraz odsetek komórek dendrytycznych (CD11c<sup>+</sup>) uzyskanych w trakcie hodowli (A). Poziom zróżnicowania komórek określono na podstawie ekspresji cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86), cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) oraz ligandu dla receptora PD-1 (PD-L1), przedstawionych jako średnia intensywność fluorescencji (MFI) (B). Na rycinie przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Zaobserwowano natomiast istotny wzrost poziomu ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na powierzchni BMDC/shIL-10/TAg w porównaniu do BMDC/TAg (ryc. 11 B). W przypadku analizy poziomu ekspresji cząsteczek MHC II i PD-L1, obserwowano zmiany zbliżone do tych odnotowanych dla BMDC niestymulowanych antygenami nowotworowymi (ryc. 11 B).

Następnie określono zdolność BMDC/shIL-10/TAg do pierwotnej stymulacji dziewiczych limfocytów T i pobudzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W tym celu prowadzono kokulturę transdukowanych komórek dendrytycznych ze splenocytami izolowanymi ze śledzion zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6. Po pięciu dniach hodowli określono aktywność cytotoksyczną stymulowanych splenocytów wobec komórek MC38. Oszacowano także odsetek cytotoksycznych limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek CD107a po dwugodzinnej inkubacji z komórkami MC38 (ryc. 12).



**Ryc. 12. Zdolność BMDC z wyciszoną ekspresją IL-10 do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych.** Komórki wyizolowane ze śledziony zdrowej myszy hodowano przez 5 dni w obecności transdukowanych BMDC stymulowanych antygenami nowotworowymi. Aktywność cytotoksyczną efektorowych komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 i 1:30 (A). Odsetek komórek cytotoksycznych (CD107a<sup>+</sup>) określono wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> po 2-godzinnej inkubacji z komórkami MC38 (B). Na rycinie przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Analizę statystyczną wykonano za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Na podstawie analizy aktywności cytotoksycznej splenocytów hodowanych w obecności komórek dendrytycznych stwierdzono, że proces prezentacji antygenów nowotworowych limfocytom T przez BMDC/shIL-10/TAg był bardziej wydajny niż w przypadku kontrolnych BMDC/shN/TAg. Po hodowli splenocytów w obecności BMDC/shIL-10/TAg odnotowano największą aktywność cytotoksyczną efektorowych limfocytów T wobec docelowych komórek MC38. (ryc. 12 A). Ponadto, oceniając poziom ekspresji CD107a na powierzchni efektorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> wykazano, że komórki indukowane przez BMDC/shIL-10/TAg charakteryzują się znacznie zwiększoną zdolnością do uwalniania ziaren cytolitycznych.



(ryc. 12 B). Należy podkreślić, że odsetek komórek CD107a<sup>+</sup> wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> był niewielki i wynosił 4%. Z kolei, wśród limfocytów T CD8<sup>+</sup>, które wykorzystują degranulację ziaren cytolitycznych jako jeden z mechanizmów cytotoxyczności, odsetek komórek CD107a<sup>+</sup> wynosił 25%. Efekt ten nie był obserwowany wśród splenocytów hodowanych w obecności kontrolnych BMDC/shN/TAg i BMDC/TAg.

#### 4.2.3. Podsumowanie

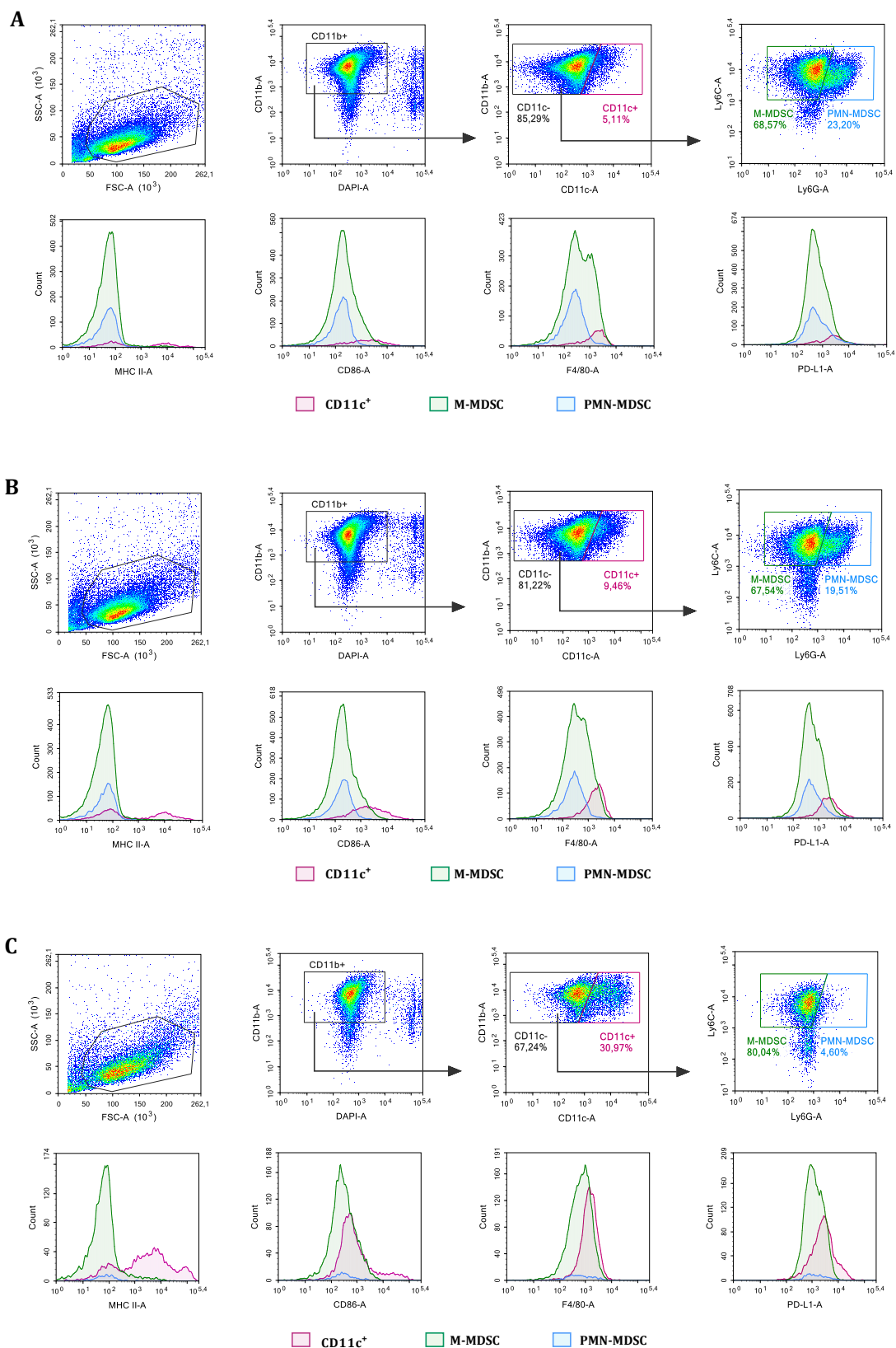
Przeprowadzone badania wykazały, że wyciszenie ekspresji IL-10 za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA, skierowane przeciwko mRNA dla IL-10, wpływa na aktywność mysich komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego. BMDC/shIL-10 charakteryzowały się zwiększoną ekspresją cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 w porównaniu do komórek nietransdukowanych oraz nieznacznie obniżonym poziomem ekspresji antygeny PD-L1 w odniesieniu do BMDC/shN. Kolejne analizy, przeprowadzone z zastosowaniem BMDC, które po transdukcji dodatkowo stymulowano antygenami nowotworowymi, potwierdziły wpływ wyciszenia ekspresji IL-10 na zwiększenie skuteczności BMDC w prezentacji antygenów nowotworowych dziewiczym limfocytom T, a w konsekwencji, ich wydajności w indukowaniu swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Komórki śledzionowe hodowane w obecności BMDC/shIL-10/TAg wykazywały podwyższoną aktywność cytotoxyczną wobec komórek mysiego raka jelita grubego MC38. Badając mechanizm cytotoxyczności wykorzystywany przez efektorowe limfocyty T stwierdzono, że limfocyty T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> stymulowane za pomocą BMDC/shIL-10/TAg wykazywały większą zdolność do wydzielania ziaren cytolitycznych niż limfocyty hodowane w obecności BMDC/TAg lub BMDC/shN/TAg.

### **4.3. Określenie aktywności komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego z wyciszoną ekspresją IL-10 w warunkach *in vitro***

W celu określenia aktywności komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego z wyciszoną ekspresją IL-10, opracowano metodę hodowli mysich komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego samic myszy szczepu C57BL/6, umożliwiającą uzyskanie MDSC w warunkach *in vitro*. Następnie, uzyskane komórki poddano transdukcji wektorami LV shIL-10 lub LV shN. Przeprowadzono charakterystykę fenotypową uzyskanych komórek, w trakcie której określono wydajność transdukcji, a także oznaczono poziom ekspresji markerów charakterystycznych dla populacji dojrzałych komórek mieloidalnych. W kolejnym etapie, oceniono aktywność supresorową transdukowanych MDSC wobec limfocytów T pochodzących ze śledzion zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6.

#### **4.3.1. Charakterystyka MDSC uzyskanych w trakcie krótkotrwałej hodowli mysich komórek szpikowych**

MDSC uzyskano w trakcie sześciodniowej hodowli mysich komórek szpikowych prowadzonej w podłożu kondycjonującym, którego 75% objętości stanowił nadsącz z hodowli komórek mysiego raka jelita grubego MC38 prowadzonej w warunkach hipoksji. Podłoże dodatkowo uzupełniono o rm GM-CSF w stężeniu 80 ng/ml (ryc. 13 A). Charakterystykę komórek uzyskanych w trakcie hodowli prowadzonej w podłożu zawierającym czynniki produkowane przez komórki nowotworowe przeprowadzono w porównaniu do komórek hodowanych w podłożu zawierającym rm GM-CSF w stężeniu 80 ng/ml (ryc. 13 B), a także w porównaniu do komórek hodowanych w obecności rm GM-CSF w stężeniu 40 ng/ml oraz rm IL-4 w stężeniu 10 ng/ml umożliwiającym różnicowanie komórek szpikowych do niedojrzałych komórek dendrytycznych (ryc. 13 C). Po sześciu dniach hodowli, analizę komórek uzyskanych w różnych warunkach przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej według schematu przedstawionego na rycinie 13. Populację żywych komórek mieloidalnych (CD11b<sup>+</sup>) rozdzielono na podstawie ekspresji markera CD11c, a następnie wśród komórek CD11c<sup>-</sup> zidentyfikowano subpopulacje M-MDSC (Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) oraz PMN-MDSC (Ly6C<sup>int</sup>Ly6G<sup>+</sup>). Oznaczono także poziom ekspresji cząsteczek MHC II, CD86, F4/80 oraz PD-L1 na powierzchni zidentyfikowanych populacji (ryc. 13).



**Ryc. 13. Charakterystyka fenotypowa mysich komórek pochodzenia szpikowego.** Komórki hodowano w podłożu hodowlanym zawierającym nadsącz z nad komórek MC38 uzupełnionym o rm GM-CSF (A), podłożu hodowlanym uzupełnionym o rm GM-CSF (B) oraz w podłożu hodowlanym uzupełnionym o rm GM-CSF i rm IL-4 (C). Po 6 dniach, metodą cytometrii przepływowej oszacowano odsetek komórek dendrytycznych ( $CD11c^+$ ), M-MDSC ( $CD11c^+Ly6C^+Ly6G^-$ ) i PMN-MDSC ( $CD11c^+Ly6C^{int}Ly6G^+$ ) w poszczególnych hodowlach, a także określono stopień zróżnicowania populacji komórek na podstawie ekspresji cząsteczek MHC II, CD86, F4/80 i PD-L1. Na rycinie przedstawiono wykresy punktowe oraz histogramy z prób reprezentatywnych.

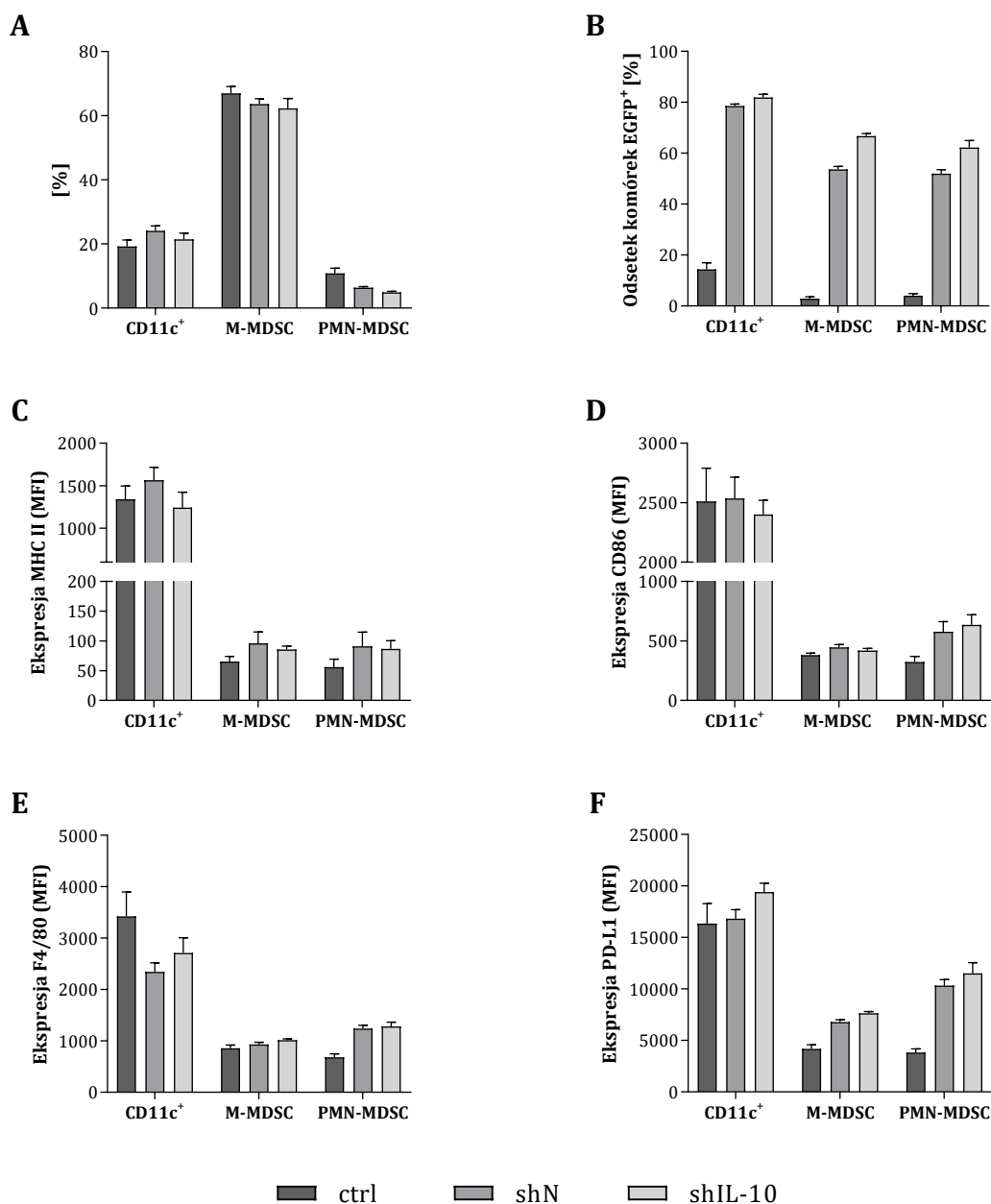
Analiza wykazała, że w hodowli prowadzonej w obecności nadsącza znad hodowli komórek MC38 uzyskano najmniejszy odsetek komórek CD11c<sup>+</sup>, przy zachowaniu wysokich odsetków komórek o fenotypie charakterystycznym dla M-MDSC i PMN-MDSC (ryc. 13 A). W tej hodowli, odsetek komórek dendrytycznych CD11c<sup>+</sup> wynosił jedynie 5%. Dla porównania, w hodowli prowadzonej w podłożu bez dodatku czynników produkowanych przez komórki MC38 odnotowano niemal dwukrotnie większy odsetek komórek CD11c<sup>+</sup>, a wśród komórek CD11c<sup>-</sup> oznaczono mniej komórek o fenotypie PMN-MDSC (ryc. 13 B). Zgodnie z założeniem, największe zróżnicowanie w kierunku komórek dendrytycznych obserwowano w hodowli prowadzonej w obecności rm GM-CSF i rm IL-4 (ryc. 13 C). W tych warunkach uzyskano także najmniej komórek o fenotypie PMN-MDSC, w porównaniu do pozostałych hodowli. Dodatkowo, analiza poziomu ekspresji markerów takich jak MHC II, CD86, F4/80 oraz PD-L1, charakterystycznych dla dojrzałych komórek mieloidalnych, wykazała, że komórki o najmniejszym stopniu zróżnicowania uzyskano podczas hodowli prowadzonej w obecności nadsącza znad komórek MC38. Powyższa charakterystyka komórek potwierdziła założenie, że czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe hamują różnicowanie komórek mieloidalnych w kierunku dojrzałych komórek dendrytycznych lub makrofagów.

#### 4.3.2. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na poziom zróżnicowania MDSC

Do realizacji kolejnego etapu badań wykorzystano niedojrzałe komórki o charakterystyce komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego, uzyskane w trakcie sześciodniowej hodowli komórek szpikowych prowadzonej w warunkach opisanych w poprzednim podrozdziale. Komórki poddano transdukcji wektorami LV shIL-10, a jako kontrolę zastosowano komórki transdukowane wektorami LV shN oraz komórki nietransdukowane (ctrl). Po trzech dniach, dokonano charakterystyki transdukowanych komórek metodą cytometrii przepływowej. W trakcie analizy, na podstawie ekspresji EGFP, oszacowano wydajność transdukcji oraz określono odsetek komórek CD11c<sup>+</sup>, M-MDSC i PMN-MDSC w hodowlach. Dodatkowo, oznaczono poziom ekspresji cząsteczek MHC II, CD86, F4/80 oraz PD-L1 na powierzchni komórek EGFP<sup>+</sup>, w odniesieniu do komórek nietransdukowanych.

Dziewiątego dnia, w hodowli prowadzonej w obecności czynników produkowanych przez komórki MC38, zidentyfikowano 19% komórek CD11c<sup>+</sup>, 67% M-MDSC oraz 11% PMN-MDSC (ryc. 14 A). Transdukcja za pomocą wektorów lentiwirusowych nie wpłynęła na dalsze różnicowanie komórek w kierunku komórek dendrytycznych wykazujących ekspresję cząsteczek CD11c. Zaobserwowano natomiast niewielkie obniżenie odsetków MDSC. Największe zmiany odnotowano w przypadku PMN-MDSC, których po transdukcji wektorem LV shIL-10 pozostało w hodowli jedynie 5%. Zaobserwowano, że wydajność transdukcji różniła się pomiędzy poszczególnymi populacjami znajdującymi się w hodowlach. Wśród komórek CD11c<sup>+</sup> odnotowano

około 80% komórek EGFP<sup>+</sup>, niezależnie od rodzaju zastosowanych wektorów (ryc. 14 B). Z kolei, niedojrzałe M-MDSC i PMN-MDSC okazały się mniej podatne na transdukcję. Po zastosowaniu wektorów LV shN odnotowano wśród tych populacji odpowiednio 54% i 52% komórek EGFP<sup>+</sup>. Nieco wyższą wydajność transdukcji, wynoszącą 67% wśród M-MDSC i 62% wśród PMN-MDSC, uzyskano po zastosowaniu wektorów LV shIL-10.



**Ryc. 14. Ocena poziomu zróżnicowania MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10.** Komórki pochodzenia szpikowego hodowane w obecności rm GM-CSF i nadsącza z nad komórek MC38 transdukowano 6-go dnia hodowli wektorami LV shIL-10 oraz wektorami LV shN. 9-go dnia hodowli, metodą cytometrii przepływowej oszacowano odsetek komórek CD11c<sup>+</sup>, M-MDSC i PMN-MDSC (A) oraz wydajność transdukcji (B). Poziom ekspresji cząsteczek MHC II (C), CD86 (D), F4/80 (E) i PD-L1 (F) na powierzchni komórek transdukowanych (shN lub shIL-10), przedstawiony jako średnia intensywność fluorescencji (MFI), określono w porównaniu do komórek nietransdukowanych (ctrl). Na rycinie przedstawiono wyniki z testu reprezentatywnego.

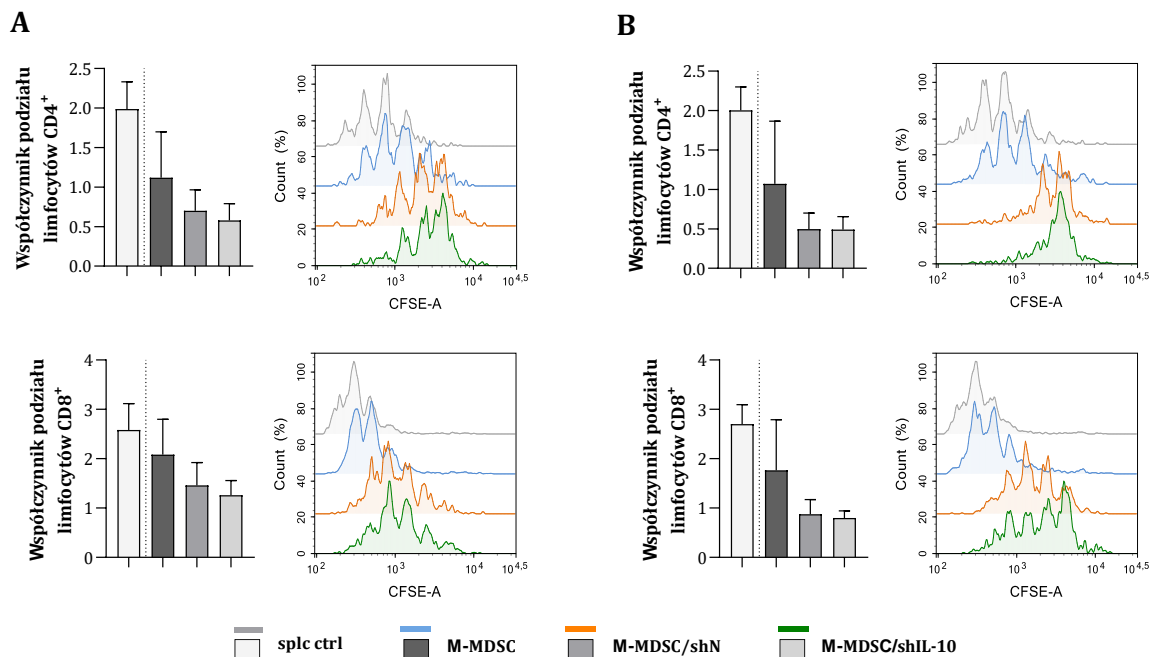
Analiza poziomu ekspresji cząsteczek MHC II (ryc. 14 C), CD86 (ryc. 14 D) oraz F4/80 (ryc. 14 E) nie wykazała zmian zależnych od wyciszenia ekspresji IL-10 w komórkach. Odnotowano jedynie nieznaczne podwyższenie poziomu ekspresji wymienionych antygenów na powierzchni transdukowanych PMN-MDSC, jednak zmiany zachodziły zarówno pod wpływem transdukcji wektorami LV shIL-10, jak i LV shN. Zaobserwowano natomiast znaczne podwyższenie poziomu ekspresji PD-L1 na powierzchni transdukowanych M-MDSC i PMN-MDSC, niezależne od rodzaju zastosowanych wektorów (ryc. 14 F). Natomiast, po wyciszeniu ekspresji IL-10, komórki CD11c<sup>+</sup> wykazywały zwiększony poziom ekspresji PD-L1, zarówno w porównaniu do komórek nietransdukowanych, jak i transdukowanych wektorami kontrolnymi.

#### **4.3.3. Ocena aktywności supresorowej MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 wobec limfocytów T**

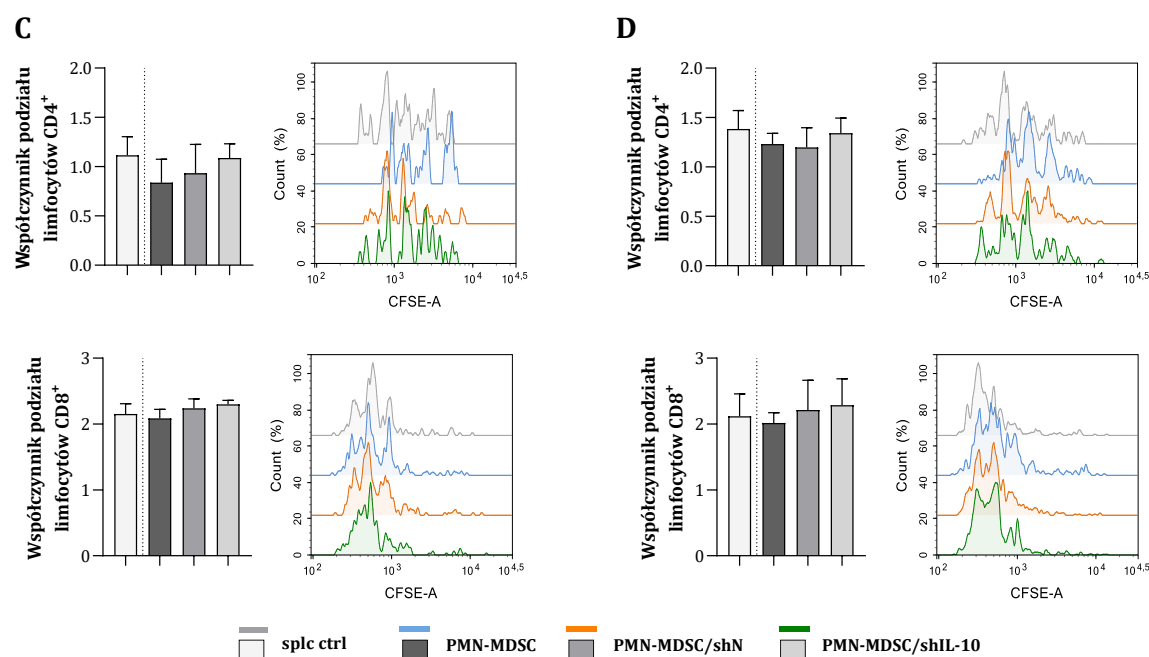
Jak przedstawiono w poprzednim podrozdziale, w hodowli mysich komórek szpikowych prowadzonej w obecności czynników produkowanych przez komórki MC38, zidentyfikowano zarówno niedojrzałe M-MDSC i PMN-MDSC, jak i komórki wykazujące ekspresję markera CD11c, różnicujące się w kierunku komórek dendrytycznych. Z tego względu, w celu określenia wpływu wyciszenia IL-10 na aktywność MDSC, z hodowli komórek transdukowanych wektorami lentiwirusowymi wyizolowano za pomocą sortera FACS komórki o fenotypie M-MDSC oraz PMN-MDSC, wykazujące ekspresję EGFP. Populacje M-MDSC oraz PMN-MDSC wyizolowano także z hodowli nietransdukowanej. Uzyskane komórki wykorzystano do założenia hodowli mieszanej ze splenocytami pochodzącymi od zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6. Komórki śledzionowe uprzednio wyznakowano za pomocą barwnika CFDA-SE, który umożliwił monitorowanie intensywności proliferacji splenocytów w obecności MDSC. Hodowlę mieszaną wyznakowanych splenocytów oraz wysortowanych M-MDSC lub PMN-MDSC prowadzono w podłożu z dodatkiem konkanawaliny A oraz IL-2. Kontrolnie prowadzono hodowlę znakowanych splenocytów bez MDSC. Po trzech dniach, metodą cytometrii przepływowej, określono zmiany w intensywności fluorescencji splenocytów znakowanych CFDA-SE odpowiadające podziałom komórkowym.

W trakcie analizy proliferacji splenocytów w obecności transdukowanych M-MDSC lub PMN-MDSC, oszacowano liczbę podziałów komórkowych zachodzących w populacjach limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>. Na wykresach zamieszczonych na rycinie 15, przedstawiono współczynnik podziału limfocytów T, wyrażony jako stosunek całkowitej liczby podziałów komórkowych do liczby komórek na początku hodowli.

## Proliferacja splenocytów w obecności M-MDSC



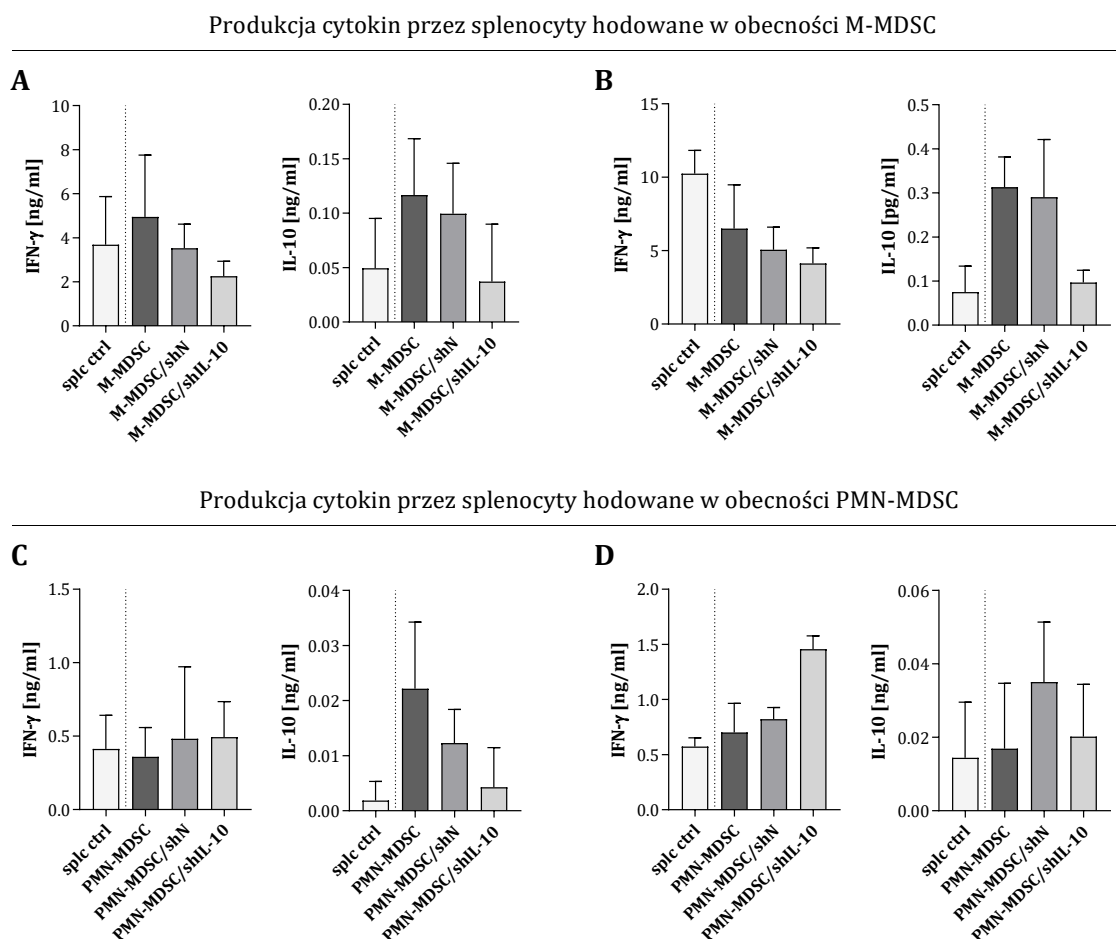
## Proliferacja splenocytów w obecności PMN-MDSC

**Ryc. 15. Intensywność proliferacji limfocytów T w obecności MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10.**

Transdukowane M-MDSC i PMN-MDSC, wykazujące ekspresję EGFP zostały wyizolowane z hodowli za pomocą sortera FACS Aria. Splenocyty ze zdrowej myszy wyznakowane barwnikiem CFDA-SE hodowano w obecności M-MDSC (**A, B**) oraz PMN-MDSC (**C, D**). Stosunek liczby splenocytów do MDSC wynosił 1:1 (**A, C**) lub 2:1 (**B, D**). Kontrolnie, prowadzono hodowlę znakowanych splenocytów bez MDSC (splc ctrl). Po 3 dniach, w limfocytach T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> zbadano intensywność fluorescencji barwnika CFDA-SE. Na wykresach przedstawiono uśredniony współczynnik podziału limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> (stosunek całkowitej liczby podziałów komórkowych do liczby komórek na początku hodowli) wyznaczone dla dwóch doświadczeń. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.

Zaobserwowano, że splenocyty hodowane w obecności transdukowanych M-MDSC proliferowały mniej intensywnie, niż splenocyty hodowane w obecności komórek nietransdukowanych (ryc. 15 A, B). Wyciszenie ekspresji IL-10 powodowało dodatkowe zwiększenie aktywności supresorowej M-MDSC wobec limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>, co odnotowano w przypadku, gdy początkowa liczba komórek śledzionowych i M-MDSC była równa (ryc. 15 A). Z kolei, zwiększenie intensywności proliferacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> w hodowlach prowadzonych w obecności PMN-MDSC/shIL-10 wskazuje na zmniejszenie aktywności supresorowej PMN-MDSC pod wpływem wyciszenia ekspresji IL-10 (ryc. 15 C, D). W przypadku limfocytów T CD8<sup>+</sup>, podwyższony współczynnik proliferacji obserwowano w hodowlach prowadzonych w obecności transdukowanych PMN-MDSC, niezależnie od rodzaju zastosowanego wektora.

W celu określenia wpływu MDSC na zdolność splenocytów do produkcji cytokin, w nadsączach znad hodowli mieszanej oznaczono stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10 (ryc. 16).



**Ryc. 16. Produkcja cytokin przez splenocyty hodowane w obecności MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10.** Stężenia IFN- $\gamma$  i IL-10 oszacowano w nadsączach znad 3-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i M-MDSC (A, B) lub PMN-MDSC (C, D) za pomocą testu ELISA. Stosunek splenocytów do MDSC wynosił 1:1 (A, C) lub 2:1 (B, D). Kontrolnie, prowadzono hodowlę splenocytów bez MDSC (splc ctrl). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane dla dwóch testów. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.



Splenocyty hodowane w obecności M-MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 produkowały mniej IFN- $\gamma$  niż splenocyty hodowane w obecności komórek nietransdukowanych lub transdukowanych wektorami kontrolnymi (ryc. 16 A, B). Ponadto, stężenie IL-10 oznaczone w nadsączach znad hodowli splenocytów i M-MDSC/shIL-10 było dużo niższe niż to oznaczone w nadsączach znad hodowli prowadzonej w obecności M-MDSC lub M-MDSC/shN. W przypadku produkcji cytokin przez splenocyty hodowane w obecności PMN-MDSC zaobserwowano, że komórki z wyciszoną ekspresją IL-10 były w stanie pobudzić splenocyty do produkcji IFN- $\gamma$ , co było widoczne gdy stosunek liczbowy splenocytów do PMN-MDSC w hodowli mieszanej wynosił 2:1 (ryc. 16 D). Ponadto, podobnie jak w przypadku hodowli mieszanej w obecności M-MDSC, odnotowano, że PMN-MDSC/shIL-10 nie wpływały na zwiększenie produkcji IL-10 przez splenocyty (ryc. 16 C, D).

#### 4.3.4. Podsumowanie

MDSC do testów *in vitro* pozyskiwano z hodowli mysich komórek szpikowych prowadzonej w obecności r<sub>m</sub> GM-CSF oraz nadsączu znad hodowli komórek MC38. Analiza poziomu ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek mieloidalnych nie wykazała wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na dalsze różnicowanie MDSC w kierunku dojrzałych makrofagów lub komórek dendrytycznych. Natomiast, analiza intensywności proliferacji oraz profilu cytokinowego splenocytów hodowanych w obecności M-MDSC lub PMN-MDSC potwierdziła wpływ wyciszenia ekspresji IL-10 na zmiany w aktywności supresorowej wyodrębnionych subpopulacji MDSC. Monocytarne MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10 wykazywały zwiększoną aktywność supresorową wobec splenocytów, co skutkowało zahamowaniem proliferacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD 8<sup>+</sup>, i obniżoną zdolnością splenocytów do produkcji cytokin. Z kolei, PMN-MDSC pod wpływem wyciszenia IL-10 utraciły aktywność supresorową. Nie obserwowano bowiem zahamowania proliferacji splenocytów hodowanych w obecności tych komórek. Co więcej, w nadsączach znad hodowli splenocytów z komórkami PMN-MDSC/shIL-10 stężenie IFN- $\gamma$  było wyższe niż w przypadku pozostałych hodowli. Uzyskane wyniki wskazują na odmienną rolę IL-10 w aktywacji mechanizmów supresji wykorzystywanych przez subpopulacje MDSC. Podczas gdy obecność tej cytokiny w środowisku wydaje się być ważna dla indukcji aktywności supresorowej PMN-MDSC, to w przypadku M-MDSC zwiększoną aktywność supresorową tych komórek obserwowano po wyciszeniu ekspresji IL-10.

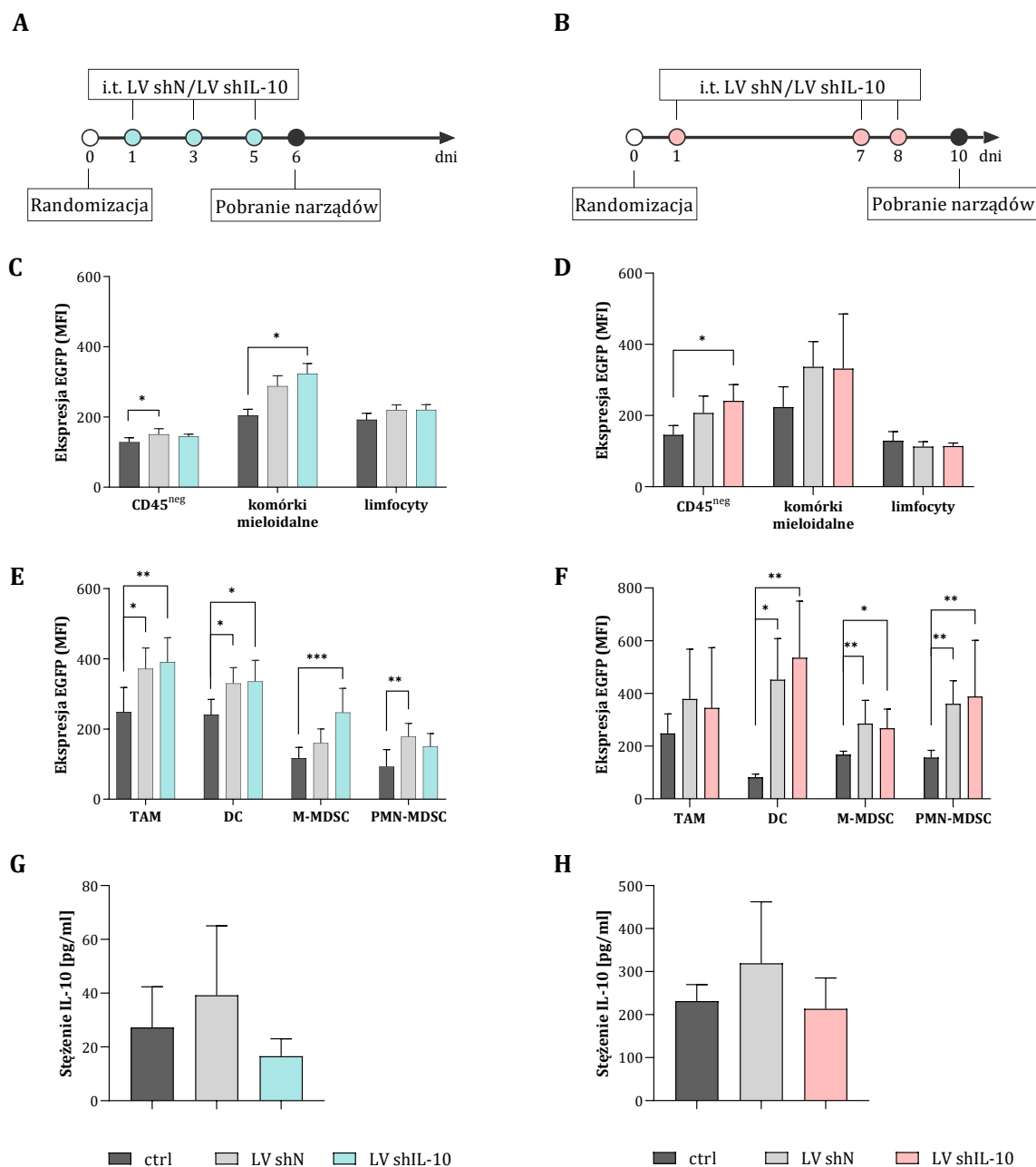
#### **4.4. Określenie aktywności komórek układu odpornościowego po doguzowym podaniu wektorów wyciszających ekspresję IL-10**

W celu określenia wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych na aktywność komórek układu odpornościowego, przeprowadzono szereg doświadczeń w układzie *in vivo* i *ex vivo*. W pierwszym etapie badań, myszom z rosnącymi podskórnymi guzami mysiego raka jelita grubego MC38 podawano doguzowo wektory lentiwirusowe kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko mRNA dla IL-10. W drugim etapie, przeprowadzono doświadczenia, w których podania wektorów zostały uzupełnione o jednokrotne, dootrzewnowe podanie immunomodulującej dawki cyklofosfamidu poprzedzające wyciszenie IL-10 w guzach nowotworowych za pomocą wektorów lentiwirusowych. Zarówno w pierwszym, jak i drugim etapie badań wektory lentiwirusowe były podawane trzykrotnie według dwóch schematów. W doświadczeniach przeprowadzonych według pierwszego (krótkiego) schematu wektory podawane były w odstępach dwudniowych w ciągu jednego tygodnia. Natomiast w doświadczeniach przeprowadzonych zgodnie z drugim schematem postępowania (dłuższym) czas pomiędzy pierwszym, a drugim podaniem wektorów był dłuższy i wynosił sześć dni. Zastosowanie podań wektorów w dwóch schematach umożliwiło, oprócz oceny wydajności transdukcji, obserwację zmian aktywności komórek układu odpornościowego zachodzących pod wpływem podań wektorów i określenie kinetyki rozwoju odpowiedzi przeciwnowotworowej.

##### **4.4.1. Kinetyka indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10**

###### *4.4.1.1. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach MC38*

Przeprowadzono dwa doświadczenia, w których wektory LV shIL-10 lub LV shN, podawano myszom trzykrotnie, według schematów przedstawionych na rycinie 17 A, B. Szóstego lub dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań wektorów LV, oceniono wydajność transdukcji zachodzącej w guzach. Na podstawie analizy przeprowadzonej metodą cytometrii przepływowej, określono poziom ekspresji EGFP w zidentyfikowanych w guzach komórkach nowotworowych (CD45<sup>neg</sup>), komórkach mieloidalnych (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) i limfocytach (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>), odpowiadający skuteczności wbudowania shRNA dla IL-10 do genomu komórek znajdujących się w TME.



**Ryc. 17. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych.** Randomizację myszy przeprowadzono, gdy rosące podskórnie guzy MC38 osiągnęły objętość ok. 50 mm<sup>3</sup>. Wektory lentiwirusowe wyciszające ekspresję IL-10 (LV shIL-10) lub kontrolne (LV shN) podawano doguzowo trzykrotnie. Guzy, wartownicze węzły chłonne oraz śledziony pobrano od myszy 6-go (**A**) lub 10-go (**B**) dnia od rozpoczęcia podawania wektorów LV. Określono poziom ekspresji EGFP, przedstawiony jako średnia intensywność fluorescencji (MFI), w komórkach nowotworowych (CD45<sup>neg</sup>), komórkach mieloidalnych (CD11b<sup>+</sup>) oraz limfocytach (CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD49b<sup>+</sup>) naciekających guzy nowotworowe (**C**, **D**), a także w wybranych subpopulacjach komórek mieloidalnych: TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC (**E**, **F**). Stężenie IL-10 w nadsączach znad 24-godzinnej hodowli komórek wyizolowanych z guzów MC38 oszacowano za pomocą testu ELISA (**G**, **H**). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

W doświadczeniu, w którym wektory podawano trzykrotnie co dwa dni, analiza przeprowadzona szóstego dnia po rozpoczęciu iniekcji wykazała niewielki wzrost ekspresji EGFP

wśród komórek CD45<sup>neg</sup> oraz limfocytów (ryc. 17 C). Największe zmiany w ekspresji EGFP obserwowano natomiast w komórkach mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe. Intensywność fluorescencji komórek mieloidalnych w guzach z grupy LV shIL-10 była istotnie wyższa w porównaniu do guzów z grupy kontrolnej. W doświadczeniu, w którym trzykrotne podania wektorów rozłożono w czasie, a analizę przeprowadzono dziesiątego dnia po rozpoczęciu iniekcji, oprócz transdukcji komórek mieloidalnych, obserwowano także wzrost intensywności fluorescencji EGFP w komórkach CD45<sup>neg</sup>. Było to szczególnie widoczne w grupie, która otrzymywała LV shIL-10 (ryc. 17 D). Natomiast, w żadnej z badanych grup nie odnotowano wzrostu ekspresji EGFP w limfocytach.

Aby dodatkowo potwierdzić obserwacje dotyczące zwiększonej wydajności transdukcji w komórkach mieloidalnych oceniono poziom ekspresji EGFP w wybranych subpopulacjach tych komórek: TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC. W grupach myszy, którym podawano wektory LV, zarówno według krótkiego, jak i dłuższego schematu, wszystkie badane subpopulacje wykazywały znacznie wyższą intensywność fluorescencji EGFP w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 17 E, F). Nie zaobserwowano istotnej różnicy pomiędzy wydajnością transdukcji po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 i LV shN.

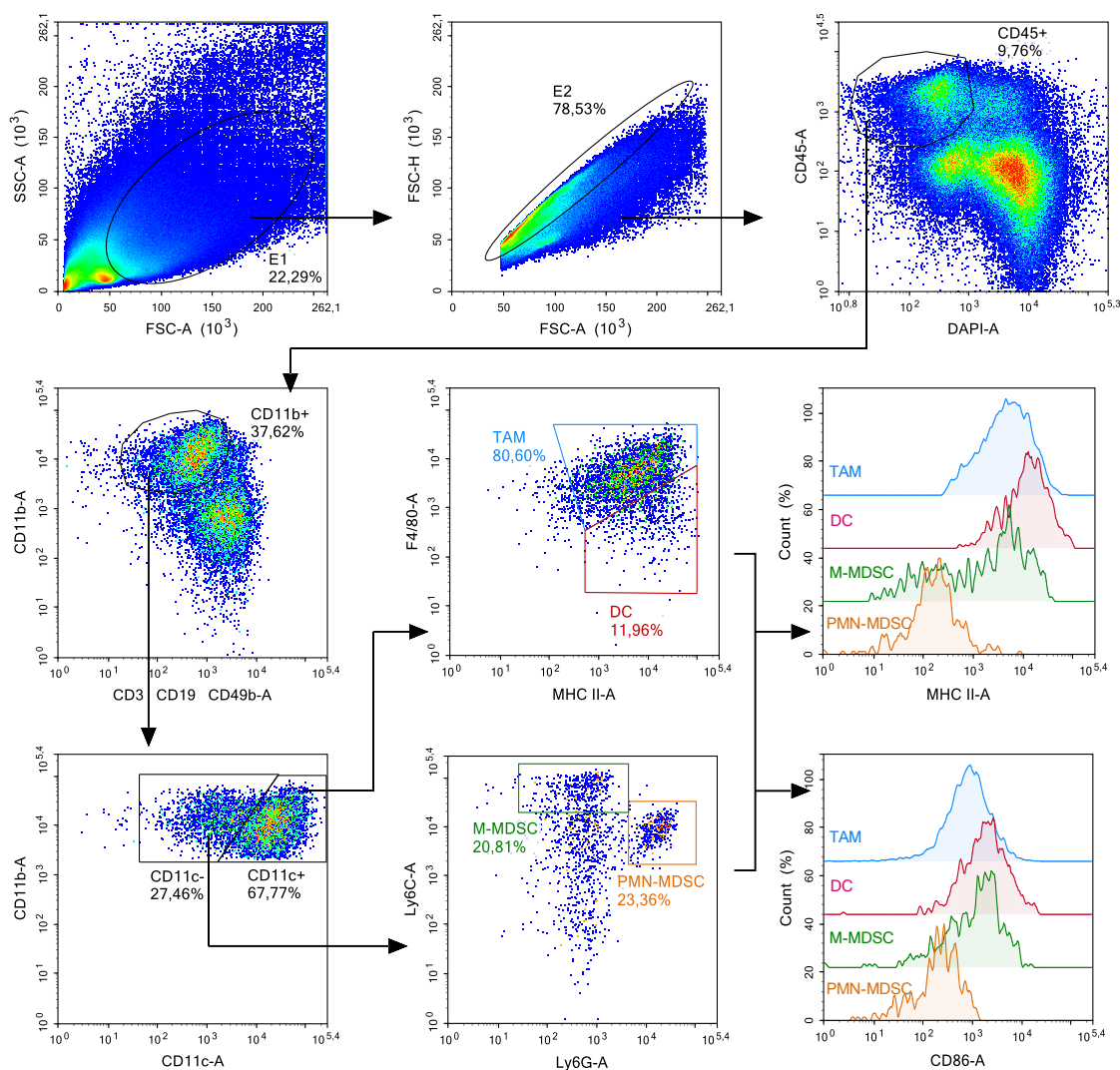
Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 oceniono na podstawie stężenia tej cytokiny w nadsączach znad hodowli pełnej zawiesiny komórek z guza. Szóstego dnia po rozpoczęciu podawania LV, komórki izolowane z guzów traktowanych LV shIL-10 wykazywały obniżoną zdolność do produkcji IL-10, zarówno w porównaniu do grupy, która otrzymywała wektory kontrolne, jak i do grupy nietraktowanej (ryc. 17 G). W dłuższym doświadczeniu wydajność wyciszenia była nieco słabsza, jednak stężenie IL-10 w nadsączach znad hodowli guzów traktowanych wektorami LV shIL-10 było nadal obniżone, szczególnie w porównaniu do grupy otrzymującej wektory LV shN (ryc. 17 H).

#### *4.4.1.2. Aktywność komórek układu odpornościowego w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych*

##### *Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38*

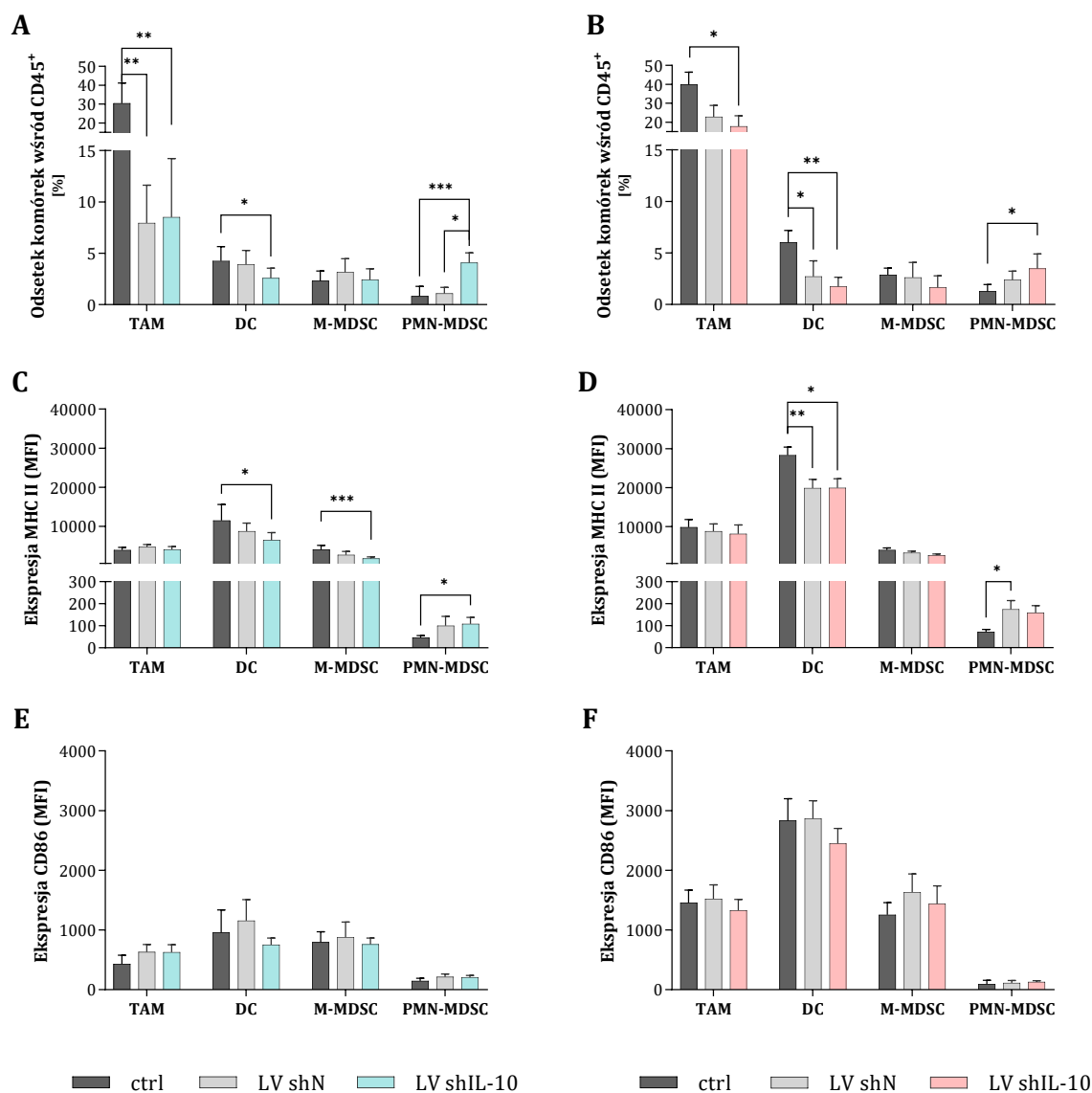
W celu określenia wpływu podania wektorów wyciszających ekspresję IL-10 na aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38, przeprowadzono wieloparametrową analizę metodą cytometrii przepływowej (ryc. 18), podczas której wśród żywych leukocytów naciekających guzy nowotworowe zidentyfikowano: makrofagi związane z nowotworem (TAM, CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), komórki dendrytyczne (DC, CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>) oraz monocytarne i granulocytarne MDSC (M-MDSC, CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>; PMN-MDSC, CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>int</sup>Ly6G<sup>+</sup>). Oceniono zmiany w udziale procentowym poszczególnych populacji wśród leukocytów, a także określono wpływ

zastosowanych wektorów lentiwirusowych na poziom zróżnicowania oznaczonych komórek mieloidalnych na podstawie ekspresji cząsteczek MHC II oraz CD86 (ryc. 19).



**Ryc. 18. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38.** Po wyeliminowaniu debris oraz zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>), a spośród nich komórki mieloidalne CD11b<sup>+</sup>, które następnie rozdzielono pod względem ekspresji markera CD11c. Wśród komórek CD11c<sup>+</sup> zidentyfikowano populacje TAM (CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) oraz DC (CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>int</sup>), a wśród komórek CD11c<sup>-</sup> wyznaczono populacje MDSC: M-MDSC (CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) oraz PMN-MDSC (CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>). Dodatkowo, określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni wyodrębnionych komórek.

Doguzowe podania wektorów LV indukowały zmiany w odsetkach komórek mieloidalnych wśród leukocytów naciekających guzy. Już szóstego dnia po rozpoczęciu podań wektorów LV, odnotowano kilkukrotne obniżenie odsetka TAM niezależnie od rodzaju zastosowanych wektorów (ryc. 19 A). W grupie traktowanej wektorami LV shIL-10 obserwowano obniżony odsetek DC, a niski poziom tych komórek utrzymywał się do dziesiątego dnia (ryc. 19 A, B). Wektory LV shIL-10 indukowały natomiast gwałtowny przyrost odsetka PMN-MDSC, który obserwowano już szóstego dnia po rozpoczęciu podań (ryc. 19 A).

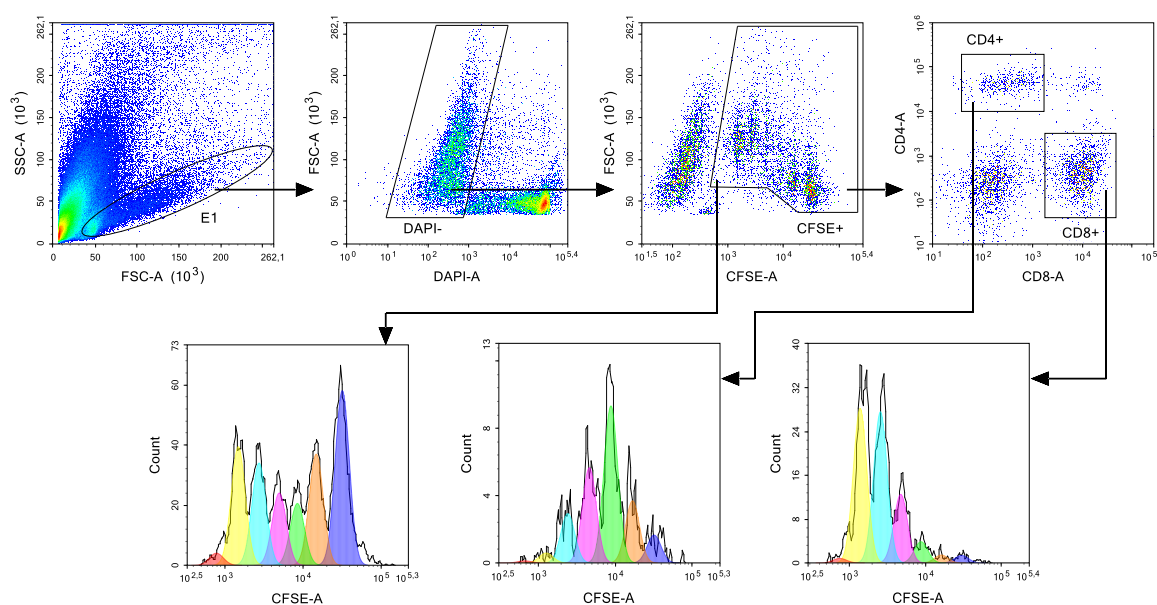


**Ryc. 19. Ocena nacieku komórek mieloidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 6-go (A, C, E) lub 10-go (B, D, F) dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** W trakcie wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe zidentyfikowano populacje TAM, DC, M-MDSC oraz PMN-MDSC. Określono odsetki tych komórek wśród leukocytów CD45<sup>+</sup> (A, B), a także poziom ekspresji cząsteczek MHC II (C, D) oraz CD86 (E, F) na ich powierzchni, przedstawiony jako średnia intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zarówno szóstego, jak i dziesiątego dnia po rozpoczęciu stosowania wektorów LV shIL-10 odnotowano obniżenie ekspresji MHC II na powierzchni DC i M-MDSC (ryc. 19 C, D). Należy jednak podkreślić, że podobne tendencje obserwowano w dłuższym doświadczeniu w grupie, która otrzymała LV shN, co sugeruje, że efekt był zależny raczej od podania wektorów lentiwirusowych, a nie od wyciszenia IL-10. Po zastosowaniu LV shIL-10 nie obserwowano natomiast istotnych zmian w ekspresji CD86 na powierzchni wybranych populacji komórek mieloidalnych. Odnotowano jedynie niewielkie obniżenie poziomu ekspresji CD86 na powierzchni DC

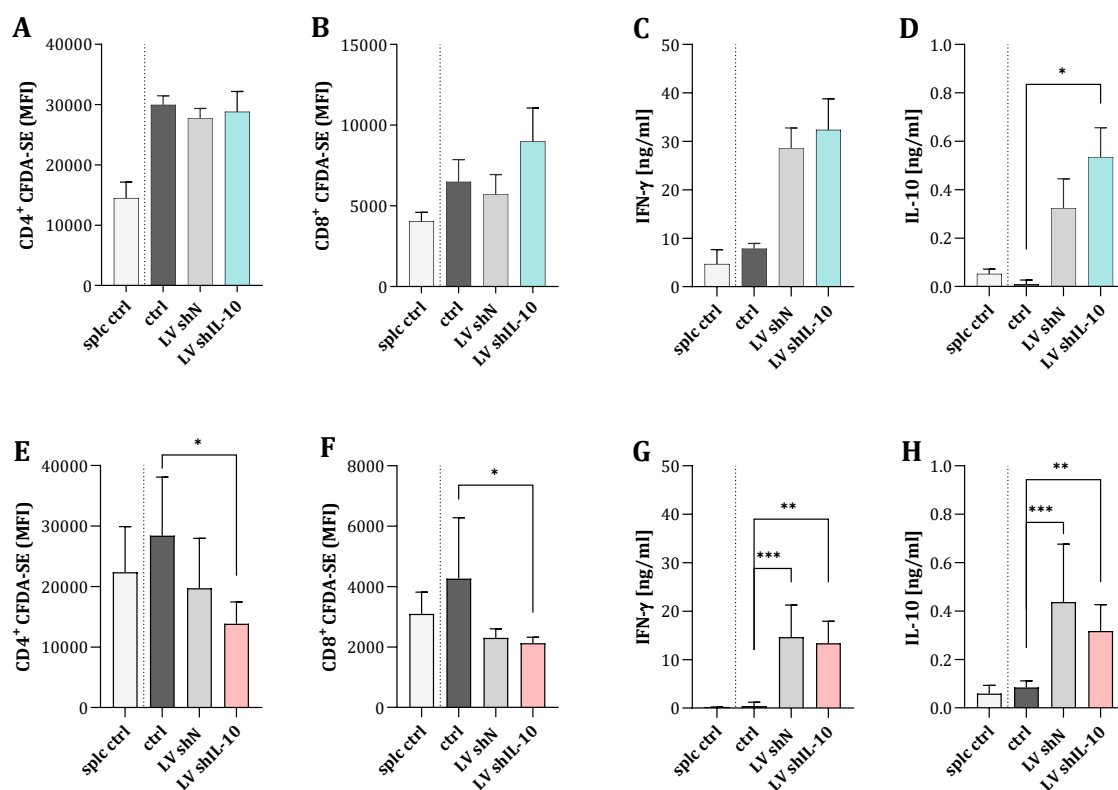
zidentyfikowanych w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10, które widoczne było w doświadczeniach prowadzonych według krótkiego, jak i przedłużonego schematu podań wektorów LV (ryc. 19 E, F).

W kolejnym etapie badań, dokonano oceny aktywności supresorowej komórek mieloidalnych infiltrujących guzy nowotworowe MC38. W tym celu, prowadzono hodowlę mieszaną izolowanych z guza MC38 komórek CD11b<sup>+</sup> oraz splenocytów izolowanych ze śledzion myszy zdrowych, a następnie określano intensywność proliferacji limfocytów T (ryc. 20) oraz stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10 w nadsączach z nad hodowli mieszanej.



**Ryc. 20. Schemat analizy proliferacji limfocytów T w hodowli mieszanej z komórkami CD11b<sup>+</sup> wyizolowanymi z guzów MC38.** Po wyliminowaniu debris i zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe komórki (DAPI<sup>-</sup>), a spośród nich splenocyty wyznakowane barwnikiem CFDA-SE. Wśród nich zidentyfikowano populacje limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> i określono intensywność fluorescencji barwnika CFDA-SE, którego zawartość w komórce maleje dwukrotnie wraz z każdym podziałem komórkowym.

Szóstego dnia od rozpoczęcia podawania wektorów LV, nie wykazano zmian w aktywności supresorowej wyizolowanych z guzów komórek mieloidalnych wobec limfocytów T CD4<sup>+</sup> (ryc. 21 A). Natomiast, odnotowano wzmożoną proliferację limfocytów T CD4<sup>+</sup> hodowanych w obecności komórek mieloidalnych izolowanych z guzów traktowanych wektorami LV shIL-10, które były podawane według dłuższego schematu (ryc. 21 E). Odnotowano również, że wektory LV shIL-10 powodowały podwyższoną aktywność supresorową komórek mieloidalnych wobec limfocytów T CD8<sup>+</sup>. Efekt ten był jednak krótkotrwały i nie utrzymał się do dziesiątego dnia od rozpoczęcia podań (ryc. 21 B, F). Komórki mieloidalne izolowane z guzów traktowanych wektorami LV, niezależnie od ich rodzaju, indukowały zwiększoną zdolność limfocytów T do produkcji IFN- $\gamma$  i IL-10, co obserwowano zarówno w krótkim, jak i dłuższym doświadczeniu (ryc. 21 C, D, G, H).



**Ryc. 21. Aktywność supresorowa komórek mieloidalnych izolowanych z guzów MC38 pobranych od myszy 6-go (A, B, C, D) lub 10-go (E, F, G, H) dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** Zdolność komórek mieloidalnych do hamowania proliferacji limfocytów T określono w trakcie mieszanej hodowli komórek CD11b<sup>+</sup> wyizolowanych z guzów MC38 i splenocytów wyznakowanych barwnikiem CFDA-SE. Po trzech dniach zmierzono średnią intensywność fluorescencji (MFI) CFDA-SE w limfocytach T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> (A, B, E, F). Stężenie IFN-γ i IL-10 w nadsączach znad hodowli oszacowano za pomocą testu ELISA (C, D, G, H). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

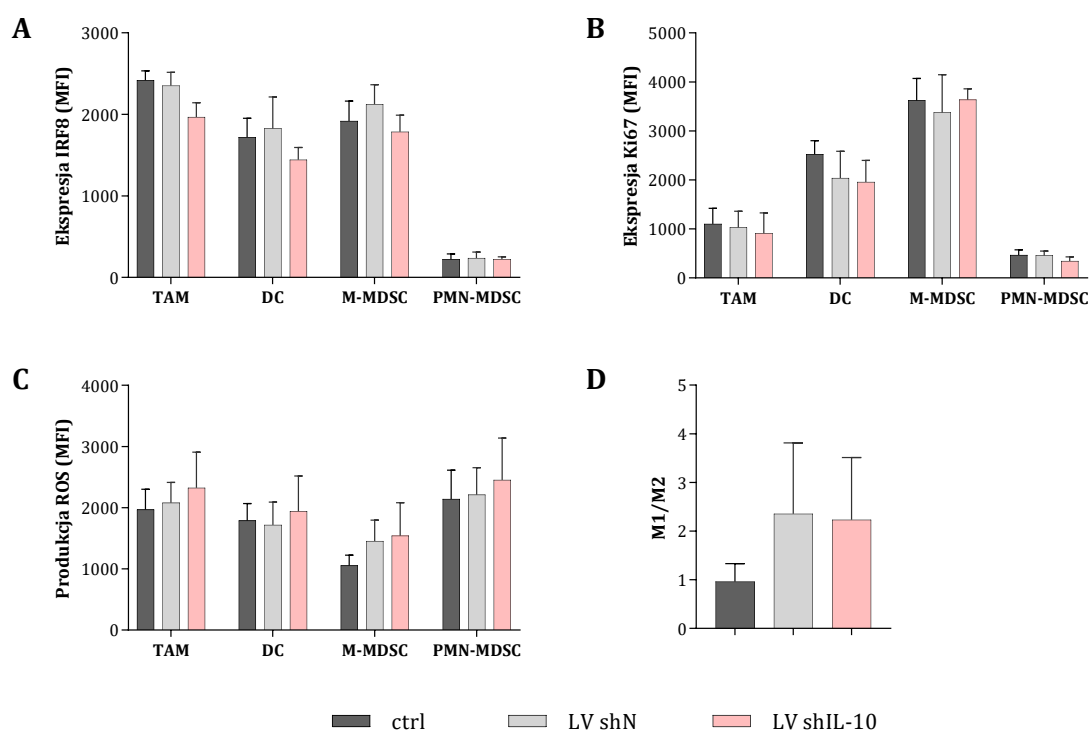
Analizę aktywności komórek mieloidalnych zidentyfikowanych w guzach MC38 dziesiątego dnia od rozpoczęcia podawania wektorów lentiwirusowych rozszerzono o dodatkowe oznaczenia przeprowadzone z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej.

We wszystkich populacjach komórek mieloidalnych oznaczono poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego IRF8, charakterystycznego dla komórek różnicujących się w kierunku makrofagów. Zgodnie z założeniem, najwyższym poziomem ekspresji IRF8 charakteryzowały się TAM (ryc. 22 A). Populacje DC oraz M-MDSC także wykazywały wysoki poziom ekspresji tego czynnika, natomiast PMN-MDSC, jako komórki granulocytarne, wykazywały bardzo niski poziom ekspresji IRF8. Pomimo że nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami, to populacje TAM, DC oraz M-MDSC zidentyfikowane w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10 charakteryzowały się nieco niższym poziomem ekspresji IRF8, w porównaniu do pozostałych grup.

Analiza poziomu ekspresji markera proliferacji komórkowej Ki67 wykazała natomiast, że M-MDSC naciekające guzy charakteryzowały się najwyższą intensywnością proliferacji



w porównaniu z innymi subpopulacjami komórek mieloidalnych. (ryc. 22 B). W przeciwieństwie do nich, PMN-MDSC wykazywały najniższy poziom Ki67. Nie odnotowano jednak znaczących zmian w ekspresji Ki67 pomiędzy grupami, które otrzymywały wektory LV a grupą kontrolną. Jedynie komórki DC zidentyfikowane w guzach traktowanych wektorami lentiwirusowymi wykazywały nieco obniżony poziom ekspresji Ki67 w stosunku do kontroli nieleczonej. Nie były to jednak zmiany zależne od wyciszenia IL-10.



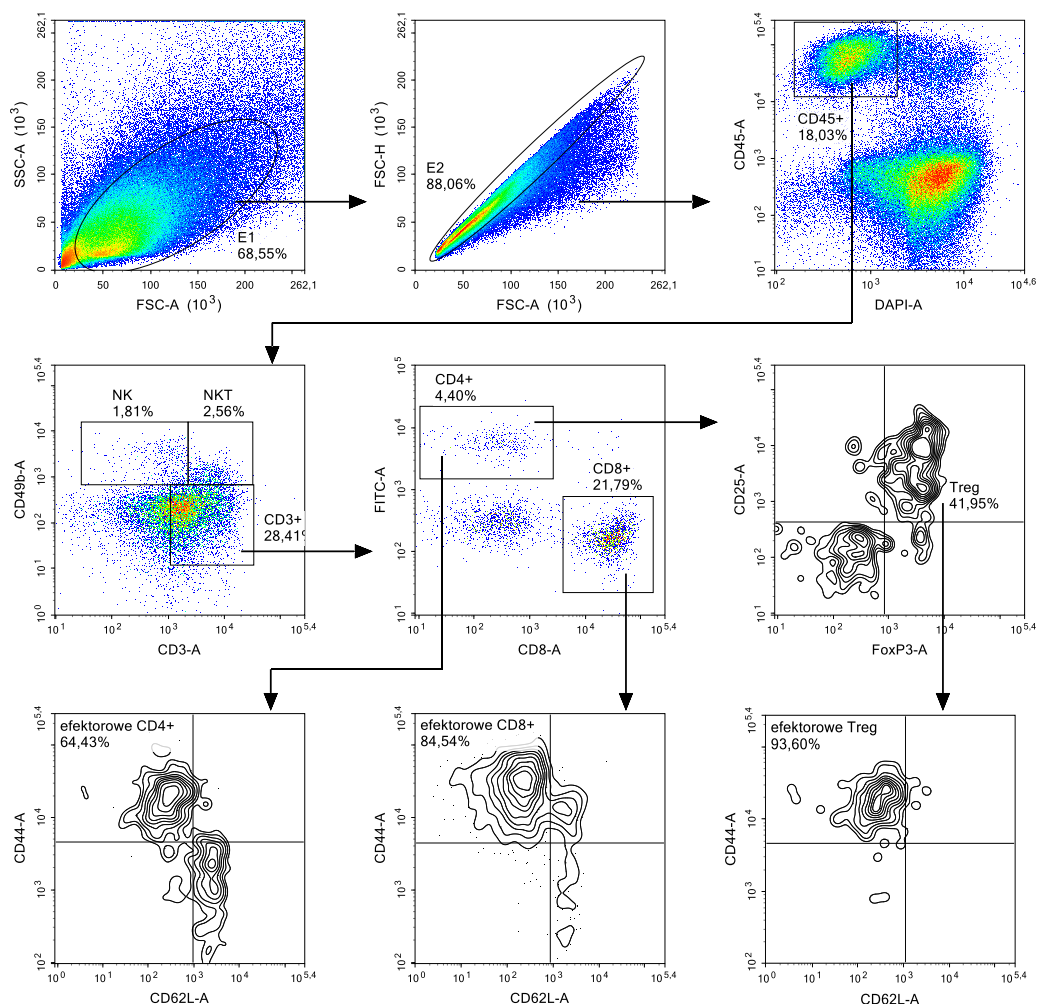
**Ryc. 22. Aktywność komórek mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe określona na podstawie poziomu ekspresji IRF8 (A), Ki67 (B), produkcji ROS (C) oraz polaryzacji makrofagów (D).** Poziom ekspresji IRF8 i Ki67 określono metodą cytometrii przepływowej stosując przeciwciała monoklonalne swoiste dla tych białek (A, B). Poziom produkcji ROS przez TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI) barwnika CellROX, którym wyznakowano komórki CD11b<sup>+</sup> izolowane z guzów nowotworowych (C). Na podstawie oceny poziomu ekspresji cząsteczek CD206 określono liczebność makrofagów typu M1 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>) i M2 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>). Polaryzację makrofagów przedstawiono jako stosunek odsetka komórek typu M1 do odsetka komórek typu M2 (D). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między grupami.

Podjęto również próbę określenia wpływu wyciszenia IL-10 w guzach nowotworowych na zdolność wybranych subpopulacji komórek mieloidalnych do produkcji reaktywnych form tlenu. W teście wykorzystano barwnik CellROX, który wnika do cytoplazmy komórek i po utlenieniu zmienia się w formę fluorescencyjną. Najwyższą intensywność fluorescencji, odpowiadającą poziomowi produkcji ROS, wykazywały PMN-MDSC (ryc. 22 C). Wszystkie oznaczone populacje komórek mieloidalnych wyizolowanych z guzów traktowanych wektorami LV shIL-10 wykazywały nieznacznie podwyższony poziom produkcji ROS, w porównaniu do grupy kontrolnej oraz traktowanej wektorami LV shN. Zmiany te nie były jednak istotne statystycznie.

Na podstawie poziomu ekspresji receptora mannozowego CD206 w komórkach F4/80<sup>+</sup> określono polaryzację makrofagów. Wektory lentiwirusowe podane doguzowo, niezależnie od ich rodzaju, indukowały polaryzację w kierunku makrofagów typu M1 (CD206<sup>-</sup>), jednak zmiany w porównaniu do grupy kontrolnej nie były istotne statystycznie (ryc. 22 D).

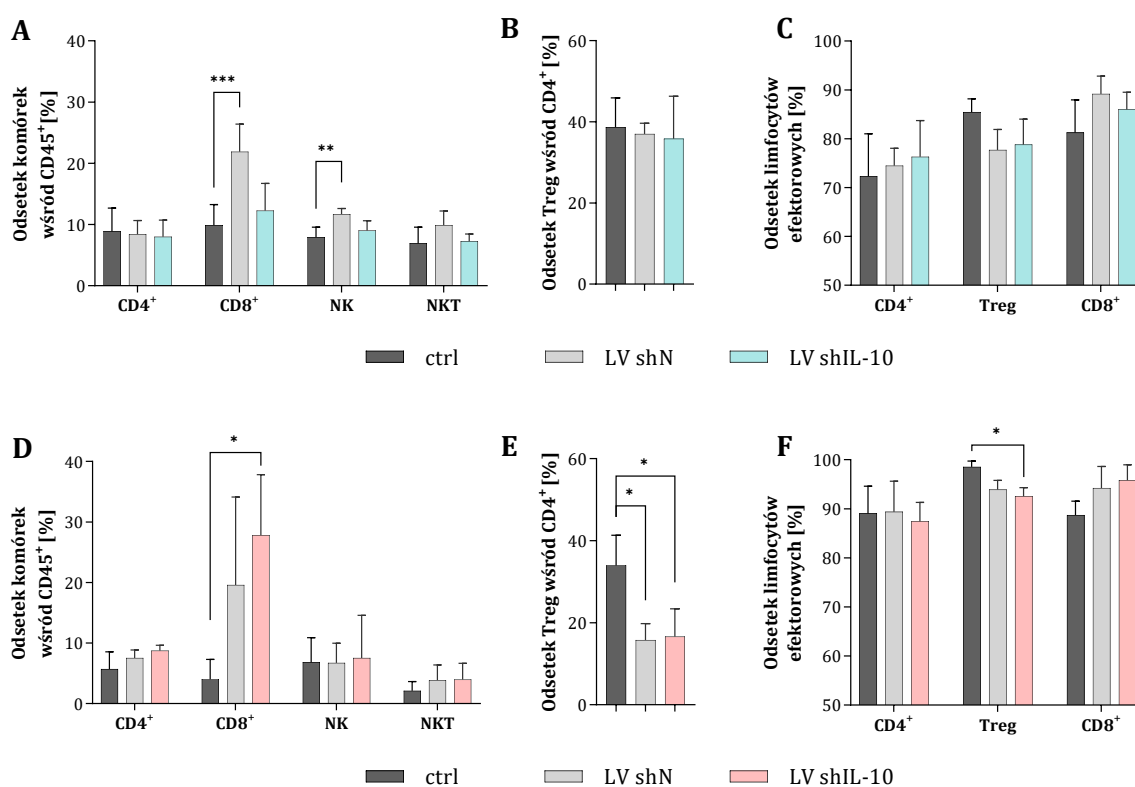
### Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38

Przeprowadzono wieloparametrową analizę metodą cytometrii przepływowej, w trakcie której wśród żywych leukocytów naciekających guzy MC38 zidentyfikowano populacje limfocytów T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) oraz limfocytów T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), komórek NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), NKT (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) (ryc. 23). Spośród limfocytów T CD4<sup>+</sup> wyodrębniono populację limfocytów T regulatorowych (Treg, CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Oznaczono również komórki efektorowe (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) wśród zidentyfikowanych populacji limfocytów T.



**Ryc. 23. Schemat analizy komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38.** Po wyeliminowaniu debris i zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>), a spośród nich limfocyty T (CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>), komórki NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) i komórki NKT (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>). Limfocyty T rozdzielono na populacje CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> zidentyfikowano limfocyty Treg (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L, wśród populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> i Treg wyodrębniono komórki efektorowe (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>).

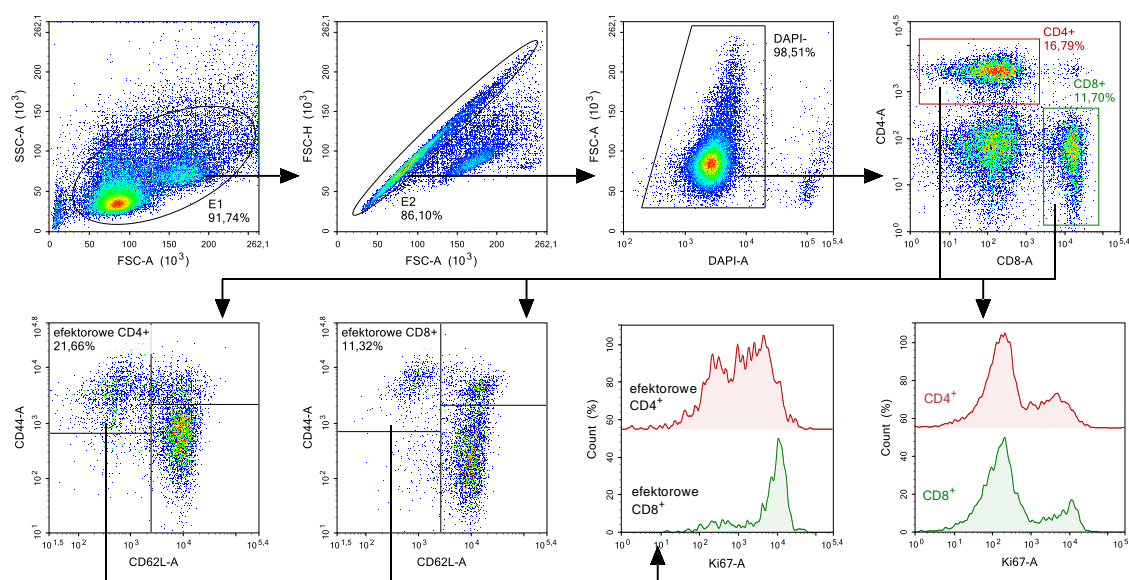
Analiza komórek limfoidalnych naciekających guzy wykazała, że podanie wektorów LV shN indukowało zwiększony odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup>, co obserwowano już szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów (ryc. 24 A). Po zastosowaniu wektorów wyciszających ekspresję IL-10 efekt ten był opóźniony – istotny wzrost odsetka limfocytów T CD8<sup>+</sup> wykazano tylko po zastosowaniu dłuższego schematu podań (ryc. 24 D). Szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów kontrolnych odnotowano również zwiększony odsetek komórek NK i NKT, efekt ten był jednak krótkotrwały i nie dotyczył grupy, która otrzymała wektory LV shIL-10. Choć nie stwierdzono znacznych zmian w odsetkach limfocytów T CD4<sup>+</sup>, to dziesiątego dnia od rozpoczęcia podawania wektorów LV odnotowano ponad dwukrotnie mniej limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> niż w grupie kontrolnej (ryc. 24 E). Analiza poziomu ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L wykazała również obniżenie odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów Treg spowodowane podaniem wektorów LV, co było widoczne zarówno w krótkim, jak i dłuższym doświadczeniu (ryc. 24 C, F). Więcej komórek efektorowych odnotowano natomiast wśród limfocytów T cytotoksycznych naciekających guzy traktowane wektorami LV (ryc. 24 C, F).



**Ryc. 24. Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 6-go (A, B, C) lub 10-go (D, E, F) dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** W trakcie wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających guzy nowotworowe zidentyfikowano populacje limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, komórki NK oraz NKT. Określono odsetki tych komórek wśród leukocytów CD45<sup>+</sup> (A, D), a także odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów CD4<sup>+</sup> (B, E). Na podstawie ekspresji cząsteczek CD62L i CD44 określono odsetki komórek efektorowych w poszczególnych populacjach (C, F). Na wykresach przedstawiono średnie wartości uzyskane podczas analizy pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### Aktywność limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych

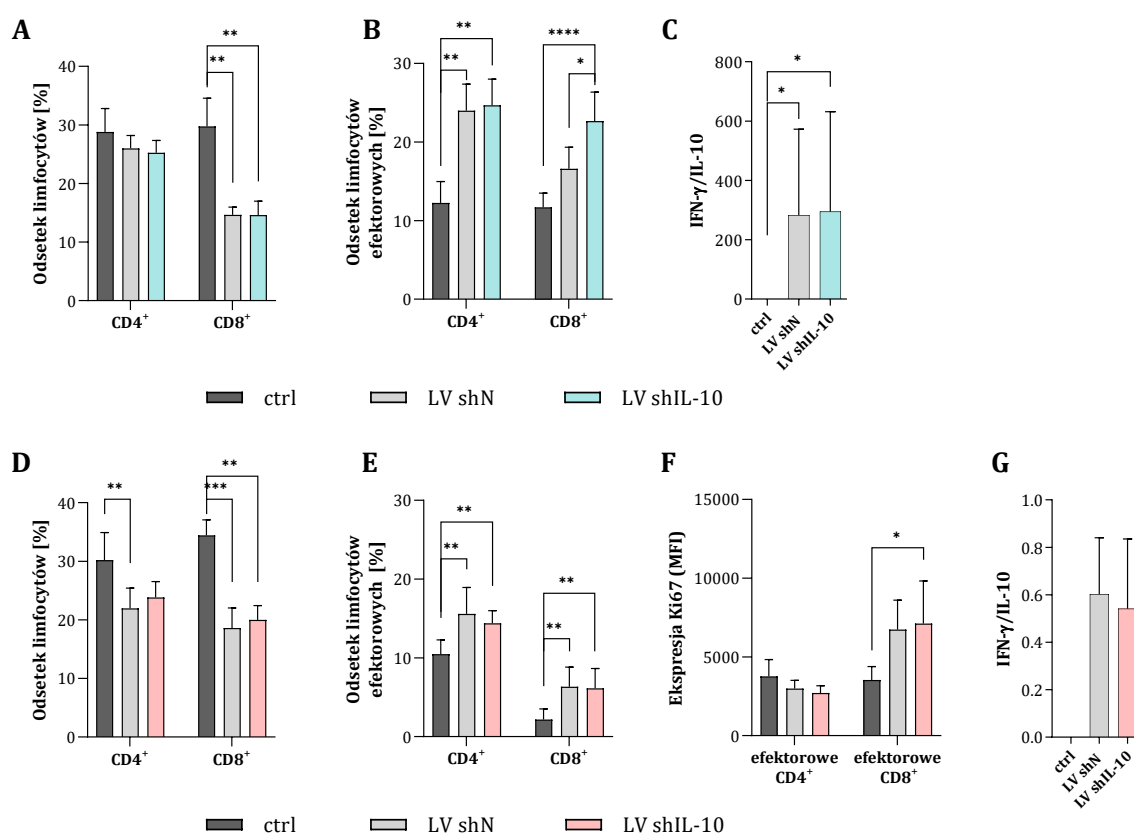
Podczas analizy przeprowadzonej metodą cytometrii przepływowej, określono odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> wśród żywych komórek znajdujących się w pachowych i pachwinowych węzłach chłonnych (sLN), zlokalizowanych po tej samej stronie co rosnący podskórnie guz (ryc. 25). Oszacowano odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>, a także określono poziom ekspresji Ki67 w oznaczonych populacjach. Analizę aktywności limfocytów uzupełniono o ocenę poziomu produkcji IFN- $\gamma$  oraz IL-10 przez komórki izolowane z sLN.



**Ryc. 25. Schemat analizy limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych.** Po wyeliminowaniu debris, zlepów komórkowych i martwych komórek, wyodrębniono limfocyty T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>. Na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L, wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> zidentyfikowano komórki efektorowe (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). W wyodrębnionych populacjach określono poziom ekspresji markera Ki67.

Efektom doguzowego podawania wektorów LV było obniżenie odsetków limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> w wartowniczych węzłach chłonnych (ryc. 26 A, D). Należy jednak zaznaczyć, że w grupach otrzymujących wektory LV, zarówno szóstego jak i dziesiątego dnia po rozpoczęciu ich podawania, całkowita liczba komórek znajdujących się w sLN była kilkukrotnie wyższa niż w węzłach pobranych od myszy z grupy kontrolnej (dane nieprezentowane). Jednocześnie w obu populacjach limfocytów T zidentyfikowanych w sLN myszy traktowanych wektorami LV odnotowano zwiększony odsetek komórek efektorowych (ryc. 26 B, E). Choć efekt był obserwowany po zastosowaniu obu rodzajów wektorów, wektory wyciszające ekspresję IL-10 indukowały istotnie większy wzrost odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów T cytotoksycznych, co było obserwowane szóstego dnia po rozpoczęciu podań (ryc. 26 B). Oznaczony w doświadczeniu przeprowadzonym według dłuższego schematu podań poziom

ekspresji Ki67 ujawnił, że efektorowe limfocyty T CD8<sup>+</sup> zidentyfikowane w sLN dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań wektorów LV nadal intensywnie proliferowały (ryc. 26 F). Wyznaczony współczynnik IFN- $\gamma$ /IL-10 wskazuje, że komórki izolowane z sLN grup traktowanych LV shN i LV shIL-10 szóstego dnia po rozpoczęciu podań charakteryzowały się znacznie większym potencjałem do produkcji IFN- $\gamma$  niż komórki sLN z grupy kontrolnej. Nie odnotowano jednak różnic w proporcji cytokin pomiędzy grupą, która otrzymywała wektory LV shIL-10, a grupą kontrolną traktowaną wektorami LV shN (ryc. 26 C). Natomiast, współczynnik IFN- $\gamma$ /IL-10 był znacznie niższy w doświadczeniu prowadzonym według przedłużonego schematu podań (ryc. 26 G). Można przypuszczać, że związane jest to z wyhamowaniem reakcji odpornościowej na podawane doguzowo wektory LV.

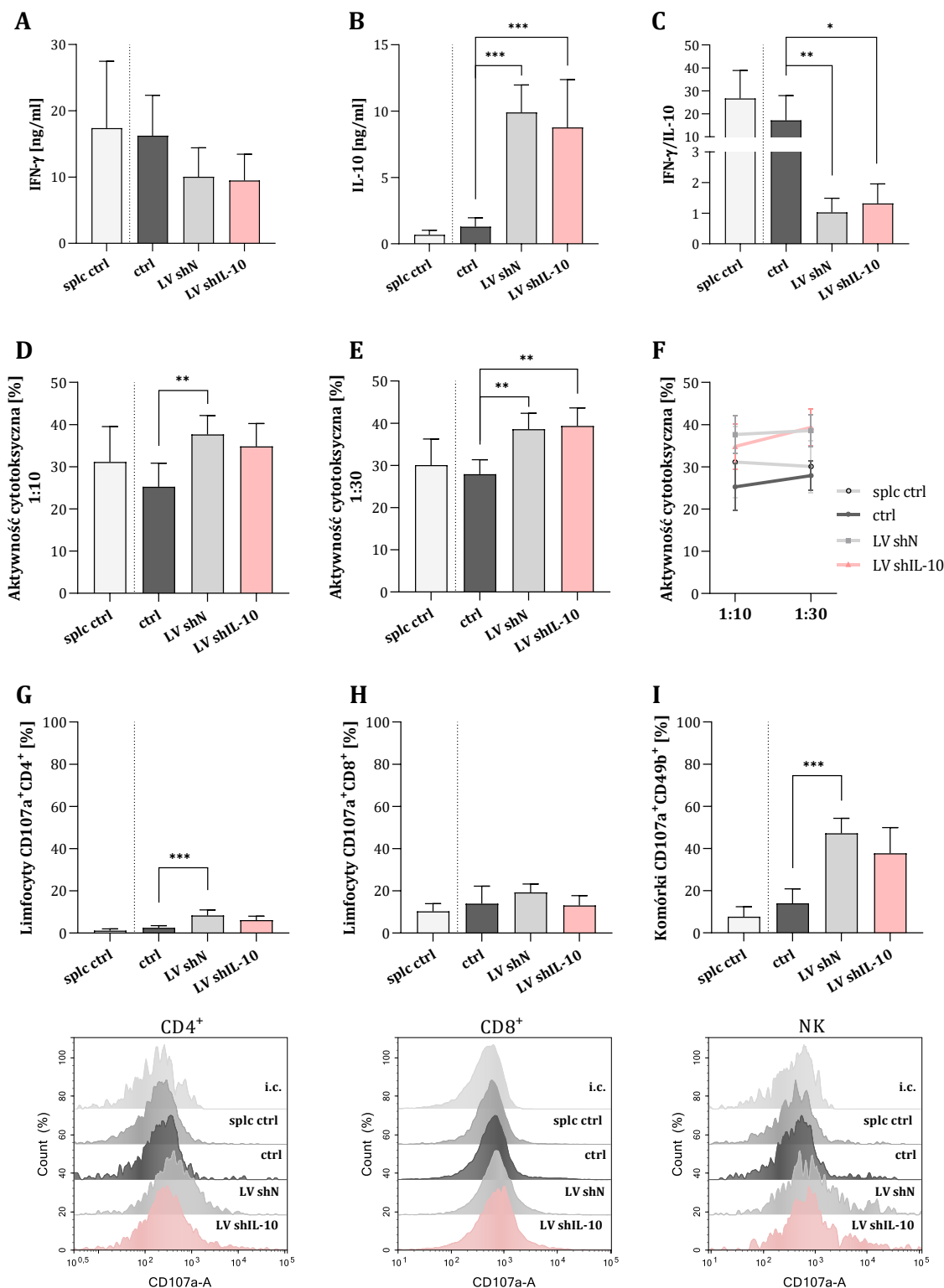


**Ryc. 26. Ocena aktywności limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych przeprowadzona 6-go (A, B, C) lub 10-go (D, E, F, G) dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** W trakcie wieloparametrowej analizy cytometrycznej, określono odsetki limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> w wartowniczych węzłach chłonnych (A, D), a wśród nich odsetki komórek efektorowych (B, E). Oszacowano także poziom ekspresji cząsteczek Ki67, przedstawiony jako średnia intensywność fluorescencji (MFI) (F). Zdolność limfocytów wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych do produkcji IFN- $\gamma$  i IL-10 przedstawiono jako stosunek stężeń tych cytokin oszacowanych w nadsączach z 24-godzinnej hodowli tych komórek (C, G). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy węzłów chłonnych pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

#### 4.4.1.2. Aktywność komórek układu odpornościowego w śledzionie

Celem badań przeprowadzonych w kolejnym etapie było określenie wpływu podania wektorów lentiwirusowych na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Ze względu na czas rozwoju swoistej odpowiedzi ogólnoustrojowej, analizę przeprowadzono tylko dla doświadczenia, w którym zastosowano przedłużony schemat podań wektorów LV. Komórki śledzionowe, uzyskane od myszy, którym podano doguzowo LV shIL-10, poddano wtórnej stymulacji w trakcie pięciodniowej hodowli mieszanej z komórkami MC38. Analizę przeprowadzono w odniesieniu do splenocytów pobranych od myszy zdrowych. Określono poziom produkcji cytokin przez restymulowane splenocyty, a także oznaczono ich aktywność cytotoksyczną wobec docelowych komórek MC38.

Splenocyty pobrane od myszy traktowanych wektorami lentiwirusowymi wykazywały obniżoną zdolność do produkcji IFN- $\gamma$ , zarówno w porównaniu do komórek śledzionowych uzyskanych od myszy nietraktowanych, jak i myszy zdrowych (ryc. 27 A). Natomiast, w nadsączach znad splenocytów pochodzących z grup traktowanych wektorami LV shN oraz LV shIL-10 odnotowano znacznie wyższe stężenia IL-10 (ryc. 27 B). Współczynnik IFN- $\gamma$ /IL-10 wskazuje, że splenocyty z tych grup produkowały IFN- $\gamma$  i IL-10 w podobnej ilości, w przeciwieństwie do komórek izolowanych od myszy z grupy kontrolnej lub od myszy zdrowych, które wydzielały odpowiednio 17- i 26-krotnie więcej IFN- $\gamma$  niż IL-10 (ryc. 27 C). Pomimo to stwierdzono, że restymulowane komórki śledzionowe z grup traktowanych wektorami lentiwirusowymi charakteryzowały się istotnie wyższą aktywnością cytotoksyczną wobec docelowych komórek MC38 w porównaniu do komórek z grupy kontrolnej (ryc. 27 D, E, F). Co więcej, analiza ekspresji CD107a na powierzchni limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> i komórek NK, świadcząca o uwalnianiu ziaren cytolitycznych, wykazała, że ten mechanizm cytotoksyczności wykorzystywały przede wszystkim komórki NK pochodzące ze śledziony myszy traktowanych wektorami lentiwirusowymi (ryc. 27 G, H, I). Był to jednak efekt związany z podaniem wektorów lentiwirusowych, a nie bezpośrednio z wyciszeniem IL-10.



**Ryc. 27.** Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych po podaniach wektorów wyciszających ekspresję IL-10. Stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10 określono w nadśączach znad 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38 (A, B, C). Aktywność cytotoksyczną efektorowych komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 i 1:30 (D, E, F). Odsetek komórek cytotoksycznych (CD107a<sup>+</sup>) określono wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> i komórek NK (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>) po 2-godzinnej inkubacji restymulowanych splenocytów z komórkami MC38 (G, H, I). Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy komórek pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.4.2. Kinetyka indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku podania cyklofosfamidu i wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10.

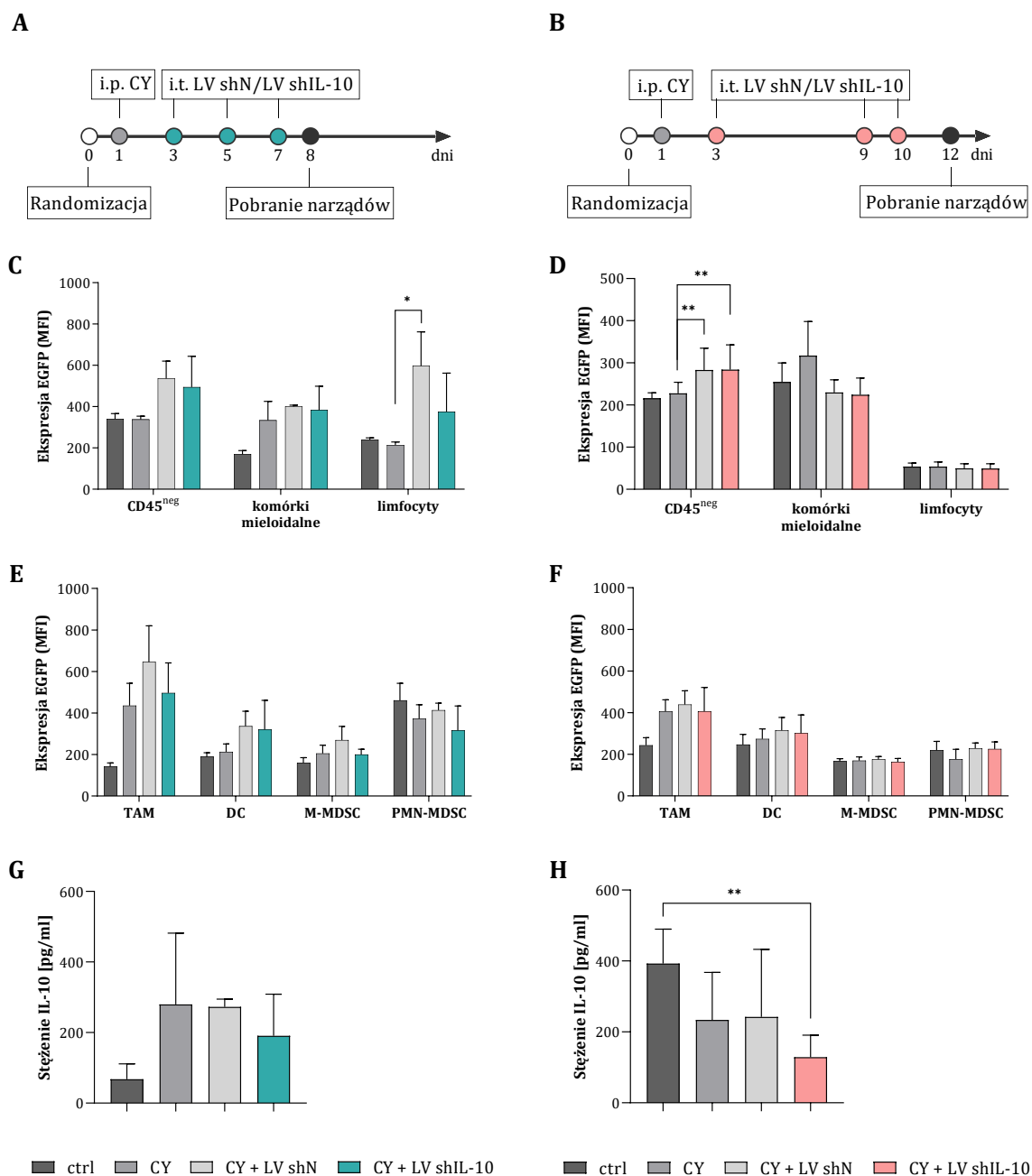
##### 4.4.2.1. Wydajność wyciszenia IL-10 w guzach MC38

W tej części badań, przeprowadzono doświadczenia, których celem było określenie wpływu immunomodulującej dawki cyklofosfamidu (CY) na rozwój odpowiedzi przeciwnowotworowej indukowanej przez wektory lentiwirusowe wyciszające ekspresję IL-10. CY zastosowano dootrzewnowo, a dwa dni później rozpoczęto podawanie doguzowo wektorów LV shIL-10 lub wektorów kontrolnych LV shN (ryc. 28 A, B). Iniekcję wektorów powtórzono trzykrotnie, analogicznie do schematów doświadczeń opisanych w podrozdziale 4.4.1.

Ocena wydajności wyciszenia IL-10, przeprowadzona szóstego dnia od rozpoczęcia podawania wektorów lentiwirusowych, wykazała, że transdukcja zachodziła najwydajniej w komórkach CD45<sup>neg</sup> oraz limfocytach zidentyfikowanych w guzach (ryc. 28 C). Z kolei, dziesiątego dnia po pierwszym podaniu wektorów lentiwirusowych, wzrost ekspresji EGFP odnotowano jedynie w komórkach CD45<sup>neg</sup> (ryc. 28 D). W odróżnieniu od doświadczeń opisanych w podrozdziale 4.4.1, nie odnotowano istotnych zmian w ekspresji EGFP w komórkach mieloidalnych. Szczegółowa analiza subpopulacji tych komórek pod kątem zmian w intensywności fluorescencji potwierdziła te obserwacje. Nieznacznie wyższą intensywność fluorescencji EGFP po podaniu wektorów lentiwirusowych odnotowano jedynie w komórkach dendrytycznych (ryc. 28 E, F). Podwyższony poziom fluorescencji obserwowano także w populacji TAM w grupach, które otrzymywały wektory LV shN lub LV shIL-10. Należy jednak podkreślić, że populacja ta wykazywała zwiększony poziom fluorescencji również w grupie traktowanej samym cyklofosfamidem. Można przypuszczać, że CY wpływał na poziom zróżnicowania komórek mieloidalnych, co powodowało wzrost autofluorescencji tych komórek.

W nadsączach znad hodowli zawiesiny komórkowej uzyskanej z guzów nowotworowych pobranych szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów LV shIL-10 odnotowano nieznacznie obniżone stężenie IL-10, w porównaniu do grup, które otrzymały CY, stosowany samodzielnie lub w połączeniu z wektorami LV shN (ryc. 28 G). Stężenie IL-10 nie było jednak niższe niż w grupie kontrolnej nieleczonej. Natomiast, gdy analizę przeprowadzono dziesiątego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów, odnotowano istotne statystycznie obniżenie stężenia IL-10 w nadsączach znad komórek pochodzących z guzów traktowanych CY i wektorami LV shIL-10 w odniesieniu do grupy kontrolnej. Stężenie IL-10 w tej grupie było również niższe niż w grupach, które otrzymały CY lub CY + LV shN (ryc. 28 H).





**Ryc. 28. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych.** Randomizację myszy przeprowadzono, gdy rosnące podskórnie guzy MC38 osiągnęły objętość minimum. 50 mm<sup>3</sup>. Wektory lentiwirusowe wyciszające ekspresję IL-10 (LV shIL-10) lub kontrolne (LV shN) podawano doustowo trzykrotnie. Dwa dni przed pierwszym podaniem wektorów, myszom podano dootrzewnowo cyklofosfamid. Guzy, wartownicze węzły chłonne oraz śledziona pobrano od myszy 8-go (A) lub 12-go (B) dnia od rozpoczęcia doświadczenia. Określono poziom ekspresji EGFP, przedstawiony jako średnia intensywność fluorescencji (MFI), w komórkach nowotworowych (CD45<sup>neg</sup>), komórkach mieloidalnych (CD11b<sup>+</sup>) oraz limfocytach (CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD49b<sup>+</sup>) naciekających guzy nowotworowe (C, D), a także wybranych subpopulacjach komórek mieloidalnych: TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC (E, F). Stężenie IL-10 w nadsączach z 24-godzinnej hodowli komórek wyizolowanych z guzów MC38 oszacowano za pomocą testu ELISA (G, H). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3 (C, E, G) lub 10 (D, F, H) myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.4.2.2. Aktywność komórek układu odpornościowego w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych

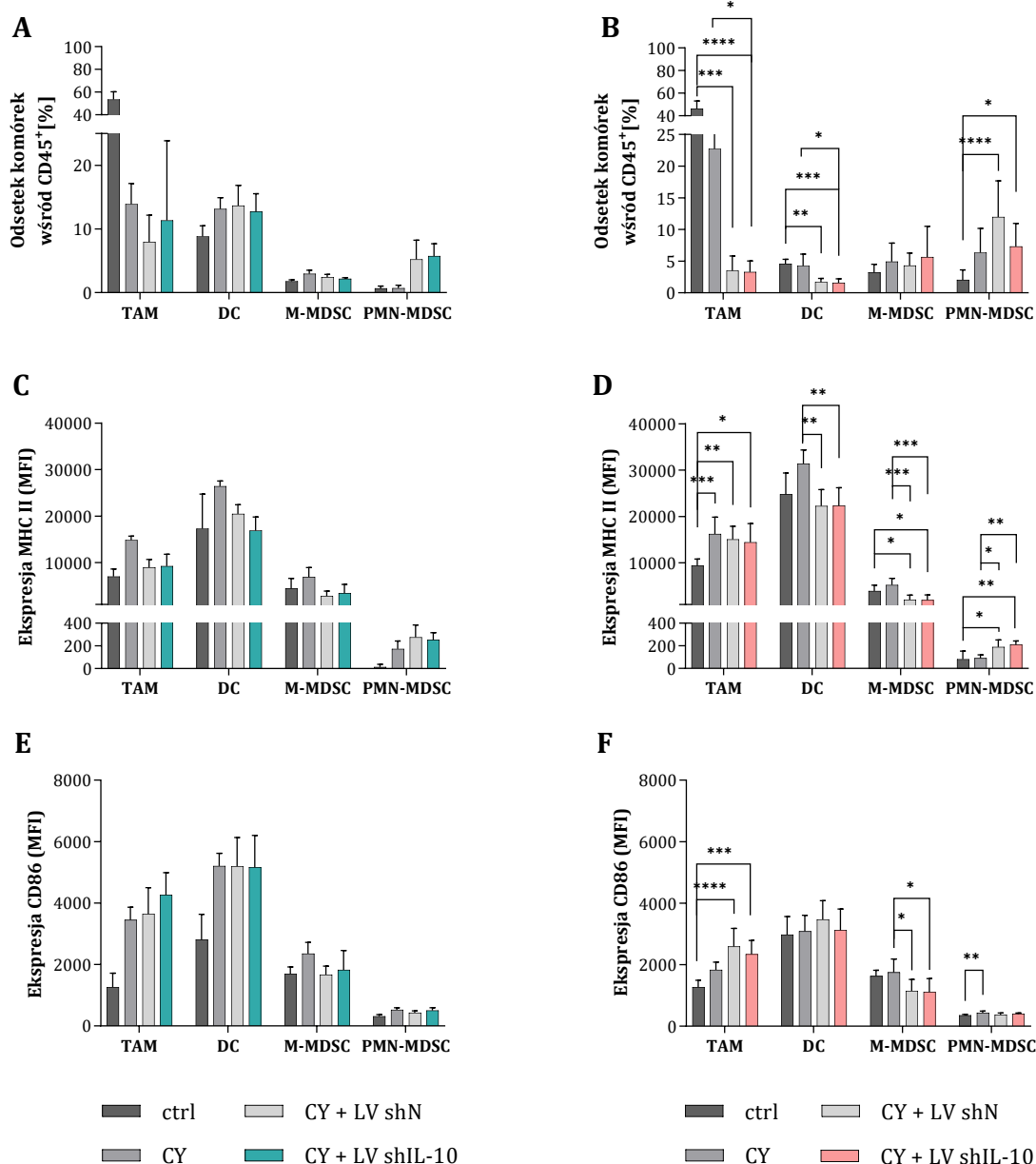
##### *Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38*

W celu określenia zmian w odsetku oraz aktywności komórek mieloidalnych w guzach pobranych od myszy, które otrzymały cyklofosfamid i wektory wyciszające ekspresję IL-10, przeprowadzono analizy według schematów i procedur opisanych w podrozdziale 4.4.1.2.

W pierwszym etapie dokonano wieloparametrowej analizy cytometrycznej przeprowadzonej według schematu przedstawionego na rycinie 18 w podrozdziale 4.4.1.2. W doświadczeniu przeprowadzonym według krótkiego schematu podań wektorów, w grupach, które otrzymały CY lub CY + LV odnotowano znaczne obniżenie odsetka TAM w odniesieniu do grupy kontrolnej (ryc. 29 A). W dłuższym doświadczeniu, u myszy, które otrzymały CY również obserwowano dwukrotne obniżenie odsetka TAM, natomiast uzupełnienie schematu o LV spowodowało dalszą redukcję odsetka tych komórek (ryc. 29 B). W przypadku DC i M-MDSC, szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów LV shN i LV shIL-10 obserwowano wzrost odsetków tych populacji, podobną zmianę odnotowano dla grupy traktowanej samym CY. Efekt ten utrzymywał się do dziesiątego dnia tylko w przypadku M-MDSC, natomiast, odsetek DC uległ istotnemu obniżeniu w grupach CY + LV shN lub CY + LV shIL-10. Stwierdzono ponadto, że wektory LV shN i LV shIL-10 indukowały wzrost odsetka PMN-MDSC, który był widoczny już szóstego dnia po rozpoczęciu ich podawania. Podczas dłuższej obserwacji, wyższy niż w grupie kontrolnej odsetek tych komórek odnotowano również w grupie traktowanej samym cyklofosfamidem.

Analiza poziomu ekspresji MHC II na powierzchni zidentyfikowanych populacji komórek mieloidalnych, przeprowadzona dla obu doświadczeń, nie wykazała zmian zależnych od wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych. Natomiast, odnotowano nieznaczne zwiększenie poziomu ekspresji tych cząsteczek na powierzchni TAM, DC i M-MDSC oznaczonych w grupie traktowanej samym CY (ryc. 29 C, D). Wzrost ekspresji MHC II wywołany podaniem CY był niwelowany przez zastosowanie wektorów lentiwirusowych, które spowodowały obniżenie poziomu ekspresji tych cząsteczek na powierzchni TAM, DC i M-MDSC.

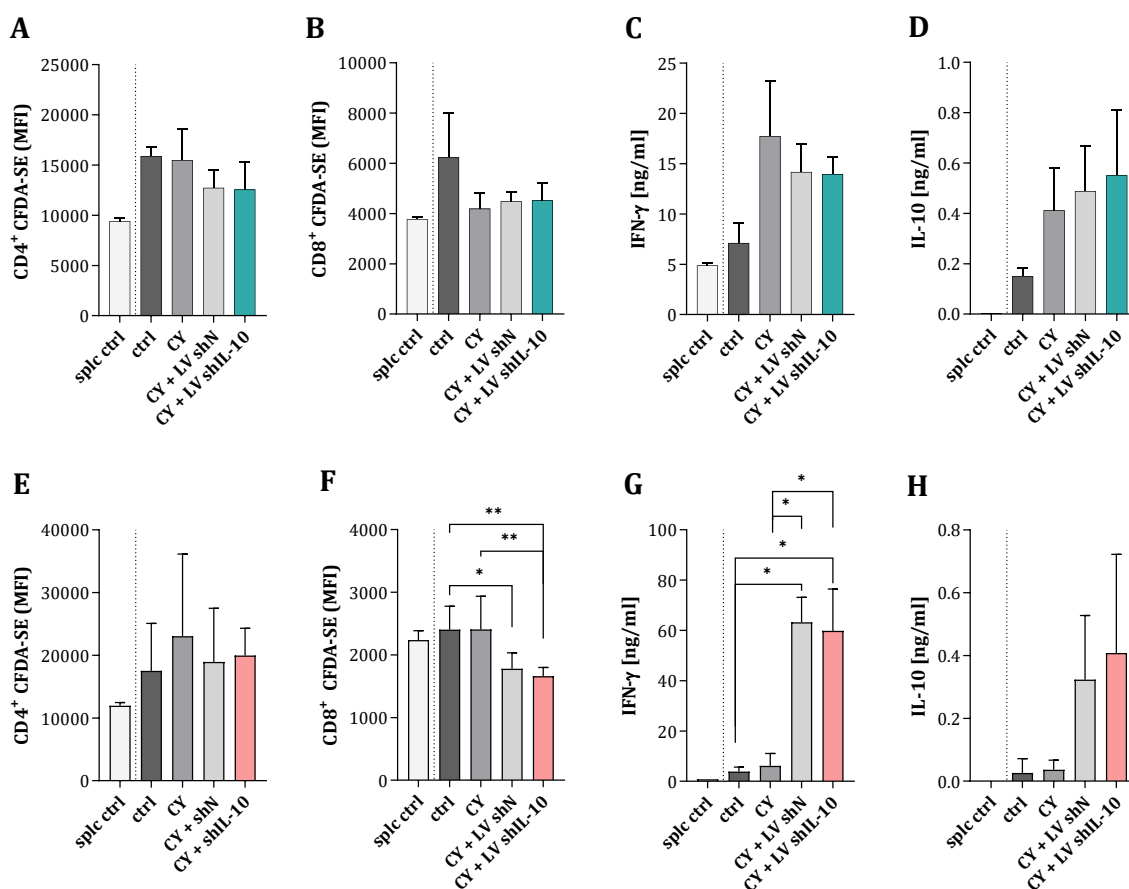
Analiza ekspresji CD86 na powierzchni poszczególnych subpopulacji komórek mieloidalnych wykazała indukowany podaniem CY wzrost ekspresji tych cząsteczek na powierzchni TAM i DC. Efekt ten był jednak krótkotrwały i można było go obserwować ósmego dnia po zastosowaniu cytostatyku (ryc. 29 E). Przedłużona obserwacja wykazała wzrost ekspresji CD86 jedynie na powierzchni komórek TAM. Dodatkowo w tym przypadku podwyższony poziom CD86 odnotowano tylko w grupach, które otrzymały CY i wektory LV (ryc. 29 F). M-MDSC zidentyfikowane w tych grupach wykazywały natomiast obniżony poziom ekspresji tych cząsteczek.



**Ryc. 29. Ocena nacieku komórek mieloidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 8-go (A, C, E) lub 12-go (B, D, F) dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** W trakcie wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe zidentyfikowano populacje TAM, DC, M-MDSC oraz PMN-MDSC. Określono odsetki tych komórek wśród leukocytów CD45<sup>+</sup> (A, B), a także poziom ekspresji cząsteczek MHC II (C, D) oraz CD86 (E, F) na ich powierzchni, przedstawiony jako średnia intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3 (A, C, E) lub 10 (B, D, F) myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

W kolejnym etapie badań, oceniono aktywność supresorową komórek mieloidalnych wobec śledzionowych limfocytów T według procedury opisanej w podrozdziale 4.4.1.2 (ryc. 20). Zdolność komórek mieloidalnych izolowanych z guzów MC38 do hamowania proliferacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> uległa obniżeniu po zastosowaniu CY w kombinacji z wektorami LV, co było obserwowane zarówno szóstego, jak i dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań wektorów

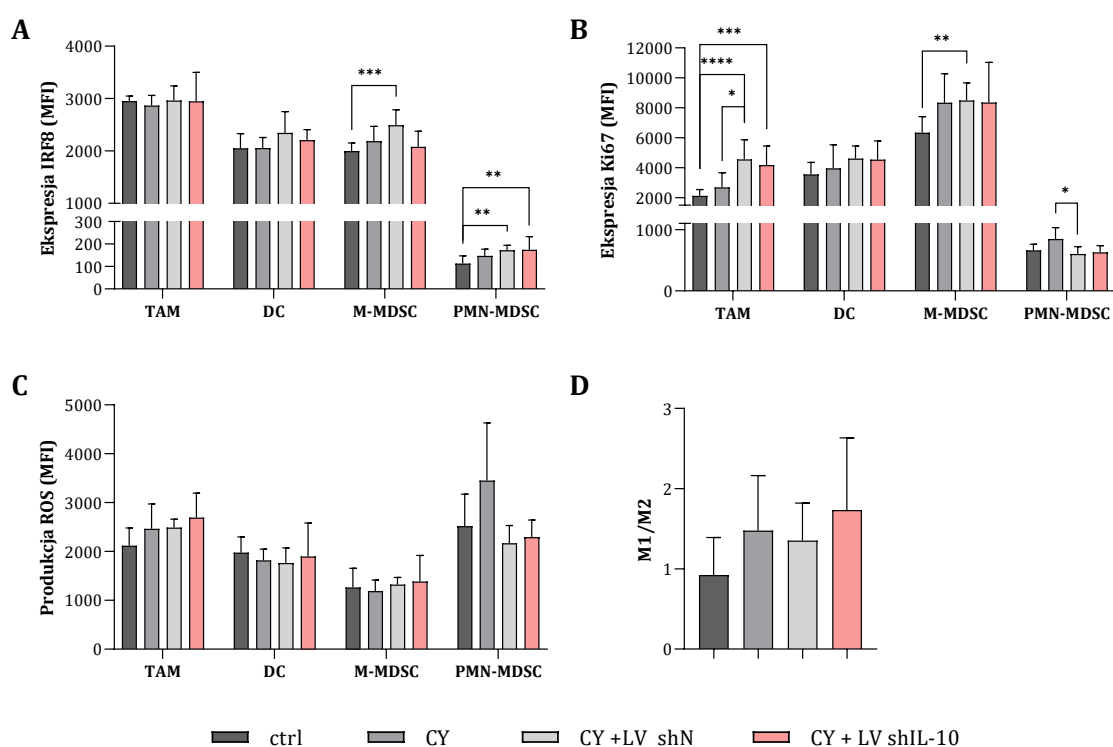
(ryc. 30 A, B, E, F). Odnotowano również wpływ zastosowania samego CY na obniżenie aktywności supresorowej komórek mieloidalnych wobec limfocytów T CD8<sup>+</sup>. Efekt ten był jednak krótkotrwały i nie odnotowano go w przedłużonej obserwacji (ryc. 30 B, F). Komórki mieloidalne izolowane od myszy, które otrzymały CY lub CY i wektory LV indukowały zwiększone wydzielanie IFN- $\gamma$  i IL-10 przez splenocyty (ryc. 30 C, D). W doświadczeniu przeprowadzonym według krótkiego schematu podań wektorów, najwyższe stężenie IFN- $\gamma$  odnotowano w grupie traktowanej samym CY (ryc. 30 C). Dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań wektorów, odnotowano natomiast znaczny wpływ wektorów LV shN i LV shIL-10 na zdolność komórek mieloidalnych do pobudzenia splenocytów do wydzielania IFN- $\gamma$  i IL-10. Należy ponadto podkreślić, że splenocyty z tych grup produkowały ponad stukrotnie więcej IFN- $\gamma$  niż IL-10 (ryc. 30 G, H).



**Ryc. 30. Aktywność supresorowa komórek mieloidalnych izolowanych z guzów MC38 pobranych od myszy 8-go (A-D) lub 12-go (E-H) dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamid i wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** Zdolność komórek mieloidalnych do hamowania proliferacji limfocytów T określono w trakcie mieszanej hodowli komórek CD11b<sup>+</sup> wyizolowanych z guzów MC38 i splenocytów wyznakowanych barwnikiem CFSE. Po trzech dniach zmierzono średnią intensywność fluorescencji (MFI) CFSE w limfocytach T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> (A, B, E, F). Stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10 w nadsączach z nad hodowli oszacowano za pomocą testu ELISA (C, D, G, H). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3 (A-D) lub 10 (E-H) myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

W celu określenia aktywności poszczególnych subpopulacji komórek mieloidalnych przeprowadzono dodatkowe analizy, w ramach których określono poziom ekspresji IRF8, Ki67 oraz poziom produkcji ROS przez TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC, a także polaryzację makrofagów zidentyfikowanych w guzach.

Zaobserwowano, że podanie cyklofosfamidu i wektorów LV shN indukowało wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego IRF8 w M-MDSC (ryc. 31 A). Takiego efektu nie odnotowano natomiast w grupie CY + LV shIL-10. W tym przypadku poziom ekspresji IRF8 w M-MDSC był porównywalny do tego oznaczonego w grupie kontrolnej oraz traktowanej samym cyklofosfamidem. W guzach myszy, które otrzymały CY i wektory LV stwierdzono również wzrost poziomu ekspresji IRF8 w PMN-MDSC. Jednak efekt nie był zależny od wyciszenia IL-10, a raczej od podania wektorów lentiwirusowych.



**Ryc. 31. Aktywność komórek mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe określona na podstawie poziomu ekspresji IRF8 (A), Ki67 (B), produkcji ROS (C) oraz polaryzacji makrofagów (D).** Poziom ekspresji IRF8 i Ki67 określono metodą cytometrii przepływowej stosując przeciwciała monoklonalne swoiste dla tych czynników transkrypcyjnych (A, B). Poziom produkcji ROS przez TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI) barwnika CellROX, którym wyznakowano komórki CD11b<sup>+</sup> izolowane z guzów nowotworowych (C). Na podstawie oceny poziomu ekspresji cząsteczek CD206 określono liczebność makrofagów typu M1 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>) i M2 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>). Polaryzację makrofagów przedstawiono jako stosunek odsetka komórek typu M1 do odsetka komórek typu M2 (D). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 7-10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu post hoc Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Po zastosowaniu cyklofosfamid i wektorów lentiwirusowych, TAM identyfikowane w guzach wykazywały zwiększony poziom ekspresji Ki67, w odniesieniu do grupy kontrolnej i traktowanej samym CY (ryc. 31 B). Podwyższony poziom ekspresji Ki67 odnotowano także w M-MDSC, jednak w tym przypadku efekt ten był spowodowany podaniem CY, a zastosowanie wektorów nie powodowało dodatkowego zwiększenia ekspresji tych cząsteczek. Z kolei, podania wektorów LV wpływały na obniżenie ekspresji Ki67 w PMN-MDSC.

Nie stwierdzono znaczących zmian w produkcji ROS pomiędzy badanymi grupami w poszczególnych subpopulacjach komórek mieloidalnych. Należy jednak podkreślić, że podanie CY powodowało zwiększenie poziomu produkcji ROS przez PMN-MDSC (ryc. 31 C). Co ciekawe, efekt ten nie był obserwowany w grupach, które otrzymały CY i wektory LV. Produkcja ROS przez PMN-MDSC pochodzące z tych grup była niższa niż po zastosowaniu samego CY, a nawet nieznacznie niższa niż w grupie kontrolnej. Obniżona produkcja ROS mogła wpływać na zmniejszenie supresji zależnej od PMN-MDSC.

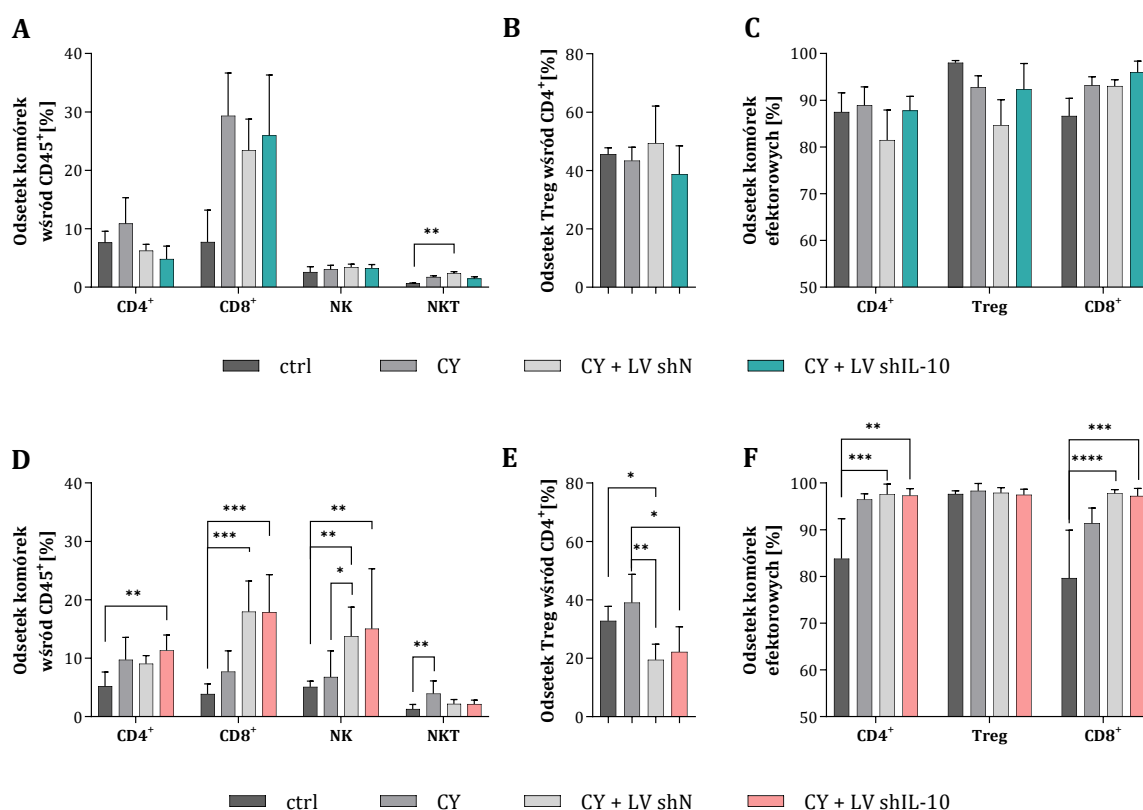
Określenie polaryzacji makrofagów związanych z nowotworem w kierunku komórek typu M1 lub M2 przeprowadzono na podstawie ekspresji CD206. Wykazano, że w grupach, które otrzymały CY odsetek makrofagów typu M1 był wyższy niż w grupie kontrolnej. (ryc. 31 D). Chociaż różnice pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie, najwyższy współczynnik M1/M2 odnotowano w grupie CY + LV shIL-10.

#### *Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38*

Dokonano również oceny odsetka i aktywności komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych. Analizę przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej według schematu przedstawionego na rycinie 23 w podrozdziale 4.4.1.2.

Główne zmiany, jakie obserwowano w obrębie komórek limfoidalnych zachodziły w dwóch populacjach: limfocytach T CD8<sup>+</sup> oraz komórkach NK (ryc. 32 A, D). Wykazano, że podanie CY indukowało znaczny wzrost odsetka limfocytów T cytotoksycznych wśród leukocytów naciekających guzy nowotworowe, który był obserwowany we wszystkich grupach otrzymujących cytostatyki. Porównując dane z dwóch doświadczeń, można zaobserwować, że po zastosowaniu cyklofosfamid następuje gwałtowny wzrost odsetka limfocytów T CD8<sup>+</sup>, który po dłuższym czasie obserwacji ulega obniżeniu. Chociaż w doświadczeniu przeprowadzonym według krótszego schematu postępowania nie widać znacznych różnic pomiędzy grupami, które otrzymały CY, przedłużona obserwacja ujawnia, że w grupach traktowanych CY i wektorami LV zwiększony odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> utrzymuje się dłużej. Zaobserwowano ponadto, że z czasem wśród leukocytów naciekających guzy nowotworowe wzrasta odsetek komórek NK, a największy wzrost stwierdzono w grupie CY + LV shIL-10 (ryc. 32 D). Dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań wektorów, w grupie CY + LV shIL-10 odnotowano również znaczny wzrost odsetka limfocytów

T CD4<sup>+</sup> w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 32 D). Należy również podkreślić, że pomimo wzrostu odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> w grupie CY + LV shIL-10, udział procentowy populacji Treg wśród tych komórek ulegał obniżeniu (ryc. 32 E). Analizując zmiany w ekspresji CD44 i CD62L, stwierdzono wzrost odsetka komórek efektorowych zarówno wśród limfocytów T CD8<sup>+</sup>, jak i T CD4<sup>+</sup> w grupach, które otrzymały CY i wektory LV. Zmiany te były szczególnie widoczne po zastosowaniu przedłużonego schematu podań (ryc. 32 F).



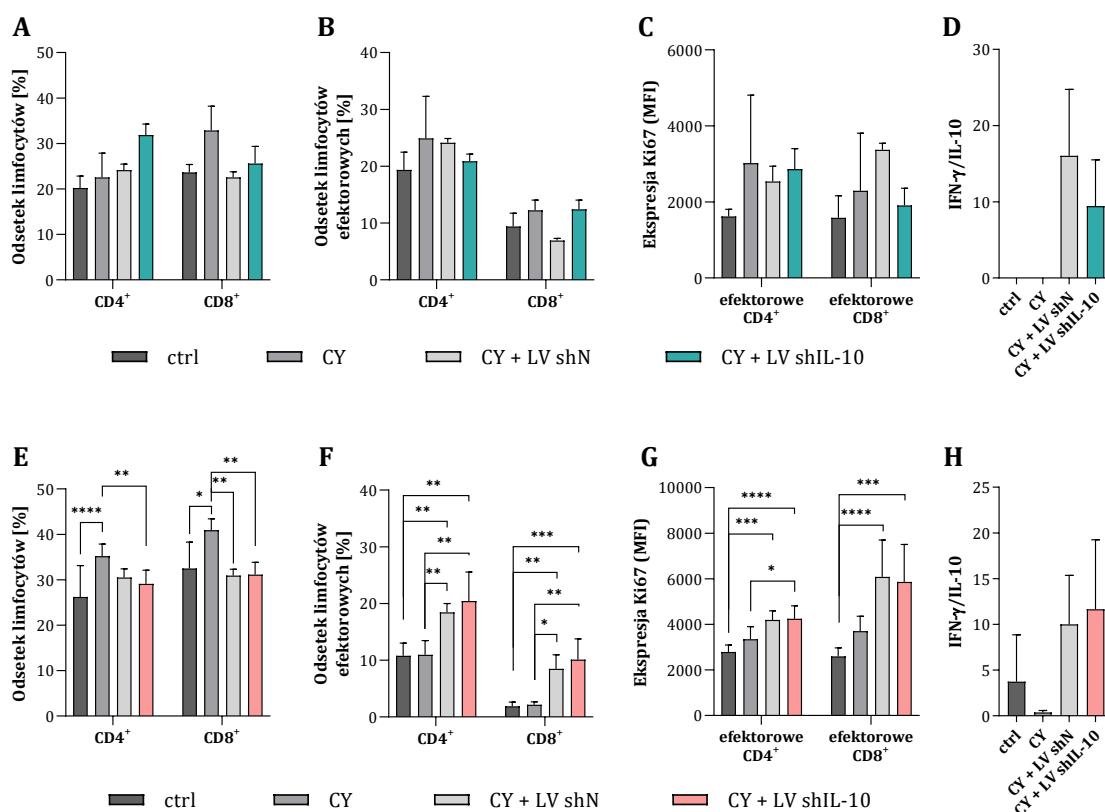
**Ryc. 32. Ocena nacieku komórek limfoidanych w guzach MC38 przeprowadzona 8-go (A, B, C) lub 12-go (D, E, F) dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10.** W trakcie wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród limfocytów naciekających guzy nowotworowe zidentyfikowano populacje limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, komórki NK oraz NKT. Określono odsetki tych komórek wśród leukocytów CD45<sup>+</sup> (A, D), a także odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów CD4<sup>+</sup> (B, E). Na podstawie ekspresji cząsteczek CD62L i CD44 określono odsetki komórek efektorowych w poszczególnych populacjach limfocytów T (C, F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3 (A-C) lub 10 (D-F) myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### Aktywność limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych

Analizę aktywności limfocytów uzyskanych z wartowniczych węzłów chłonnych przeprowadzono według opisu zamieszczonego w podrozdziale 4.4.1.2. (ryc. 25).

Podanie cyklofosfamidu indukowało wzrost odsetka limfocytów T CD8<sup>+</sup> w sLN, co było widoczne zarówno po krótkim, jak i dłuższym czasie obserwacji (ryc. 33 A, E). Natomiast,

uzupełnienie schematu podań o wektory LV nie wywoływało zmian w odsetku tych komórek w porównaniu do myszy nietraktowanych. Szóstego dnia po rozpoczęciu podań LV shIL-10 w sLN odnotowano zwiększony odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup> (ryc. 33 A). Efekt ten był jednak krótkotrwały i dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań wektorów w grupie CY + LV shIL-10 stwierdzono znacznie mniej limfocytów T CD4<sup>+</sup> niż w grupie CY. Była to jednak wciąż wartość wyższa niż ta uzyskana dla grupy nieleczonej (ryc. 33 E).



**Ryc. 33. Ocena aktywności limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych przeprowadzona 8-go (A-D) lub 12-go (E-H) dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10.**

W trakcie wieloparametrowej analizy cytometrycznej, określono odsetki limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> w wartowniczych węzłach chłonnych (A, E), a wśród nich odsetki komórek efektorowych (B, F). Oszacowano także poziom ekspresji cząsteczek Ki67 (C, G). Zdolność limfocytów wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych do produkcji IFN- $\gamma$  i IL-10 przedstawiono jako stosunek stężeń tych cytokin oszacowanych w nadsączach znad 24-godzinnej hodowli tych komórek (D, H). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy węzłów chłonnych pobranych od 3 (A-D) lub 10 (E-H) myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Zastosowanie CY + LV shN lub CY + LV shIL-10 indukowało powstawanie efektorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>. Wskazuje na to obserwowany po zastosowaniu dłuższego schematu podań podwyższony odsetek komórek efektorowych wśród tych populacji, jak również wyższa niż w grupie kontrolnej i traktowanej samym CY ekspresja markera proliferacji Ki67 (ryc. 33 F, G). Ponadto, wektory lentiwirusowe powodowały zwiększoną zdolność komórek sLN do wydzielania

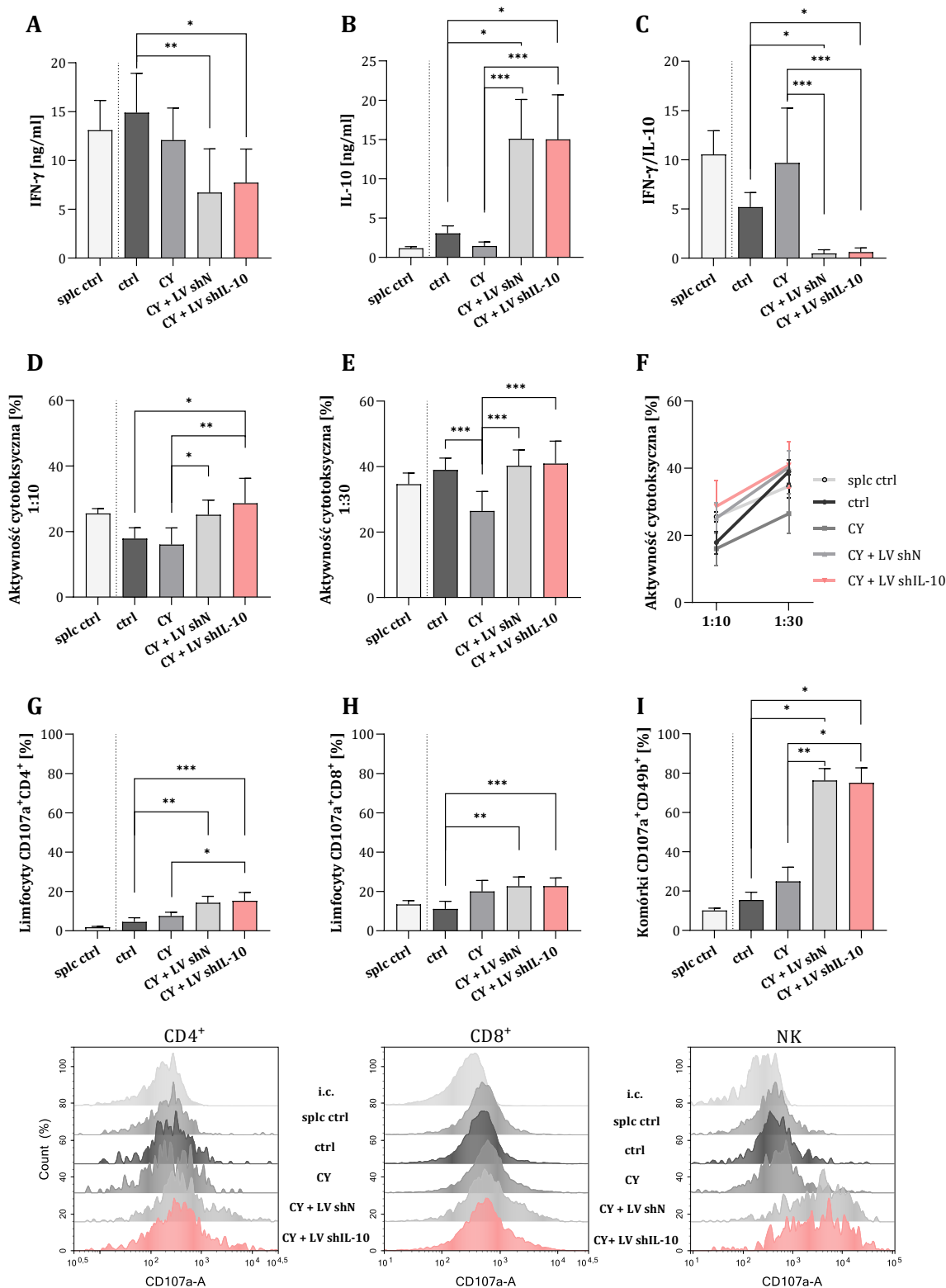


IFN- $\gamma$ , o czym świadczy wysoka wartość współczynnika IFN- $\gamma$ /IL-10 (ryc. 33 D, H). Takiego efektu nie odnotowano po zastosowaniu samego cytostatyku.

#### 4.4.2.3. Aktywność komórek układu odpornościowego w śledzionie

Komórki śledzionowe pobrane od myszy poddano restymulacji podczas hodowli mieszanej z komórkami MC38. Podobnie jak opisano w podrozdziale 4.4.1.3, wpływ CY i wektorów LV na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej określono na podstawie aktywności splenocytów pobranych od myszy z doświadczenia, w którym stosowano przedłużony schemat podań wektorów lentiwirusowych.

Restymulowane komórki śledzionowe pobrane od myszy, które otrzymywały wektory lentiwirusowe, wykazywały obniżoną zdolność do produkcji IFN- $\gamma$ , szczególnie w porównaniu do splenocytów z grupy kontrolnej (ryc. 34 A). Natomiast, komórki z tych grup wydzielają znacznie więcej IL-10, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, traktowanej samym cyklofosfamidem, jak i do splenocytów pochodzących od zdrowej myszy, które zostały poddane pierwotnej stymulacji antygenami nowotworowymi (ryc. 34 B). Zastosowanie CY i wektorów LV wpłynęło na znaczną zmianę proporcji produkowanych cytokin, na co wskazuje wyznaczony współczynnik IFN- $\gamma$ /IL-10. W grupach, które otrzymywały CY i wektory LV wartości współczynnika były mniejsze niż 1, a w grupie kontrolnej oraz traktowanej cyklofosfamidem wynosiły odpowiednio 5,2 oraz 9,7 (ryc. 34 C). Pomimo to splenocyty pobrane od myszy, które otrzymywały CY w kombinacji z wektorami LV charakteryzowały się wyższą aktywnością cytotoksyczną wobec komórek MC38, niż splenocyty pochodzące od myszy z grupy kontrolnej oraz grupy traktowanej samym CY (ryc. 34 D, E, F). Należy również podkreślić, że splenocyty uzyskane z grupy, która otrzymała tylko CY wykazywały niższą aktywność cytotoksyczną niż splenocyty z grupy kontrolnej (ryc. 34 E). Na podstawie analizy ekspresji CD107a na powierzchni limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> i komórek NK stwierdzono natomiast, że w grupach, które otrzymały CY i wektory LV udział procentowy komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych był znacznie większy niż w grupie kontrolnej (ryc. 34 G, H, I). Najwyższy odsetek komórek CD107a<sup>+</sup> odnotowano wśród komórek NK – w grupach CY + LV shN i CY + LV shIL-10 wynosił on odpowiednio 76% i 75% (ryc. 34 I).



**Ryc. 34.** Aktywność restimulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy po podaniu cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10. Stężenie IFN- $\gamma$  i IL-10 określono w nadsączach znad 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38 (A, B, C). Aktywność cytotoksyczną efektorowych komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 i 1:30 (D, E, F). Odsetek komórek cytotoksycznych (CD107a<sup>+</sup>) określono wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> i komórek NK (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>) po 2-godzinnej inkubacji restimulowanych splenocytów z komórkami MC38 (G, H, I). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy komórek pobranych od 10 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.4.3. Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że wektory lentiwirusowe podawane doguzowo są wydajnym nośnikiem shRNA. Wektory LV, stosowane samodzielnie, transdukowały głównie komórki mieloidalne. Natomiast, gdy przed zastosowaniem wektorów LV myszom podano cyklofosfamid, wzrost ekspresji EGFP wskazujący na zachodzącą transdukcję odnotowano głównie w populacjach komórek nowotworowych oraz limfocytów. Zmniejszona wydajność wektorów lentiwirusowych w dostarczaniu materiału genetycznego do komórek mieloidalnych w tym przypadku może być spowodowana przez różnicujący wpływ cyklofosfamidu na te komórki. Cytostatyk indukował bowiem dojrzewanie populacji komórek mieloidalnych, możliwe zatem, że komórki te były mniej podatne na transdukcję niż komórki wykazujące niższy stopień dojrzałości identyfikowane w guzach myszy traktowanych samymi wektorami LV. Pomimo różnic w populacjach docelowych transdukowanych przez wektory LV, po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 odnotowano obniżony poziom produkcji IL-10 przez komórki izolowane z guzów, co było szczególnie widoczne w grupie, która otrzymała cyklofosfamid i wektory LV shIL-10 podawane według dłuższego schematu.

Po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 odnotowano gwałtowny wzrost odsetka PMN-MDSC wśród leukocytów naciekających guzy. Gdy schematy doświadczeń uzupełniono o podanie cyklofosfamidu, przyrost odsetka tych komórek obserwowano niezależnie od rodzaju zastosowanych wektorów LV. Jednocześnie w grupach traktowanych CY i wektorami LV stwierdzono znaczące obniżenie odsetka TAM. Choć komórki mieloidalne izolowane z guzów traktowanych wektorami LV wykazywały obniżoną aktywność supresorową wobec limfocytów T, to zmiany te nie były zależne od wyciszenia ekspresji IL-10. Zmianom w nacieku komórek mieloidalnych towarzyszyły zmiany w odsetkach komórek limfoidalnych infiltrujących do guzów nowotworowych. W doświadczeniu, w którym stosowano same wektory LV odnotowano istotnie zwiększony odsetek limfocytów T cytotoksycznych, co było szczególnie widoczne, gdy podania przeprowadzono według dłuższego schematu. Cyklofosfamid również indukował podwyższenie odsetka limfocytów T CD8<sup>+</sup>, a efekt ten był obserwowany ósmego dnia po podaniu cytostatyku i zanikał w trakcie obserwacji. Natomiast zastosowanie CY w kombinacji z wektorami LV, przeprowadzone według dłuższego schematu, powodowało istotny wzrost odsetków limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK. Jednocześnie zaobserwowano, że wektory LV podawane według dłuższego schematu, zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z CY, indukowały istotne obniżenie odsetka limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> naciekających guzy. Oprócz zmian w guzach, pod wpływem podawania wektorów LV odnotowano również zmiany w aktywności limfocytów T znajdujących się w wartowniczych węzłach chłonnych, związane z pobudzeniem miejscowej odpowiedzi odpornościowej. Już szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów LV odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> i, w mniejszym stopniu, T CD4<sup>+</sup> w sLN uległ obniżeniu.

---

Jednoczesne pobudzenie limfocytów T efektorowych wskazuje na to, że obniżenie odsetków poszczególnych populacji limfocytów T może być związane z migracją tych komórek z sLN w kierunku guzów nowotworowych. Zastosowanie cyklofosfamidu przed podaniem wektorów LV spowodowało, że reakcja indukowana przez wektory LV była opóźniona – wzrost odsetków intensywnie proliferujących komórek efektorowych w populacjach limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> obserwowano w doświadczeniu przeprowadzonym według dłuższego schematu.

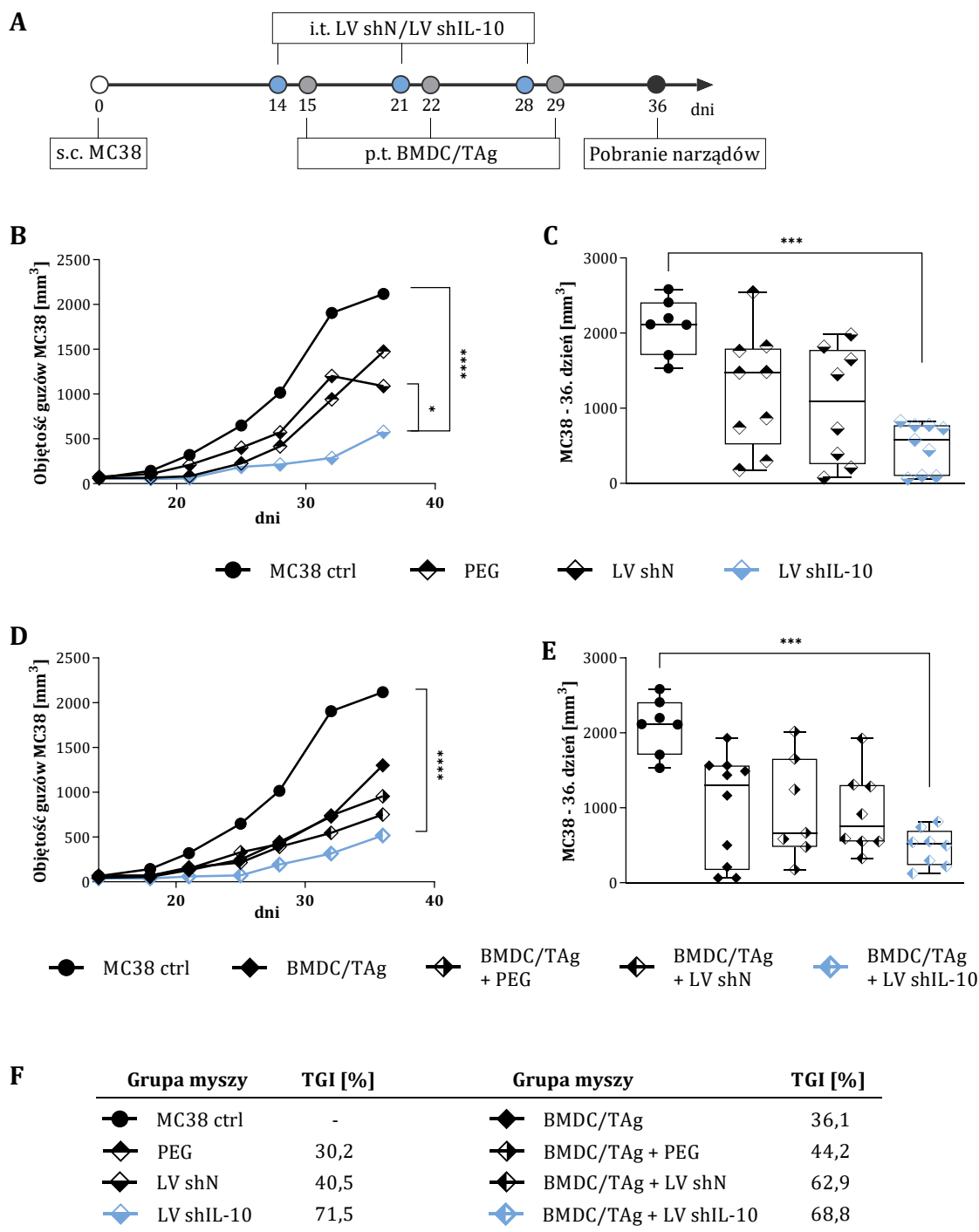
Wektory LV podawane doguzowo indukowały również ogólnoustrojową odpowiedź odpornościową. Restymulowane splenocyty uzyskane od myszy traktowanych wektorami LV wykazywały zwiększoną aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych. Najwyższy odsetek komórek wydzielających ziarna cytolityczne odnotowano wśród populacji komórek NK. Z kolei, po zastosowaniu cyklofosfamidu w kombinacji z wektorami LV, istotne zwiększenie odsetka komórek cytotoksycznych obserwowano również w populacjach limfocytów T CD8<sup>+</sup> i T CD4<sup>+</sup>, co wskazuje na uruchomienie mechanizmów swoistej odpowiedzi odpornościowej. Należy jednak podkreślić, że opisane zmiany nie były zależne od wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach, a raczej były indukowane przez podawane wektory lentiwirusowe.

## 4.5. Określenie efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających ekspresję IL-10

W kolejnym etapie pracy, przeprowadzono doświadczenie terapeutyczne, w którym myszy z rosnącymi podskórnymi guzami mysiego raka jelita grubego MC38 poddano immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających ekspresję IL-10. Badania przeprowadzono według schematu przedstawionego na rycinie 35 (ryc. 35 A). Po 14 dniach od podskórnego wszczepienia komórek MC38, myszom podano doguzowo wektory **LV shIL-10** lub **LV shN**. Iniekcję wektorów powtórzono trzykrotnie w odstępach tygodniowych. Dodatkowo jako kontrolę preparacji wektorów lentiwirusowych, myszom podawano osad powstały po wirowaniu nadsączy z hodowli nietransfekowanych komórek pakujących LentiX inkubowanych w glikolu polietylenowym, zawieszony w PBS (**PEG**). Terapię uzupełniono o szczepionki zawierające komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego stymulowane antygenami nowotworowymi (**BMDC/TAg**), które stosowano okołoguzowo jeden dzień po każdej iniekcji wektorów lentiwirusowych. Wzrost guzów był monitorowany przez cały czas trwania eksperymentu, a po jego zakończeniu określono zahamowanie wzrostu guzów w grupach terapeutycznych. Oprócz tego, w celu określenia wpływu zastosowanej terapii na indukcję odpowiedzi przeciwnowotworowej, tydzień po zakończeniu terapii od pięciu myszy z każdej grupy pobrano guzy oraz śledziony. Na podstawie analizy nacieku leukocytarnego w guzach oraz aktywności komórek śledzionowych oceniono stopień aktywacji miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

### 4.5.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii

Pomiary objętości guzów, prowadzone co 3-4 dni przez cały czas trwania eksperymentu, posłużyły do sporządzenia krzywych wzrostu guzów przedstawionych na rycinie 35. Zaobserwowano, że zastosowanie w terapii wektorów LV shIL-10 spowodowało znaczne spowolnienie wzrostu guzów, w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 35 B). Choć w poprzednich doświadczeniach wykazano, że zastosowanie nośnika shRNA w postaci wektorów lentiwirusowych indukuje silną odpowiedź układu odpornościowego, efekt terapeutyczny odnotowany po trzykrotnym podaniu wektorów kontrolnych był dużo słabszy niż po zastosowaniu wektorów kodujących shIL-10. Uzupełnienie terapii o szczepionki zawierające BMDC/TAg nie zwiększyło jednak skuteczności terapii. Pomimo że zahamowanie wzrostu guzów w grupie BMDC/TAg + LV shIL-10 było zdecydowanie większe niż w grupie kontrolnej, to różnica pomiędzy wynikami uzyskanymi dla grupy BMDC/TAg + LV shIL-10 a BMDC/TAg + LV shN nie była już istotna statystycznie (ryc. 35 D).



**Ryc. 35. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii z udziałem wektorów wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi.** Mysiom z rosnącymi podskórnie guzami MC38 podawano trzykrotnie, doguzowo (i.t.) wektory wyciszające ekspresję IL-10 (LV shIL-10) lub wektory kontrolne (LV shN) oraz okołoguzowo (p.t.) szczepionki na bazie komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi (BMDC/TAg) (A). Na wykresach przedstawiono mediany objętości guzów wyznaczone na podstawie pomiarów prowadzonych co 3-4 dni. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA Friedmana i testu *post hoc* Dunna (B, D). Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę objętości guzów zmierzonych 36. dnia doświadczenia. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C, E). W tabeli zamieszczono wartości zahamowania wzrostu guzów (TGI) wyliczonych dla 36. dnia doświadczenia w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (MC38 ctrl) (F). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). PEG - kontrola preparacji wektorów lentiwirusowych.

Dodatkowo nie odnotowano znacznych różnic we wzroście guzów nowotworowych pomiędzy grupami, które otrzymywały LV shIL-10 lub BMDC/TAg + LV shIL-10. W obu grupach mediany objętości guzów obliczone w 36. dniu doświadczenia, czyli tydzień po zakończeniu terapii, były podobne (ryc. 35 C, E). Ponadto, wartości zahamowania wzrostu guzów (TGI) wyliczone dla tych grup w odniesieniu do grupy kontrolnej również nie różniły się w sposób znaczący. TGI dla grup LV shIL-10 i BMDC/TAg + LV shIL-10 wynosiło odpowiednio 71,5 % i 68,8% (ryc. 35 F).

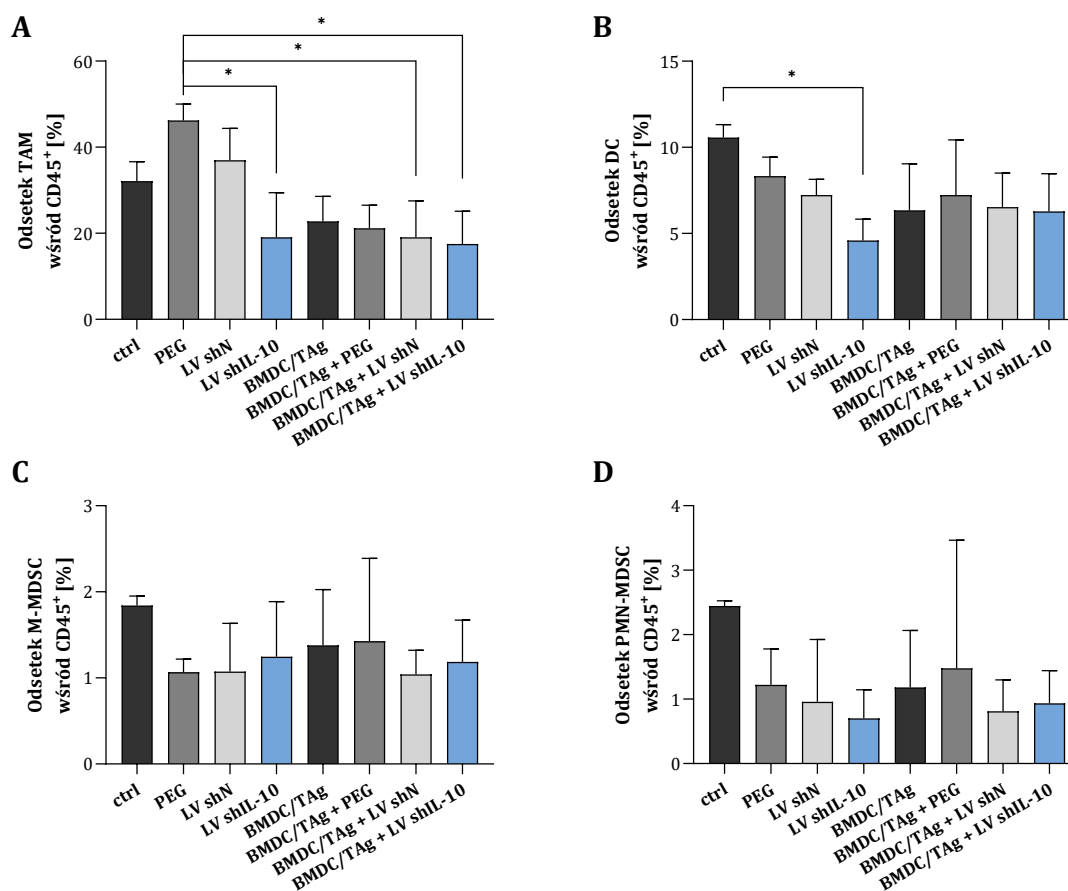
#### **4.5.2. Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii**

W celu określenia wpływu zastosowanej immunoterapii na indukcję miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, dokonano analizy aktywności komórek mieloidalnych i limfoidalnych naciekających guzy MC38. Przeprowadzono wieloparametrowe analizy metodą cytometrii przepływowej, według schematów przedstawionych na rycinach 18 i 23 zamieszczonych w podrozdziale 4.4.1.2. Podczas analizy populacji komórek mieloidalnych, wyznaczono odsetki populacji TAM, DC, M-MDSC i PMN-MDSC wśród leukocytów naciekających guzy. Oceniono także polaryzację makrofagów oraz określono poziom zróżnicowania zidentyfikowanych populacji na podstawie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni komórek. Analiza komórek limfoidalnych obejmowała określenie odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK i NKT wśród leukocytów zidentyfikowanych w guzach. Oznaczono udział procentowy limfocytów T regulatorowych wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup>, a także odsetek komórek efektorowych wśród zidentyfikowanych populacji limfocytów T.

##### *4.5.2.1. Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38*

Analiza komórek mieloidalnych naciekających guzy wykazała zmiany w udziale procentowym poszczególnych populacji wśród leukocytów. Zaobserwowano, że po zastosowaniu wektorów LV shIL-10, zarówno w postaci monoterapii, jak i w skojarzeniu z komórkami dendrytycznymi, odsetek TAM uległ obniżeniu (ryc. 36 A). Podobny efekt odnotowano we wszystkich pozostałych grupach, w których myszom podawano BMDC/TAg. Z kolei, wektory LV shN stosowane samodzielnie nie powodowały takiej zmiany. Wśród leukocytów naciekających guzy pochodzące z grupy LV shIL-10 oznaczono także istotnie mniej DC (ryc. 36 B). Chociaż po zastosowaniu LV shN lub BMDC/TAg również odnotowano obniżenie odsetka DC, efekt nie był tak silny jak po monoterapii z udziałem wektorów LV shIL-10. W przypadku analizy udziału procentowego MDSC, które stanowią niewielki odsetek leukocytów naciekających guzy, nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian. Pomimo że we wszystkich grupach traktowanych obserwowano około dwukrotne obniżenie odsetka M-MDSC, to wyniki są trudne do interpretacji ze względu na wysokie wartości odchyłeń standardowych (ryc. 36 C). Z kolei, najniższy odsetek

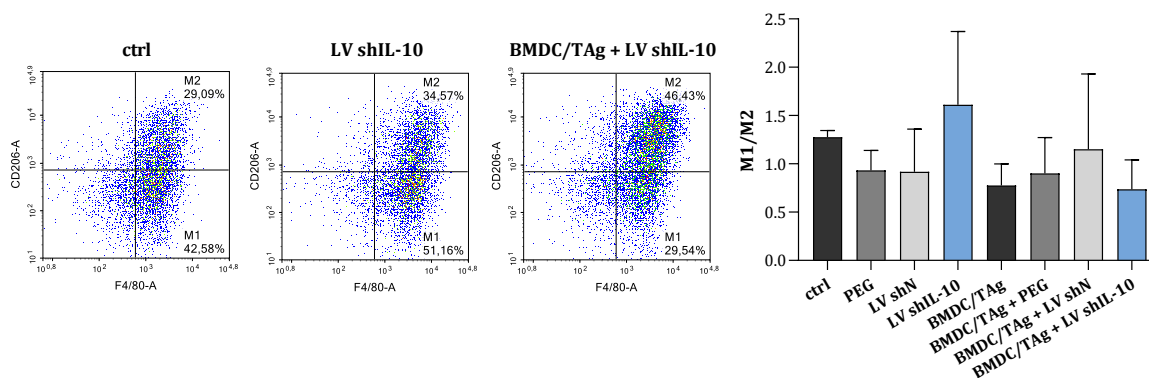
komórek PMN-MDSC odnotowano wśród leukocytów naciekających guzy traktowane wektorami LV shIL-10 (ryc. 36 D).



**Ryc. 36. Udział procentowy subpopulacji komórek mieloidalnych wśród leukocytów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii.** Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, w guzach nowotworowych zidentyfikowano populacje TAM (A), DC (B), M-MDSC (C) i PMN-MDSC (D). Odsetki poszczególnych populacji komórek określono wśród leukocytów (CD45<sup>+</sup>) naciekających guzy. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane na podstawie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ).

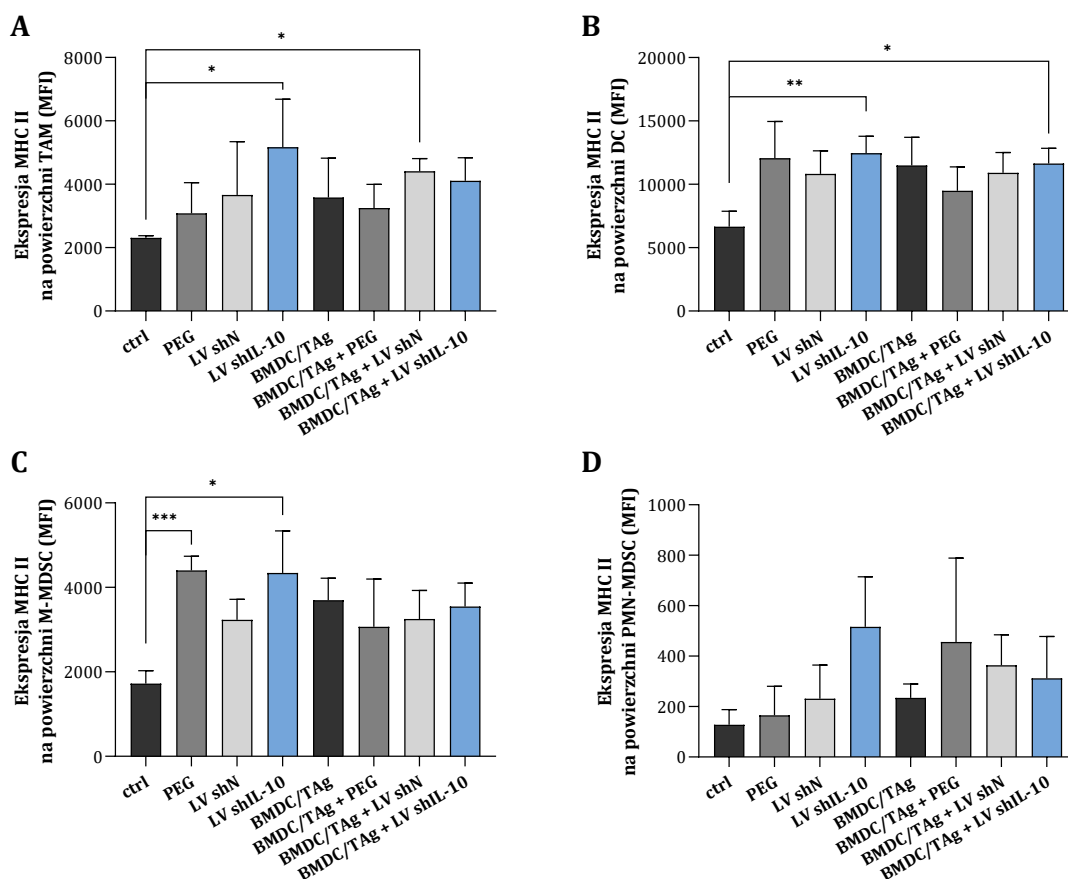
Polaryzację makrofagów naciekających guzy nowotworowe (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) określono na podstawie ekspresji markera CD206. Jak przedstawiono na wykresach punktowych zamieszczonych na rycinie 37, makrofagi rozdzielono na dwie populacje: M1 (CD206<sup>-</sup>) i M2 (CD206<sup>+</sup>). Wyznaczony współczynnik M1/M2 był najwyższy w grupie, która otrzymała monoterapię LV shIL-10. Natomiast, zastosowanie w terapii BMDC/TAG indukowało polaryzację w kierunku komórek typu M2. Niekorzystną, z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej, wartość współczynnika M1/M2 odnotowano również, w grupie myszy, którym podawano wektory LV shIL-10 w kombinacji z BMDC/TAG.





**Ryc. 37. Polaryzacja makrofagów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii.** Spośród komórek mieloidalnych (CD11b<sup>+</sup>) naciekających guzy wyodrębniono populacje makrofagów typu M1 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>) i M2 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>), jak zaprezentowano na wybranych wykresach punktowych. Na wykresie przedstawiono uśrednione wartości ilorazu odsetka komórek typu M1 i odsetka komórek typu M2 uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.

Wyznaczony na podstawie średniej intensywności fluorescencji (MFI) poziom ekspresji cząsteczek MHC II umożliwił ocenę stopnia zróżnicowania poszczególnych populacji komórek mieloidalnych. Zaobserwowano istotny wzrost poziomu ekspresji MHC II na powierzchni TAM zidentyfikowanych w guzach myszy, które otrzymały monoterapię z udziałem wektorów wyciszających ekspresję IL-10 (ryc. 38 A). Natomiast, gdy wektory LV shIL-10 zastosowano w połączeniu z BMDC/TAg, efekt nie był tak silny, a MFI w tej grupie było porównywalne do MFI odnotowanego w grupie BMDC/TAg + LV shN. W przypadku populacji DC, najwyższy poziom ekspresji MHC II stwierdzono w grupach, które otrzymywały wektory LV shIL-10, zarówno w formie monoterapii, jak i w kombinacji z BMDC/TAg, a zmiany te były statystycznie istotne w odniesieniu do grupy kontrolnej, nieleczonej (ryc. 38 B). W pozostałych grupach także obserwowano wyższe wartości MFI dla MHC II na powierzchni DC w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. W przypadku M-MDSC, najwyższy poziom ekspresji MHC II odnotowano w grupach, które otrzymywały kontrolę PEG i stosowane samodzielnie wektory LV shIL-10 (ryc. 38 C). Pomimo że zastosowanie BMDC/TAg także powodowało wzrost poziomu ekspresji MHC II na powierzchni M-MDSC w porównaniu do grupy kontrolnej, terapia skojarzona BMDC/TAg + LV shIL-10 nie wpłynęła na większe zróżnicowanie zidentyfikowanych komórek. Chociaż PMN-MDSC, jako komórki granulocytarne wykazują niski poziom ekspresji MHC II, to po zastosowaniu LV shIL-10, poziom ten wzrósł kilkukrotnie, w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 38 D). Jednak ze względu na wysokie wartości odchylenia standardowego, zmiana ta nie była istotna statystycznie.

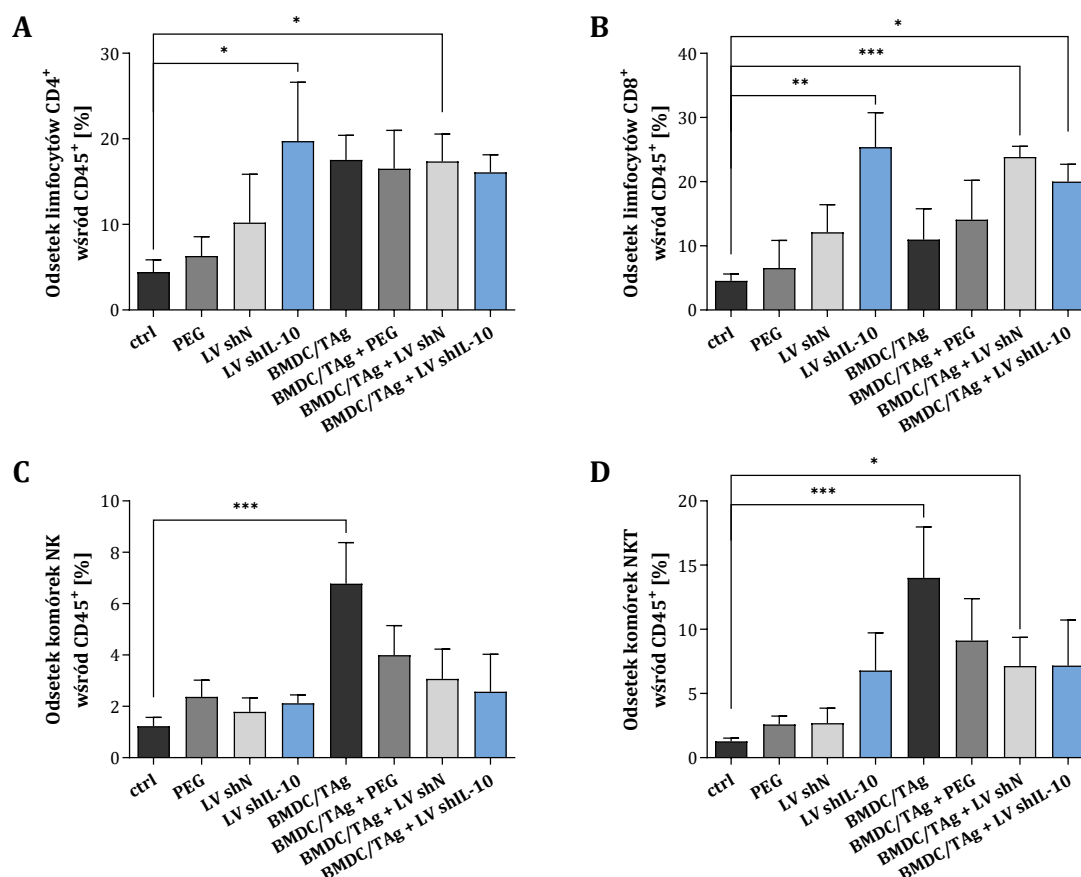


**Ryc. 38. Ekspresja MHC II na powierzchni subpopulacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii.** Ekspresję MHC II przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI) uzyskaną podczas analizy populacji TAM (A), DC (B), M-MDSC (C) i PMN-MDSC (D). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane na podstawie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.5.2.2. Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38

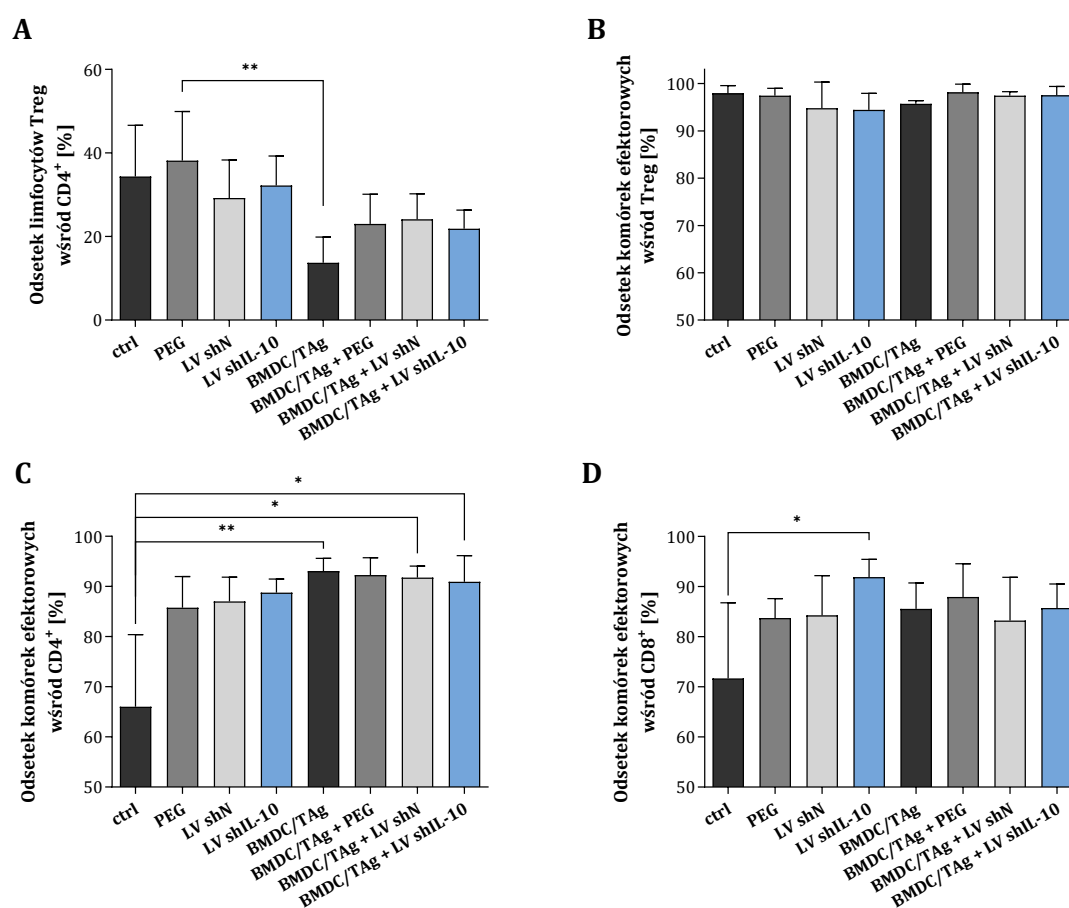
W pierwszym etapie analizy, określono odsetki komórek limfoidalnych zidentyfikowanych wśród leukocytów naciekających guzy. Po zastosowaniu monoterapii z udziałem LV shIL-10 odnotowano czterokrotny wzrost odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 39 A). Podobny efekt obserwowano w grupach, które otrzymywały szczepionki zawierające BMDC/TAg. Natomiast, zastosowanie terapii skojarzonej z udziałem BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 nie wpłynęło na dodatkowe podwyższenie odsetka tych limfocytów. W przypadku limfocytów T CD8<sup>+</sup>, stwierdzono, że wektory LV shIL-10 indukowały pięciokrotny wzrost odsetka tej populacji w odniesieniu do grupy kontrolnej (ryc. 39 B). Dla porównania, w grupie, która otrzymywała wektory LV shN wzrost w udziale procentowym limfocytów T CD8<sup>+</sup> wśród leukocytów naciekających guzy był mniejszy niż w grupie LV shIL-10. Natomiast gdy wektory, LV shIL-10 lub LV shN, zastosowano w połączeniu z BMDC/TAg, odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup>

osiągał wartości porównywalne do tych odnotowanych po monoterapii LV shIL-10. W przypadku komórek NK, największy wpływ na zmianę ich udziału procentowego miały BMDC/Tag stosowane w formie monoterapii (ryc. 39 C). W tej grupie, odsetek komórek NK był prawie pięciokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Uzupełnienie terapii o wektory lentiwirusowe powodowało obniżenie udziału procentowego tych komórek, bez względu na rodzaj zastosowanego wektora. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku komórek NKT – w grupie BMDC/Tag odsetek tych komórek wśród leukocytów naciekających guzy był prawie dziesięciokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej (ryc. 39 D). W grupach, które otrzymały terapię skojarzoną z udziałem BMDC/Tag i wektorów lentiwirusowych, odsetek tych komórek był niższy, ale nadal utrzymywał się na podwyższonym poziomie, w porównaniu do grupy kontrolnej. Odnotowano także, że same wektory LV shIL-10 spowodowały kilkukrotne zwiększenie odsetka komórek NKT w odniesieniu do guzów z grupy kontrolnej.



**Ryc. 39. Udział procentowy komórek limfoidalnych wśród leukocytów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii.** Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, w guzach nowotworowych zidentyfikowano limfocyty T CD4<sup>+</sup> (A) i T CD8<sup>+</sup> (B), komórki NK (C) oraz NKT (D). Odsetki poszczególnych populacji komórek określono wśród leukocytów (CD45<sup>+</sup>) naciekających guzy. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane na podstawie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Podczas analizy odsetka limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> zaobserwowano, że największy wpływ na udział procentowy tych komórek miały szczepionki zawierające BMDC/TAg (ryc. 40 A). W tej grupie, odsetek limfocytów Treg uległ prawie trzykrotnemu obniżeniu, w porównaniu do wartości uzyskanej dla grupy kontrolnej. Gdy terapię uzupełniono o wektory lentiwirusowe, odsetek limfocytów Treg nieco wzrósł, jednak nadal był niższy niż w grupie kontrolnej. Ocena udziału procentowego komórek efektorowych wśród limfocytów Treg nie wykazała znacznych zmian zachodzących po immunoterapii – we wszystkich grupach komórki efektorowe stanowiły ponad 90% limfocytów Treg (ryc. 40 B). Z kolei, gdy odsetek komórek efektorowych wyznaczono wśród wszystkich limfocytów T CD4<sup>+</sup>, zaobserwowano znaczący wzrost jego wartości w grupach, w których zastosowano terapię z udziałem BMDC/TAg, stosowanych zarówno w formie monoterapii, jak i w skojarzeniu z wektorami LV shN i LV shIL-10 (ryc. 40 C). Natomiast w przypadku limfocytów T CD8<sup>+</sup>, największy wzrost odsetka komórek efektorowych T CD8<sup>+</sup> indukowały wektory LV shIL-10, stosowane w formie terapii jednoskładnikowej (ryc. 40 D).



**Ryc. 40. Udział procentowy limfocytów Treg oraz limfocytów efektorowych w guzach MC38 pobranych od myszy poddanych immunoterapii.** Na wykresach przedstawiono średnie wartości odsetków limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> (A) oraz średnie wartości odsetków komórek efektorowych wśród limfocytów Treg (B), T CD4<sup>+</sup> (C) i T CD8<sup>+</sup> (D) uzyskane na podstawie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

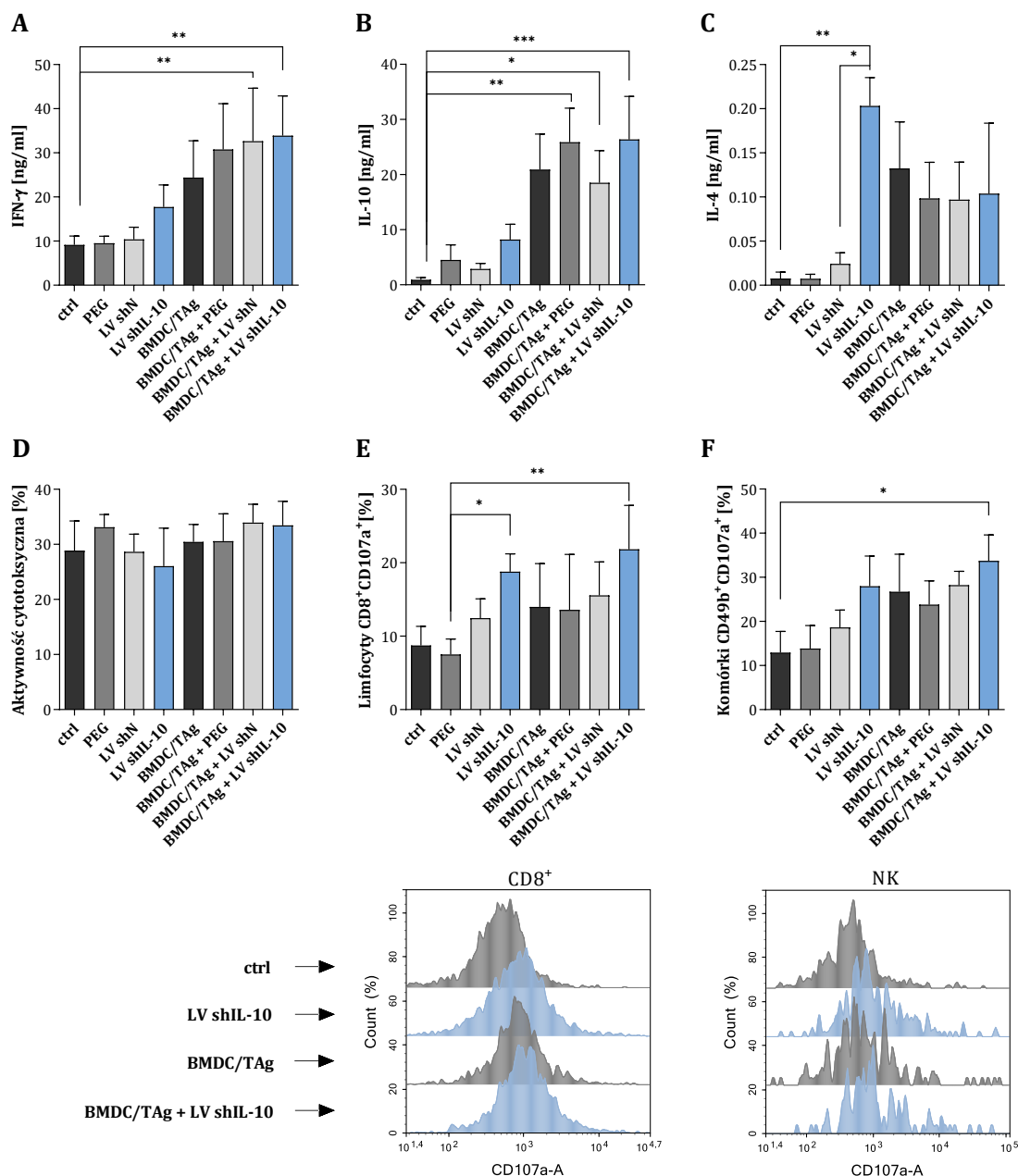
### 4.5.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii

Zmiany w ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej oceniono na podstawie aktywności komórek śledzionowych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii oraz nieleczonych. Prowadzono hodowlę mieszaną splenocytów i komórek MC38, a po pięciu dniach określono stężenia cytokin w nadsączach, a także zbadano aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych wobec komórek nowotworowych.

W nadsączach znad restymulowanych splenocytów pochodzących od myszy traktowanych wektorami LV shIL-10 odnotowano nieznacznie podwyższone stężenie IFN- $\gamma$ , zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i traktowanej wektorami LV shN (ryc. 41 A). Szczepionki zawierające BMDC/TAg także wpływały na zwiększenie zdolności splenocytów do produkcji tej cytokiny. Jednak najwyższe stężenia IFN- $\gamma$  potwierdzono w nadsączach znad komórek śledzionowych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii skojarzonej z udziałem BMDC/TAg i wektorów lentiwirusowych, zarówno LV shIL-10, jak i LV shN. Podobne zależności obserwowano podczas oceny stężeń IL-10. Największą zdolność do produkcji tej cytokiny wykazywały splenocyty z grupy BMDC/TAg + LV shIL-10, choć podobny wynik uzyskano w grupie BMDC/TAg + PEG (ryc. 41 B). Z kolei, analiza stężeń IL-4 wykazała, że po zastosowaniu u myszy monoterapii z udziałem wektorów LV shIL-10, zdolność splenocytów do produkcji tej cytokiny znacznie wzrosła, zarówno w porównaniu do komórek uzyskanych od myszy kontrolnych, jak i traktowanych wektorami LV shN (ryc. 41 C). W grupach, które otrzymywały BMDC/TAg, splenocyty także były pobudzone do produkcji tej cytokiny, jednak stężenia IL-4 w nadsączach pohożlowanych były dwukrotnie niższe niż w grupie LV shIL-10.

Aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po czterogodzinnej inkubacji komórek docelowych i efektorowych w stosunku liczbowym 1:10 (ryc. 41 D). Nie stwierdzono zmian w aktywności cytotoksycznej komórek śledzionowych uzyskanych od myszy, które otrzymały terapię w formie wektorów LV shN lub LV shIL-10. Najwyższy odsetek martwych komórek MC38 odnotowano wśród komórek inkubowanych ze splenocytami pochodzącymi od myszy z grup BMDC/TAg + LV shN oraz BMDC/TAg + LV shIL-10, jednak zmiany w porównaniu do grupy kontrolnej nie były istotne statystycznie. Wykazano natomiast różnice w odsetkach komórek wydzielających ziarna cytolityczne (CD107a<sup>+</sup>) wyznaczonych wśród limfocytów T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK znajdujących się wśród restymulowanych splenocytów. Zaobserwowano, że zastosowanie wektorów LV shIL-10, zarówno w formie monoterapii, jak i w połączeniu z BMDC/TAg, skutkowało znacznym zwiększeniem zdolności śledzionowych limfocytów T CD8<sup>+</sup> do wydzielania ziaren cytolitycznych (ryc. 41 E). Najwyższą wartość odsetka komórek CD107a<sup>+</sup> wśród CD8<sup>+</sup> uzyskano w grupie BMDC/TAg + LV shIL-10. Podobnych obserwacji dokonano w przypadku oceny

aktywności komórek NK – zastosowanie wektorów LV shIL-10 indukowało wydzielanie ziaren cytotolitycznych, a najwyższy odsetek komórek CD107a<sup>+</sup> wśród komórek NK odnotowano w grupie, która otrzymała immunoterapię złożoną z BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 (ryc. 41 F).



**Ryc. 41. Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.** Stężenie IFN- $\gamma$ , IL-10 i IL-4 określono w nadsączach znad 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38 (A, B, C). Aktywność cytotoksyczną efektorowych komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 (D). Odsetek komórek cytotoksycznych (CD107a<sup>+</sup>) określono wśród limfocytów T CD8<sup>+</sup> i komórek NK (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>) po 2-godzinnej inkubacji restymulowanych splenocytów z komórkami MC38 (E, F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy komórek pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.5.4. Podsumowanie

Po zastosowaniu wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 odnotowano znaczne zahamowanie wzrostu guzów. Efekt terapeutyczny był podobny, niezależnie od tego, czy w terapii zastosowano wektory LV shIL-10 w formie monoterapii, czy też w kombinacji z BMDC/TAg.

Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej wykazała, że wektory LV shIL-10, zarówno w formie monoterapii, jak i w skojarzeniu z BMDC/TAg, powodowały obniżenie odsetka TAM i DC wśród leukocytów naciekających guzy MC38, a jednocześnie wzrost ekspresji MHC II na powierzchni komórek należących do tych populacji. Takie zmiany mogą świadczyć o zwiększonej zdolności tych komórek do prezentacji antygenów limfocytom T, jak również do migracji w kierunku wartowniczych węzłów chłonnych, szczególnie w przypadku DC. Ponadto, wektory LV shIL-10 indukowały polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1 o potencjale przeciwnowotworowym, jednak tylko, gdy były stosowane w postaci monoterapii. Zmianom tym towarzyszył podwyższony odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NKT. Dodatkowo, wśród limfocytów T CD8<sup>+</sup> odnotowano znacznie więcej komórek efektorowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Tego efektu nie obserwowano po zastosowaniu wektorów kontrolnych. Terapia z udziałem BMDC/TAg skutkowała natomiast zwiększonym odsetkiem komórek NK i NKT wśród leukocytów, a także powodowała obniżenie odsetka limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup>. Jednak, uzupełnienie terapii komórkowej na bazie BMDC/TAg o wektory lentiwirusowe niwelowało te zmiany.

Po zastosowaniu terapii z udziałem wektorów LV shIL-10 stosowanych samodzielnie, jak i w kombinacji z BMDC/TAg stwierdzono pobudzenie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wśród restymulowanych splenocytów pochodzących z grupy BMDC/TAg + LV shIL-10 odnotowano najwyższy odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> i komórek NK zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych.

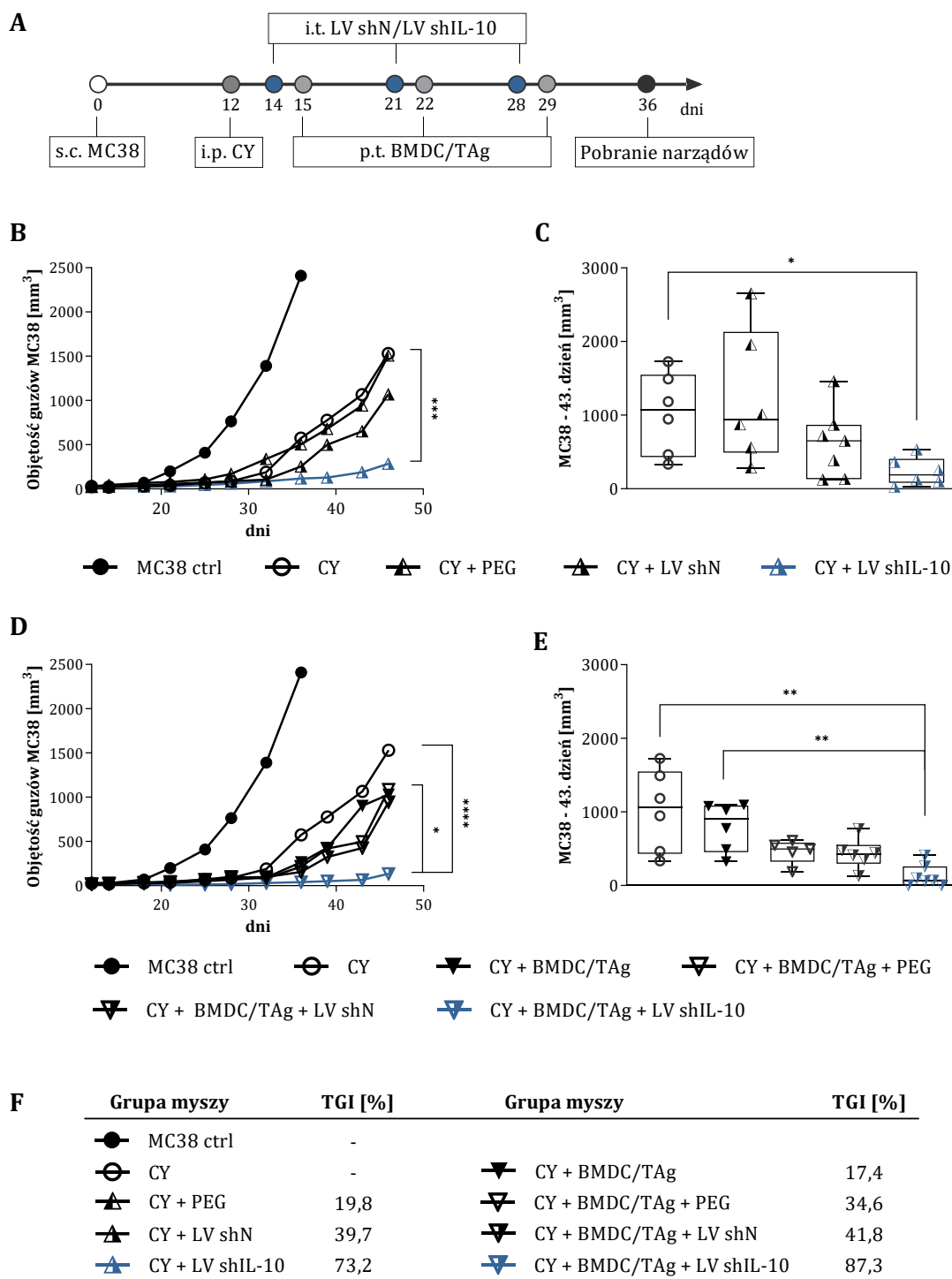
#### 4.6. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu, komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających ekspresję IL-10

W ostatnim etapie pracy, przeprowadzono doświadczenie, w którym myszy z rosnącymi podskórnie guzami mysiego raka jelita grubego MC38 poddano chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu, komórek dendrytycznych i wektorów wyciszających ekspresję IL-10. Jak przedstawiono na schemacie zamieszczonym na rycinie 42, po 12 dniach od podskórnego wszczepienia komórek MC38, myszom podano dootrzewnowo **CY** (ryc. 42 A). Dwa dni później, rozpoczęto doguzowe podawanie wektorów **LV shIL-10** lub wektorów kontrolnych **LV shN**. Podobnie jak podczas immunoterapii, iniekcję wektorów powtórzono trzykrotnie w odstępach tygodniowych, a dzień po każdym podaniu, terapię uzupełniono o okołoguzowe podanie szczepionek komórkowych **BMDC/TAg**. Pomiarów objętości guzów prowadzono do dwóch tygodni po zakończeniu terapii, a w celu określenia zmian w miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, podobnie jak w przypadku immunoterapii, tydzień po zakończeniu terapii od pięciu myszy z każdej grupy pobrano guzy nowotworowe i śledziona.

##### 4.6.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Krzywe wzrostu guzów, sporządzone na podstawie pomiarów objętości guzów prowadzonych co 3-4 dni przez cały czas trwania eksperymentu przedstawiono na rycinie 42 (ryc. 42 B, D). Ze względu na to, że u myszy w grupie kontrolnej guzy rosły dużo szybciej niż w pozostałych grupach, które otrzymały cytostatyk, myszy nieleczone uśmiercono w 36. dniu doświadczenia, a dalsze pomiary prowadzono w odniesieniu do grupy CY. Zaobserwowano, że chemioimmunoterapia z udziałem CY i wektorów LV shIL-10, spowodowała istotne spowolnienie wzrostu guzów w porównaniu do grupy, która otrzymała tylko cytostatyk (ryc. 42 B). Takiego efektu nie obserwowano, gdy myszy otrzymywały terapię złożoną z CY i wektorów LV shN. Dwa tygodnie po zakończeniu terapii, mediana objętości guzów w grupie CY + LV shIL-10 była istotnie niższa niż w grupie traktowanej CY (ryc. 42 C), a wyznaczona w tym dniu wartość TGI w odniesieniu do grupy CY wynosiła 73,2%. Wartość TGI w grupie CY + LV shN była dużo niższa i wynosiła 39,7% (ryc. 42 F). Choć terapia zawierająca CY i BMDC/TAg nie spowodowała istotnego zahamowania wzrostu guzów w odniesieniu do grupy traktowanej CY (ryc. 42 D, E), to uzupełnienie terapii z udziałem CY i BMDC/TAg o podawanie LV shIL-10 skutkowało poprawą skuteczności terapii, a TGI w tej grupie wynosiło aż 87,3%.





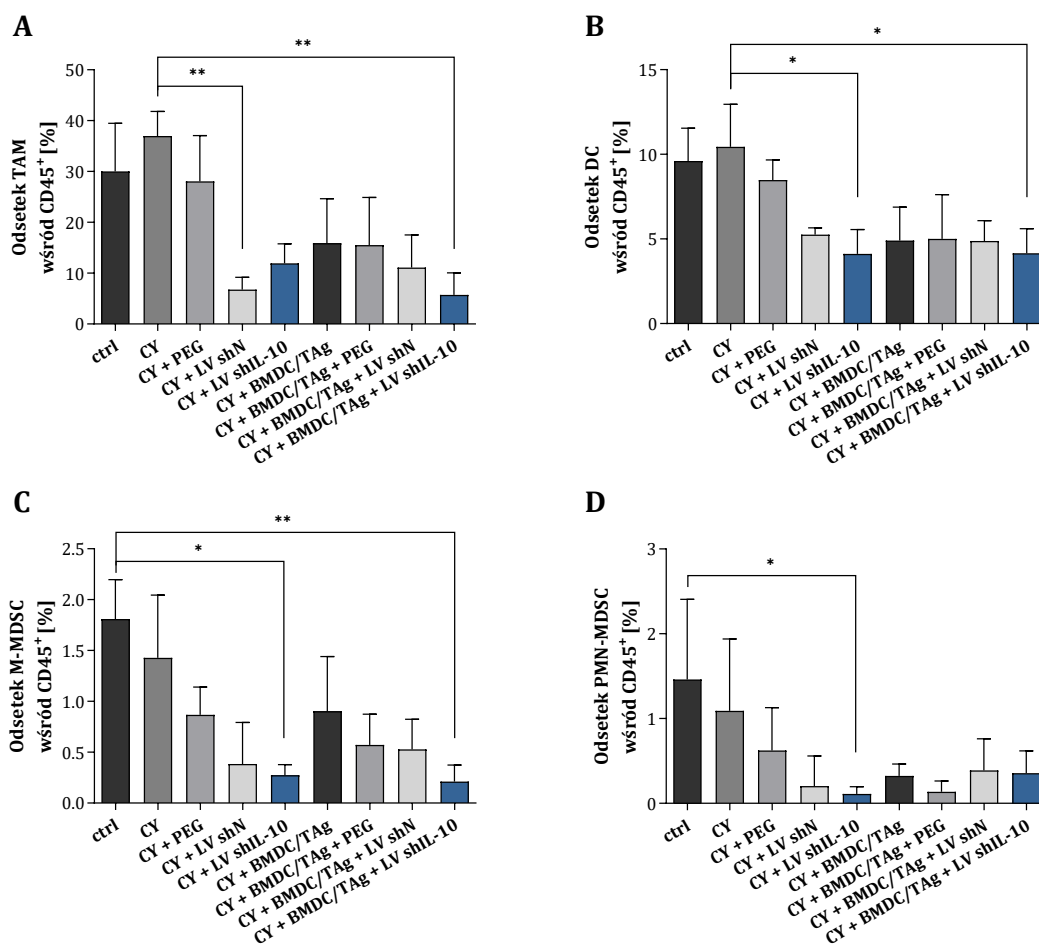
**Ryc. 42. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamid, wektorów wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi.** Mysiom z rosnącymi podskórnymi guzami MC38 podano cyklofosfamid, a następnie trzykrotnie wektory LV shIL-10 lub LV shN i szczepionki na bazie komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi (BMDC/TAg) (A). Na wykresach przedstawiono mediany objętości guzów wyznaczone na podstawie pomiarów prowadzonych co 3-4 dni. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA Friedmana i testu *post hoc* Dunna (B, D). Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę objętości guzów zmierzonych 43. dnia doświadczenia. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C, E). W tabeli zamieszczono wartości zahamowania wzrostu guzów (TGI) w odniesieniu do grupy traktowanej cyklofosfamidem (CY), oszacowane dla pomiarów uzyskanych 43. dnia doświadczenia (F). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). PEG - kontrola preparacji wektorów lentiwirusowych.

#### **4.6.2. Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii.**

Wpływ chemioimmunoterapii na indukcję miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej oceniono na podstawie analizy aktywności komórek mieloidalnych i limfoidalnych naciekających guzy MC38, przeprowadzonej zgodnie z opisem przedstawionym w podrozdziale 4.5.2. Schematy, według których wykonano wieloparametrowe analizy zmian w nacieku komórek odpornościowych w guzach nowotworowych myszy podanych chemioimmunoterapii przedstawiono w podrozdziale 4.4.1.2. (ryc. 18, ryc. 23).

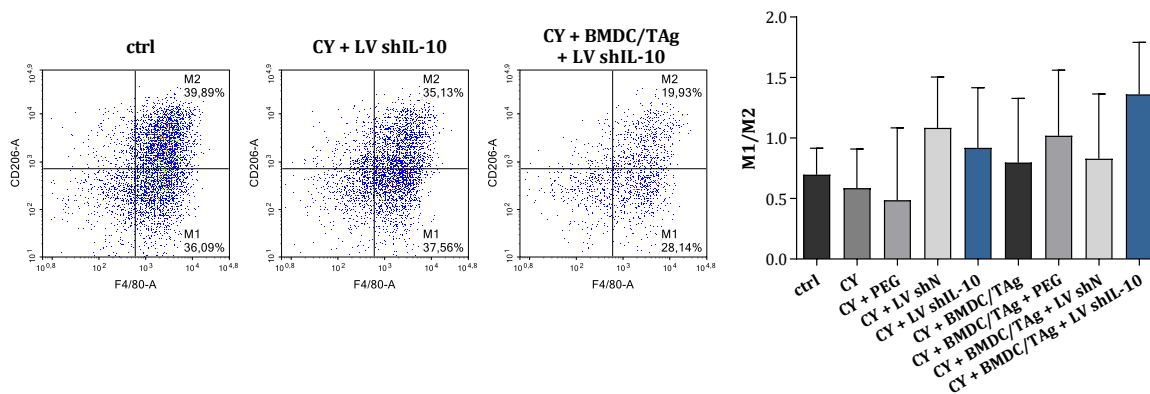
##### *4.6.2.1. Aktywność komórek mieloidalnych w guzach MC38*

Podczas analizy udziału procentowego poszczególnych populacji komórek mieloidalnych wśród leukocytów naciekających guzy, zaobserwowano znaczne zmiany zachodzące pod wpływem zastosowanej terapii. Odsetek TAM, których populacja stanowiła 30% wszystkich leukocytów naciekających guzy myszy nieleczonych, uległ obniżeniu do 5,7% po zastosowaniu terapii złożonej z CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 (ryc. 43 A). Cyklofosfamid podawany w kombinacji z BMDC/TAg także spowodował obniżenie odsetka tych komórek, jednak zmiana nie była tak duża. Natomiast, istotne obniżenie udziału procentowego TAM, do wartości 6,8%, odnotowano w grupie CY + LV shN. W przypadku populacji komórek dendrytycznych stwierdzono, że terapia z udziałem CY i wektorów LV shIL-10, stosowana zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z komórkami BMDC/TAg, spowodowała dwukrotne obniżenie odsetka DC wśród leukocytów naciekających guzy w porównaniu do grupy myszy nieleczonych i traktowanych CY (ryc. 43 B). Niższy niż w grupie kontrolnej odsetek DC odnotowano również w grupie CY + LV shN, a także w pozostałych grupach myszy, które otrzymywały CY i BMDC/TAg, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. Znaczne zmiany po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 obserwowano także w trakcie analizy odsetka M-MDSC – w grupie CY + LV shIL-10 odsetek tych komórek uległ obniżeniu z wartości 1,8% uzyskanej w grupie myszy nieleczonych do 0,3% (ryc. 43 C). Uzupełnienie terapii o BMDC/TAg spowodowało, że odsetek M-MDSC wśród leukocytów naciekających guzy uległ obniżeniu do wartości 0,2%. Z kolei w przypadku PMN-MDSC, ich najniższy odsetek odnotowano wśród leukocytów naciekających guzy myszy z grupy CY + LV shIL-10 (ryc. 43 D).



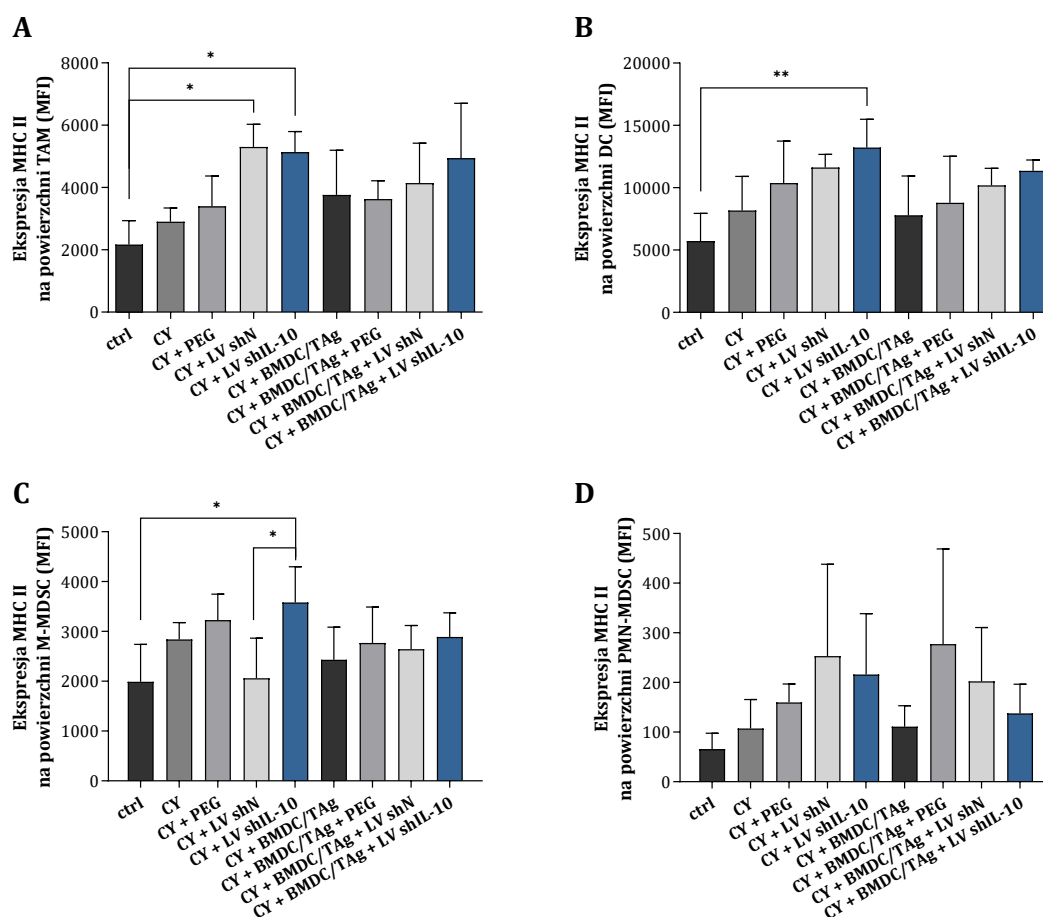
**Ryc. 43. Udział procentowy subpopulacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.** Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, w guzach nowotworowych zidentyfikowano populacje TAM (A), DC (B), M-MDSC (C) i PMN-MDSC (D). Odsetki poszczególnych populacji komórek określono wśród leukocytów (CD45<sup>+</sup>) naciekających guzy. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane na podstawie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Analiza poziomu ekspresji cząsteczek CD206 przez makrofagi infiltrujące guzy nowotworowe umożliwiła określenie polaryzacji tych komórek. W guzach myszy nieleczonych oraz traktowanych CY, zidentyfikowano więcej makrofagów typu M2. Zastosowanie w terapii CY w połączeniu z wektorami lentiwirusowymi spowodowało, że liczebność komórek typu M1 i M2 w guzach była na podobnym poziomie. Natomiast, polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1 odnotowano jedynie w grupie, która otrzymała terapię złożoną z CY, BMDC/Tag i wektorów LV shIL-10 (ryc. 44). Nie były to jednak zmiany istotne statystycznie.



**Ryc. 44. Polaryzacja makrofagów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.** Spośród komórek mieloidalnych ( $CD11b^+$ ) naciekających guzy wyodrębniono populacje makrofagów typu M1 ( $F4/80^+CD206^-$ ) i M2 ( $F4/80^+CD206^+$ ), jak zaprezentowano na wybranych wykresach punktowych. Na wykresie przedstawiono uśrednione wartości ilorazu odsetka komórek typu M1 i odsetka komórek typu M2 uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.

Na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek MHC II, określono stopień zróżnicowania komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38. Zaobserwowano, że zastosowanie CY w połączeniu z wektorami lentiwirusowymi, niezależnie od wbudowanej sekwencji shRNA, spowodowało znaczący wzrost poziomu ekspresji MHC II na powierzchni TAM (ryc. 45 A). Wysoki poziom ekspresji MHC II odnotowano także w grupie CY + BMDC/TAg + LV shIL-10, jednak zmiana w odniesieniu do grupy kontrolnej nie była istotna statystycznie. Terapia złożona z CY i wektorów LV shIL-10 wpłynęła również znacznie na zwiększenie poziomu ekspresji MHC II na powierzchni DC identyfikowanych w guzach (ryc. 45 B). Szczepionki zawierające BMDC/TAg stosowane w połączeniu z CY nie wpłynęły na poziom zróżnicowania DC. W grupie CY + BMDC/TAg + LV shIL-10 poziom ekspresji MHC II był wysoki, jednak nieco niższy niż w grupie, która otrzymała terapię bez BMDC/TAg. Ponadto, zastosowanie CY i wektorów LV shIL-10 wpłynęło na wzrost poziomu zróżnicowania M-MDSC, które w tej grupie wykazywały zwiększony poziom ekspresji MHC II, w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i traktowanej CY i wektorami LV shN (ryc. 45 C). Nie odnotowano znaczących zmian w poziomie ekspresji MHC II na powierzchni PMN-MDSC (ryc. 45 D).

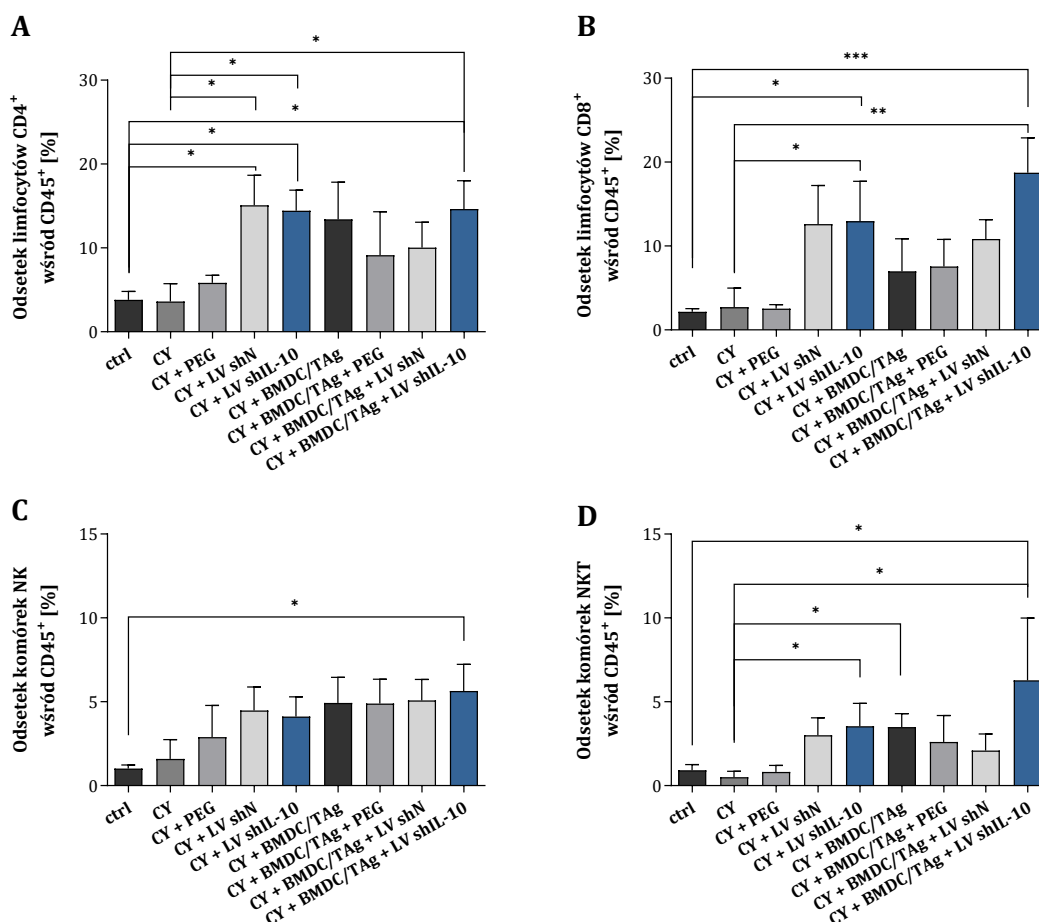


**Ryc. 45. Ekspresja MHC II na powierzchni subpopulacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.** Ekspresję MHC II przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI) uzyskaną podczas analizy populacji TAM (A), DC (B), M-MDSC (C) i PMN-MDSC (D). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane na podstawie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.6.2.2. Aktywność komórek limfoidalnych w guzach MC38

Podczas analizy udziału procentowego poszczególnych populacji komórek limfoidalnych wśród leukocytów naciekających guzy zaobserwowano zmiany zachodzące pod wpływem chemioimmunoterapii. Odnotowano istotny wzrost odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> wśród leukocytów naciekających guzy myszy, które otrzymały terapię z udziałem CY i wektorów lentiwirusowych, niezależnie od ich rodzaju (ryc. 46 A). W grupie CY + BMDC/TAg także stwierdzono więcej limfocytów T CD4<sup>+</sup> niż w grupie kontrolnej, ale jednoczesne zastosowanie CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 nie skutkowało dodatkowym podwyższeniem odsetka tych komórek. Z kolei, w przypadku analizy odsetka limfocytów T CD8<sup>+</sup>, wykazano, że wektory LV shN i LV shIL-10 indukowały silny naciek tych komórek do guzów, jednak najwyższy odsetek tych komórek obserwowano wśród leukocytów naciekających guzy myszy z grupy CY + BMDC/TAg + LV shIL-10 (ryc. 46 B). Wzrost odsetka komórek NK odnotowano w grupach traktowanych CY i wektorami lentiwirusowymi, a także we wszystkich grupach, które otrzymały

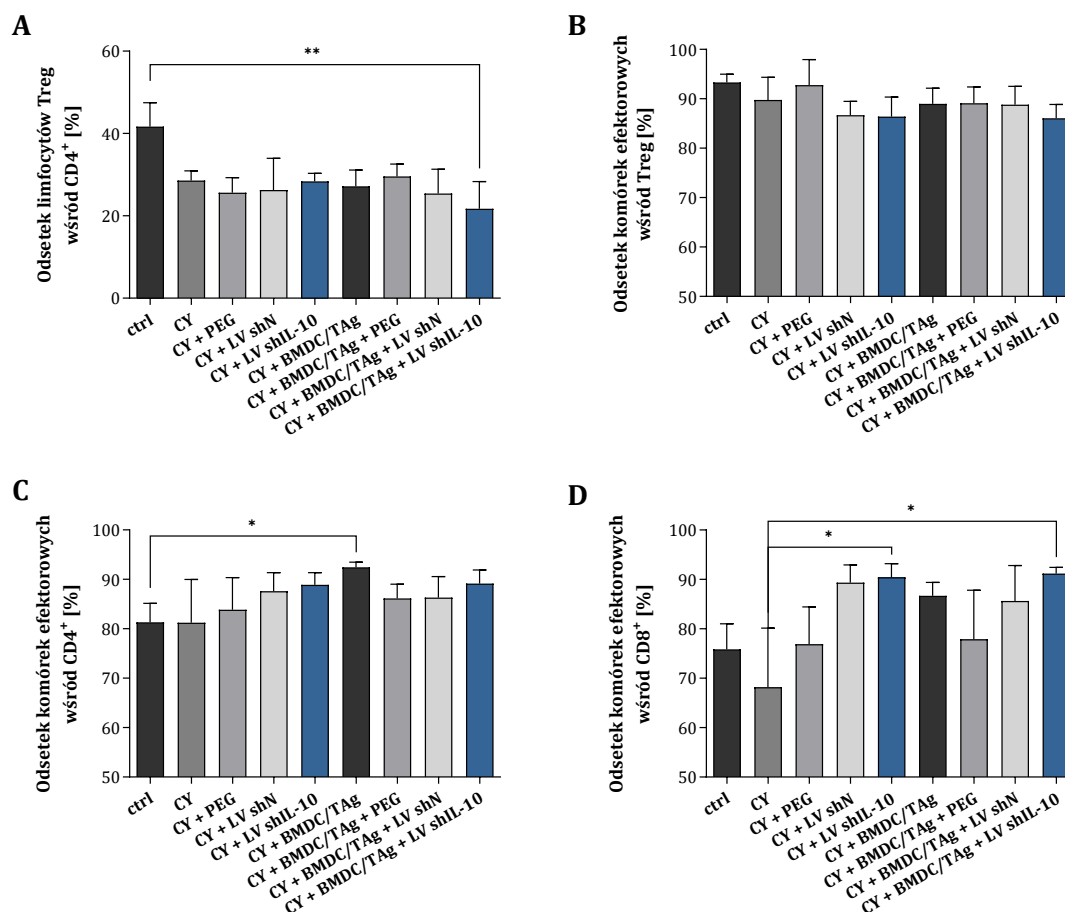
terapię zawierającą CY i BMDC/TAg (ryc. 46 C). Najwyższy udział procentowy tych komórek wśród leukocytów stwierdzono w grupie CY + BMDC/TAg + LV shIL-10. Zastosowanie w terapii wektorów LV skutkowało również zwiększeniem odsetka komórek NKT wśród leukocytów (ryc. 46 D). Natomiast najwyższą wartość odsetka tych komórek obserwowano w grupie CY + BMDC/TAg + LV shIL-10.



**Ryc. 46.** Udział procentowy komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, w guzach nowotworowych zidentyfikowano limfocyty T CD4<sup>+</sup> (A) i T CD8<sup>+</sup> (B), komórki NK (C) oraz NKT (D). Odsetki poszczególnych populacji komórek określono wśród leukocytów (CD45<sup>+</sup>) naciekających guzy. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane w trakcie analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

We wszystkich grupach myszy, które otrzymały cyklofosfamid, stwierdzono obniżenie udziału procentowego limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> naciekających guzy (ryc. 47 A). Jednak najniższy odsetek tych komórek odnotowano u myszy, które otrzymały terapię złożoną z CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10. W tej grupie, odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów Treg uległ obniżeniu, jednak różnica w odniesieniu do grupy kontrolnej nie była istotna statystycznie (ryc. 47 B). W grupach badanych, CY + LV shIL-10 i CY + LV shIL-10 + BMDC/TAg wykazano ponadto zwiększenie odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów

T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> naciekających guzy nowotworowe w porównaniu do grupy nieleczonej (ryc. 47 C, D). Jednak tylko w przypadku efektorowych limfocytów T CD8<sup>+</sup> z grup traktowanych wektorami LV shIL-10 różnice w odniesieniu do grupy, która otrzymała CY były istotne statystycznie (ryc. 47 D).



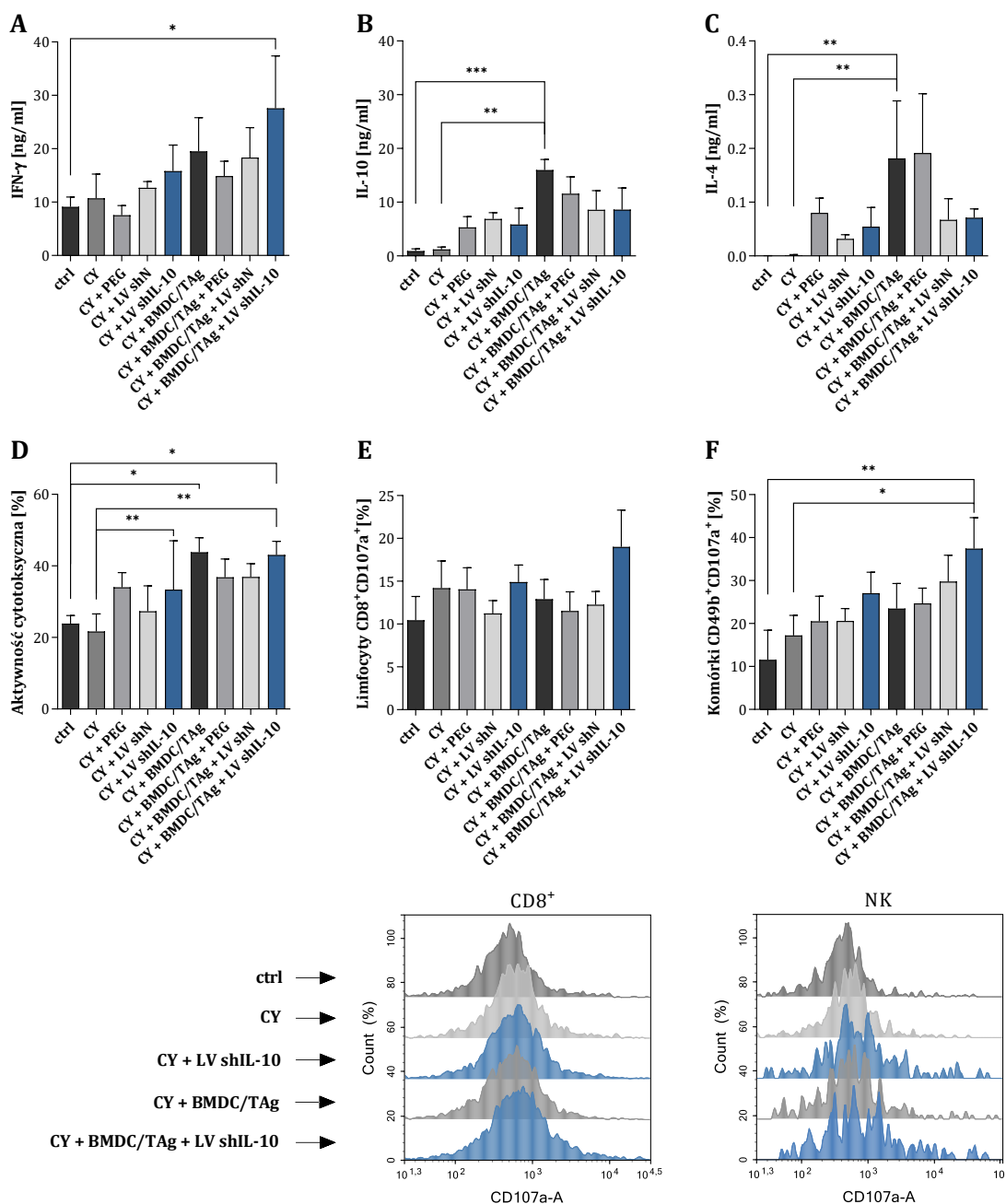
**Ryc. 47. Udział procentowy limfocytów Treg oraz limfocytów efektorowych w guzach MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.** Na wykresach przedstawiono średnie wartości odsetków limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> (A) oraz średnie wartości odsetków komórek efektorowych wśród limfocytów Treg (B), T CD4<sup>+</sup> (C) i T CD8<sup>+</sup> (D) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.6.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Podobnie jak opisano w podrozdziale 4.5.3., w celu oceny zmian w ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, określono profil cytokinowy oraz aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy nieleczonych oraz poddanych chemioimmunoterapii.

Analiza stężeń IFN- $\gamma$  w nadsączach z nad pięciodniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38 pokazała, że komórki śledzionowe uzyskane od myszy, które otrzymały terapię

złożoną z CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 wykazywały istotnie zwiększoną zdolność do produkcji tej cytokiny, w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 48 A). Z kolei, najwięcej IL-10 wydzielaly splenocyty pochodzące od myszy traktowanych CY i BMDC/TAg (ryc. 48 B). Terapia ta indukowała także zwiększoną zdolność do produkcji IL-4 przez komórki śledzionowe (ryc. 48 C).

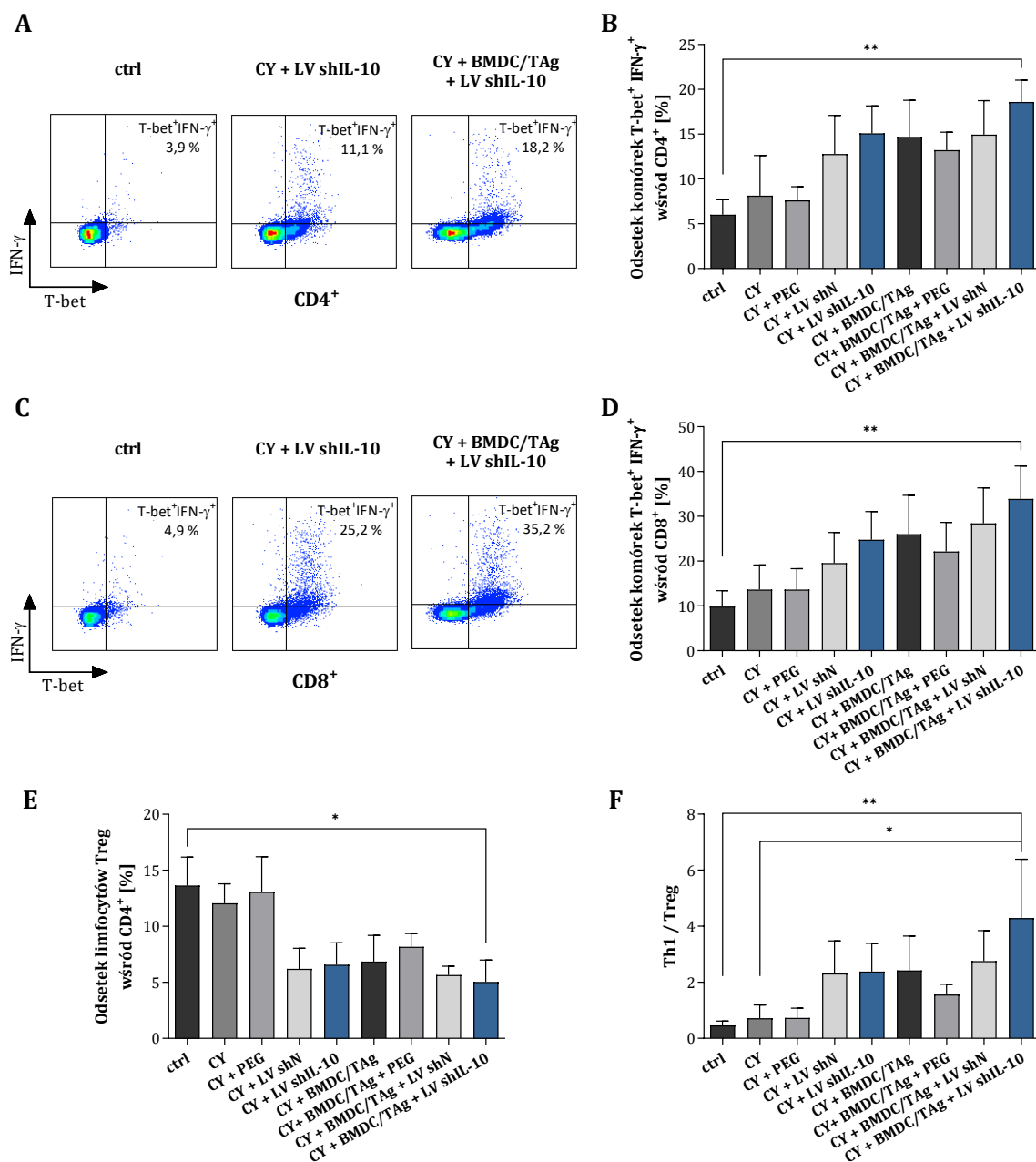


**Ryc. 48. Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.** Stężenie IFN- $\gamma$ , IL-10 i IL-4 określono w nadsączach z 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38 (A, B, C). Aktywność cytotoksyczną efektorowych komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 (D). Odsetek komórek cytotoksycznych (CD107a<sup>+</sup>) określono wśród limfocytów CD8<sup>+</sup> i komórek NK po 2-godzinnej inkubacji restymulowanych splenocytów z komórkami MC38 (E, F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane z analizy komórek pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



Ocena aktywności cytotoksycznej restymulowanych splenocytów wobec komórek MC38 wykazała, że komórki śledzionowe uzyskane od myszy, które otrzymały CY i BMDC/TAg posiadały większą zdolność do zabijania komórek docelowych, niż komórki pochodzące od myszy nieleczonych (ryc. 48 D). Uzupełnienie terapii o wektory LV shIL-10 nie skutkowało dodatkowym zwiększeniem aktywności cytotoksycznej, która utrzymywała się na podobnym poziomie. Natomiast, analiza odsetka komórek CD107a<sup>+</sup> wykazała, że po terapii z udziałem CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 znacznie wzrósł odsetek śledzionowych limfocytów T CD8<sup>+</sup> i komórek NK zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych (ryc. 48 E, F). Takiego efektu nie obserwowano u myszy z grupy CY + BMDC/TAg.

Analizę aktywności komórek śledzionowych uzupełniono o ocenę polaryzacji odpowiedzi przeciwnowotworowej. W tym celu określono poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego T-bet i poziom produkcji IFN- $\gamma$  w limfocytach T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> (ryc. 49 A, C). Dodatkowo, oznaczono także odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup>, które zidentyfikowano na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Wykazano, że wektory LV shIL-10 oraz szczepionki zawierające BMDC/TAg, stosowane w połączeniu z CY, w równym stopniu indukowały aktywację limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> charakteryzujących się zwiększoną ekspresją T-bet i IFN- $\gamma$  (ryc. 49 B, D). Natomiast, najwięcej komórek T-bet<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, zarówno wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> jak i T CD8<sup>+</sup> odnotowano w śledzionach myszy, które otrzymały terapię złożoną z CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10. Choć odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> uległ obniżeniu zarówno w grupach, które otrzymywały wektory lentiwirusowe, jak i tych traktowanych BMDC/TAg, to najmniej tych komórek odnotowano w grupie CY + BMDC/TAg + LV shIL-10 (ryc. 49 E). W tej grupie stosunek odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> typu Th1 (T-bet<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) do odsetka komórek Treg był znacznie wyższy niż u myszy nieleczonych oraz traktowanych CY (ryc. 49 F).



**Ryc. 49. Polaryzacja ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii.** W splenocytach pobranych od myszy, metodą cytometrii przepływowej zbadano poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych T-bet i FoxP3, a także określono poziom IFN- $\gamma$  wewnątrz komórek. Wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> określono odsetek komórek IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> (A, B, C, D). Określono odsetek limfocytów Treg (FoxP3<sup>+</sup>) wśród limfocytów CD4<sup>+</sup> (E). Wyznaczono iloraz odsetka limfocytów Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>) i odsetka limfocytów Treg (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) (F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości uzyskane podczas analizy komórek pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami, dla których  $p < 0,05$ , zostały uznane za istotne statystycznie (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.6.4. Podsumowanie

Po zastosowaniu terapii z udziałem cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10 odnotowano znaczne zahamowanie wzrostu guzów, a efekt terapeutyczny uległ dodatkowej poprawie po uzupełnieniu schematu o okołoguzowe podanie szczepionek zawierających komórki dendrytyczne stymulowane antygenami nowotworowymi.

Chemioimmunoterapia z udziałem cyklofosfamidu, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 powodowała obniżenie odsetków TAM, DC oraz M-MDSC wśród leukocytów naciekających guzy. Natomiast, komórki mieloidalne, które pozostały w guzach charakteryzowały się podwyższonym poziomem ekspresji MHC II. Z uwagi na to, że podobny efekt odnotowano w grupie CY + LV shIL-10, można wnioskować, że był on indukowany przede wszystkim przez podanie wektorów LV shIL-10. Należy jednak podkreślić że, tylko w grupie CY + BMDC/TAg + LV shIL-10 potwierdzono polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1. Dodatkowo, analiza populacji komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych wykazała zwiększony odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK i NKT po zastosowaniu terapii złożonej z CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10. W tej grupie odnotowano również najniższy odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup>, a udział procentowy komórek efektorowych wśród limfocytów Treg był niższy niż w kontroli nieleczonej. Co ważne, po zastosowaniu tej terapii odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów T CD8<sup>+</sup> był wyższy niż w innych grupach

Terapia z udziałem CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 indukowała silną ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową. Restymulowane komórki śledzionowe uzyskane od myszy z tej grupy produkowały znacznie więcej IFN- $\gamma$  niż komórki pobrane od myszy nieleczonych. Dodatkowo wykazywały one wysoką cytotoksyczność związaną z wydzielaniem ziaren cytolitycznych przez komórki NK i limfocyty T CD8<sup>+</sup>. Oznaczenie poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych T-bet i FoxP3 w śledzionowych limfocytach T potwierdziło natomiast, że terapia złożona z CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 indukuje odpowiedź komórkową typu Th1.

## 5. Dyskusja

W ciągu ostatnich lat immunoterapia stała się jedną z najbardziej obiecujących strategii w walce z chorobami nowotworowymi. Jednym z rozwiązań stosowanych we współczesnej immunoterapii jest wykorzystanie komórek dendrytycznych, które jako jedyne spośród komórek układu odpornościowego są zdolne do prezentacji antygenów dziewiczym limfocytom T i aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Zarówno wyniki badań podstawowych, jak i klinicznych potwierdzają niską toksyczność szczepionek zawierających DC oraz ich skuteczność w aktywowaniu odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym. Pomimo to efekty terapeutyczne po zastosowaniu DC wciąż nie są zadowalające. Powodem jest nasilająca się wraz ze wzrostem nowotworu immunosupresja, która zaburza prawidłowe funkcjonowanie komórek układu odpornościowego, w tym DC i limfocytów T aktywowanych w trakcie terapii (van Gulijk i in. 2018). W celu zwiększenia potencjału szczepionek zawierających DC, stosuje się je w kombinacji z czynnikami hamującymi immunosupresję. Należą do nich inhibitory białek supresorowych, takich jak IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF orazIDO, czynniki powodujące eliminację MDSC i limfocytów Treg lub inhibitory punktów kontroli immunologicznej (Saxena i Bhardwaj 2018). Do substancji wspomagających reaktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej zalicza się również niektóre konwencjonalne leki cytostatyczne, udowodniono bowiem, że wybrane chemioterapeutyki stosowane w niskich dawkach mogą selektywnie eliminować komórki supresorowe i wspomagać aktywność przeciwnowotworową komórek efektorowych (Landreneau i in. 2013).

W przedstawionej pracy, określono wpływ redukcji stężenia IL-10 w rosnących podskórnym guzach mysiego raka jelita grubego MC38 na skuteczność terapii z udziałem komórek dendrytycznych i cyklofosfamidu, zastosowanego w dawce immunomodulującej. Najczęściej opisywane metody neutralizacji cytokin opierają się na podawaniu przeciwciał lub innych cząsteczek wiążących pożądane białko. Jednak ich wadą jest niska stabilność i związana z tym konieczność stosowania wysokich dawek oraz wielokrotnych podań terapeutycznego. Interleukina 10, z uwagi na jej właściwości immunosupresyjne, jest opisywana w literaturze jako cytokina o charakterze pronowotworowym. Należy jednak podkreślić, że pełni ona ważną rolę w regulowaniu reakcji odpornościowych w organizmie. Wykazano, że niedobór IL-10 prowadzi do rozwoju schorzeń autoimmunologicznych jelit oraz zaostrzenia objawów reumatoidalnego zapalenia stawów, astmy, stwardnienia rozsianego czy toczenia rumieniowatego układowego (Ng i in. 2013; Glocker i in. 2011). Dlatego można przypuszczać, że długotrwała, ogólnoustrojowa eliminacja tej cytokiny może wywołać reakcje autoimmunologiczne, prowadzące do niszczenia zdrowych tkanek. Głównym założeniem niniejszej pracy było zastosowanie inhibitorów IL-10, które działałyby miejscowo, nie wywołując skutków ubocznych. Z tego powodu w badaniach

wykorzystano wektory lentiwirusowe trzeciej generacji kodujące shRNA skierowane przeciwko IL-10, które po podaniu doguzowym wywoływały redukcję stężenia IL-10 w środowisku nowotworowym.

Jednym z elementów TME, wykazującym dużą wrażliwość na działanie IL-10, są komórki mieloidalne. W związku z tym, w pierwszym etapie badań, określono wpływ wyciszenia ekspresji IL-10 na aktywność komórek dendrytycznych i MDSC w warunkach *in vitro*. Z danych literaturowych wynika, że IL-10, wpływając na obniżenie ekspresji cząsteczek kostymulujących oraz zahamowanie produkcji IL-12, hamuje dojrzewanie DC zmniejszając tym samym ich zdolność do prezentacji antygenów dziewiczym limfocytom T i indukowania odpowiedzi typu Th1 (Steinbrink i in. 1997; Cavani i in. 2000). Z drugiej strony, zaobserwowano, że komórki dendrytyczne inkubowane z przeciwciałami neutralizującymi IL-10 wykazywały zwiększony poziom ekspresji cząsteczek kostymulujących oraz MHC II, a także były zdolne do produkcji IL-12 i TNF- $\alpha$  (Corinti i in. 2001). Z badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy wynika, że wyciszenie ekspresji IL-10 w BMDC za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA skierowane przeciwko IL-10 powodowało podwyższenie poziomu ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na powierzchni tych komórek. BMDC transdukowane wektorami LV shIL-10 charakteryzowały się również podwyższonym poziomem ekspresji MHC II w porównaniu do komórek nietransdukowanych. Należy jednak zaznaczyć, że efekt ten był indukowany przez cząsteczki LV, gdyż podobne zmiany w ekspresji MHC II odnotowano w przypadku BMDC/shN. Opublikowane dotąd wyniki badań wskazują, że wektory lentiwirusowe mogą stymulować komórki dendrytyczne poprzez receptory TLR3 i TLR7, co prowadzi do ich dojrzewania oraz zwiększonej ekspresji cząsteczek kostymulujących i MHC II (Breckpot i in. 2010). Należy również podkreślić, że komórki BMDC/shN charakteryzowały się podwyższonym poziomem ekspresji PD-L1, którego oddziaływanie z receptorem PD-1 może prowadzić do anergii, a nawet apoptozy limfocytów T. Porównując poziomy ekspresji PD-L1 i CD86 można zaobserwować, że BMDC/shN wykazywały wysoką wartość współczynnika PD-L1/CD86, co według Zahorchaka i in. wskazuje na tolerogenne komórki dendrytyczne (Zahorchak i in. 2018). Co ważne, takiej zależności PD-L1 i CD86 nie odnotowano po transdukcji BMDC wektorami LV shIL-10. Aby potwierdzić, że zmiany fenotypowe zachodzące w BMDC pod wpływem transdukcji wektorami LV shIL-10 lub LV shN mają istotny wpływ na zdolność komórek dendrytycznych do aktywacji dziewiczych limfocytów T, określono aktywność cytotoksyczną splenocytów hodowanych w obecności transdukowanych i stymulowanych antygenami nowotworowymi BMDC. Zaobserwowano, że BMDC/shIL-10/TAg indukowały zwiększoną aktywność cytotoksyczną splenocytów wobec komórek MC38, zarówno w porównaniu do nietransdukowanych BMDC/TAg, jak i BMDC/shN/TAg. Limfocyty T CD8<sup>+</sup> stymulowane przez BMDC/shIL-10/TAg charakteryzowały się też podwyższoną zdolnością do uwalniania ziaren cytolytycznych, o czym świadczy obecność markera CD107a na ich powierzchni. Badania,

w których do stymulacji limfocytów T wykorzystano komórki dendrytyczne inkubowane z przeciwciałami wiążącymi receptor dla IL-10 także potwierdzają wpływ inhibitorów szlaku IL-10 na zwiększenie zdolności DC do aktywacji cytotoksycznych komórek efektorowych (Thepmalee i in. 2018).

Ważnym etapem badań było również określenie wpływu wyciszenia IL-10 na aktywność MDSC, które oddziałując na komórki immunokompetentne w TME hamują odpowiedź przeciwnowotworową. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem komórek uzyskanych w trakcie hodowli *ex vivo* mysich komórek pochodzenia szpikowego prowadzonej w obecności r<sub>m</sub> GM-CSF i nadsącza z nad komórek MC38. Wykorzystanie do hodowli podłoża kondycjonującego zawierającego czynniki wytworzone przez komórki nowotworowe w warunkach obniżonego stężenia tlenu, pozwoliło na uzyskanie komórek o charakterystyce zbliżonej do tych obecnych w TME. Podobną metodę pozyskiwania MDSC opracowali Liechtenstein i in., w której komórki prekursorowe izolowane ze szpiku kostnego hodowano w obecności nadsącza z nad komórek nowotworowych transdukowanych do produkcji GM-CSF (Liechtenstein i in. 2014). Metoda ta pozwoliła na uzyskanie dużej liczby komórek o charakterystyce M-MDSC i PMN-MDSC bez konieczności indukowania nowotworu u myszy.

Badania z wykorzystaniem MDSC dotyczyły określenia wpływu wyciszenia ekspresji IL-10 na różnicowanie MDSC oraz na ich aktywność supresorową. Uzyskane wyniki wskazują, że wyciszenie ekspresji IL-10 nie wpływa na różnicowanie MDSC w kierunku dojrzałych komórek dendrytycznych – nie zaobserwowano zwiększenia odsetka komórek CD11c<sup>+</sup> w hodowli, a poziom ekspresji cząsteczek kostymulujących i MHC II charakterystycznych dla dojrzałych komórek prezentujących antygen nie zmieniał się znacząco. Nie obserwowano także różnicowania komórek w kierunku makrofagów, o czym świadczy niski poziom ekspresji markera F4/80. Zaobserwowano natomiast niewielki wzrost ekspresji PD-L1 na powierzchni MDSC/shIL-10, co może być związane ze zwiększoną aktywnością supresorową tych komórek. Aby sprawdzić, czy wyciszenie IL-10 rzeczywiście wpłynęło na aktywność MDSC, określono wpływ MDSC/shIL-10 na proliferację limfocytów T oraz na ich zdolność do produkcji IFN- $\gamma$  i IL-10. Ze względu na to, że M-MDSC i PMN-MDSC, stanowiące dwie odrębne subpopulacje, wykorzystują różne mechanizmy supresji wobec limfocytów T, zdecydowano się na zbadanie aktywności każdej z nich indywidualnie. Zaobserwowano, że limfocyty T proliferowały mniej intensywnie w obecności M-MDSC/shIL-10 niż w hodowlach z komórkami nietransdukowanymi, lub transdukowanymi wektorami kontrolnymi. Ponadto, M-MDSC/shIL-10 obniżały zdolność limfocytów do produkcji IFN- $\gamma$  i IL-10. Natomiast, wyciszenie IL-10 w PMN-MDSC skutkowało zmniejszeniem ich aktywności supresorowej wobec limfocytów T – komórki te dzieliły się częściej, a także wydzielały więcej IFN- $\gamma$ , a mniej IL-10 niż limfocyty hodowane w obecności PMN-MDSC nietransdukowanych lub transdukowanych wektorami LV shN. Zatem, wyciszenie IL-10 spowodowało zupełnie przeciwstawne zmiany w aktywności M-MDSC i PMN-MDSC. W literaturze niewiele jest

doniesień na temat wpływu IL-10 na aktywność MDSC, a pojawiające się publikacje przedstawiają rozbieżne dane. Tanikawa i in. prowadzili badania, w których wykorzystano myszy z nokautem genu IL-10. Zaobserwowali, że podczas rozwoju nowotworu u myszy IL-10<sup>-/-</sup> dochodzi do zwiększonej akumulacji MDSC niż u myszy typu dzikiego, a ponadto, MDSC IL-10<sup>-/-</sup> wykazują zwiększoną aktywność supresorową (Tanikawa i in. 2012). Natomiast, w badaniach prowadzonych przez Nomana i in. wykazano, że supresja warunkowana przez MDSC może być częściowo zniesiona poprzez neutralizację IL-10. Po dodaniu przeciwciał anti-IL-10 do hodowli MDSC i limfocytów T, odnotowano wzrost odsetka komórek CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Noman i in. 2014). Należy podkreślić, że w przedstawionych publikacjach, MDSC były identyfikowane jako CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>, a taka charakterystyka fenotypowa nie umożliwia rozdzielenia dwóch subpopulacji komórek. W świetle wyników opisanych w niniejszej pracy, możliwe jest, że obserwacje dotyczące wpływu IL-10 na aktywność MDSC zależą od proporcji pomiędzy subpopulacjami komórek monocytarnych i granulocytarnych. Jednak, aby potwierdzić to przypuszczenie, konieczne są dalsze badania, które pozwolą na wyjaśnienie wpływu IL-10 na poszczególne mechanizmy wykorzystywane przez MDSC.

Źródłem IL-10 pojawiającej się w mikrośrodowisku nowotworu mogą być DC i MDSC, jak również inne komórki układu odpornościowego, takie jak limfocyty Treg, limfocyty Th2, czy TAM. W niektórych przypadkach IL-10 produkowana jest również bezpośrednio przez komórki nowotworowe (Sato i in. 2011). Z uwagi na to, że komórki mysiego raka jelita grubego MC38 nie produkują IL-10 w warunkach *in vitro*, można przypuszczać, że głównym źródłem tej cytokiny w guzach nowotworowych MC38 są komórki układu odpornościowego. W celu obniżenia stężenia IL-10 w TME w przeprowadzonych badaniach zastosowano wektory lentiwirusowe kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko mRNA dla IL-10. Zaletą użytych wektorów lentiwirusowych jest ich zdolność do transdukcji szerokiego spektrum komórek, zarówno tych proliferujących, jak i znajdujących się w fazie spoczynku (Breckpot i in. 2008). Po doguzowym podaniu wektorów lentiwirusowych mogą one zatem transdukować komórki nowotworowe oraz komórki odpornościowe obecne w TME. Transdukowane komórki mogą proliferować i akumulować się w miejscu iniekcji nawet do trzech tygodni po podskórnym podaniu wektorów (Furmanov i in. 2010). W doświadczeniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, po trzykrotnym doguzowym podaniu wektorów lentiwirusowych odnotowano ekspresję EGFP w komórkach nowotworowych oraz komórkach układu odpornościowego znajdujących się w TME. Najwyższy poziom ekspresji tego białka wykazywały komórki mieloidalne, co świadczy o tym, że spośród komórek znajdujących się w TME, najwięcej transdukowanych komórek należało do tej populacji. W celu sprawdzenia czy sekwencje shRNA dostarczone do komórek za pomocą wektorów LV shIL-10 skutecznie obniżały poziom ekspresji IL-10 w guzach, określono stężenie tej cytokiny w nadsączach z nad hodowli pełnej zawiesiny komórek uzyskanych z 10 mg guza. Choć stężenia odnotowane dla guzów pobranych od myszy traktowanych wektorami LV shIL-10 były

niższe niż w grupie nietraktowanej i traktowanej wektorami LV shN, to różnice nie były istotne statystycznie. Niewielkie zmiany pomiędzy grupami mogły wynikać z wybranej metody oznaczenia – leukocyty, których transdukcja zachodziła z wyższą wydajnością niż komórek CD45<sup>neg</sup>, stanowiły zaledwie 2-5% wszystkich komórek w guzie nowotworowym.

Istotnym aspektem prowadzonych badań było również określenie wpływu wektorów LV shIL-10 na aktywność komórek układu odpornościowego. Wektory lentiwirusowe podawano trzykrotnie według dwóch schematów. Pierwszy z nich zakładał doguzowe iniekcje wektorów LV co dwa dni i zakończenie doświadczenia szóstego dnia od rozpoczęcia badania. Jest to czas, w którym można obserwować rozwijającą się na skutek zastosowania wektorów LV odpowiedź odpornościową, lecz nie powinna jeszcze zachodzić eliminacja transdukowanych komórek. W drugim schemacie, przerwa pomiędzy pierwszym a drugim podaniem wektorów LV została wydłużona do sześciu dni. Celem badania było sprawdzenie, czy powtórne podania wektorów po rozwinięciu odpowiedzi odpornościowej indukowanej pierwszą iniekcją będą również skuteczne w redukcji stężenia IL-10 w TME. Dodatkowo, w ten sposób zaplanowane doświadczenia umożliwiły określenie kinetyki zmian zachodzących w aktywności komórek układu odpornościowego pod wpływem obniżenia stężenia IL-10 w TME. Analizy poziomu ekspresji EGFP w TME oraz stężenia IL-10 w nadsączach znad hodowli komórek guzów pobranych dziesiątego dnia po pierwszym podaniu wektorów LV potwierdziły zasadność stosowania wektorów wyciszających IL-10 w odstępach tygodniowych. Ponadto, z przeprowadzonych badań wynika, że stosowanie wektorów LV shIL-10, zarówno według krótkiego, jak i przedłużonego schematu, wpłynęło na obniżenie poziomu ekspresji MHC II i CD86 na komórkach DC oraz obniżenie ekspresji MHC II na powierzchni komórek M-MDSC naciekających guz nowotworowy. Ponadto, po podaniu wektorów LV shIL-10 odnotowano zwiększony naciek PMN-MDSC. Te obserwacje sugerują, że redukcja stężenia IL-10 nasiliła supresję związaną z aktywnością komórek mieloidalnych znajdujących się w TME. Komórki CD11b<sup>+</sup> wyizolowane z guzów traktowanych wektorami LV shIL-10 rzeczywiście wykazywały zwiększoną aktywność supresorową wobec limfocytów T, jednak tylko, gdy analizę przeprowadzono szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów. Należy podkreślić, że efekt ten był krótkotrwały i dziesiątego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów LV shIL-10 komórki mieloidalne izolowane z guzów nie hamowały proliferacji limfocytów T.

Analiza populacji limfocytów naciekających guzy wykazała zmiany indukowane zarówno miejscową redukcją stężenia IL-10, jak i podaniem wektorów lentiwirusowych. Podwyższony odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK i NKT wśród leukocytów naciekających guzy, odnotowany szóstego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów LV shN może świadczyć o indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej. Pomimo że wektory lentiwirusowe trzeciej generacji są pozbawione wielu białek występujących naturalnie w lentiwirusach, nadal mogą one indukować odpowiedź swoistą wobec antygenów w nich zawartych (Hotblack i in. 2017). Ponadto, wektory



lentiwirusowe stymulują komórki dendrytyczne poprzez receptory TLR3 i TLR7, które rozpoznają jedno- i dwuniciowe RNA przenoszone przez wirusy, zarówno te modyfikowane, jak i występujące naturalnie (Breckpot i in. 2010). Pomimo to po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 reakcja układu odpornościowego była opóźniona – szóstego dnia po rozpoczęciu podań wektorów LV, w tej grupie stwierdzono niższy odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> niż w grupie traktowanej wektorami LV shN. Nie zaobserwowano także zmian w odsetkach komórek NK i NKT w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast, w grupie, która otrzymywała wektory LV shN odnotowano podwyższony odsetek tych komórek świadczący o uruchomieniu mechanizmów odporności wrodzonej. Intensywny naciek limfocytów T CD8<sup>+</sup> w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10 odnotowano dopiero dziesiątego dnia po rozpoczęciu podawania wektorów. Prawdopodobnie, opóźnienie odpowiedzi odpornościowej było związane z obniżonym stopniem dojrzałości komórek dendrytycznych, obserwowanym w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10, co mogło powodować mniej skuteczną prezentację antygenów wirusowych limfocytom T cytotoksycznym. Ponadto, z danych literaturowych wynika, że IL-10 jest niezbędna do utrzymania aktywności CTL po klonalnej ekspansji (Fu i in. 2015). Tę tezę zdaje się potwierdzać obserwacja, że aktywność limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych, już szóstego dnia od rozpoczęcia podawania wektorów LV, była podobnie wysoka niezależnie od rodzaju zastosowanych wektorów. Natomiast, w guzach, gdzie stężenie IL-10 było zredukowane, odnotowano nie tylko mniej limfocytów T CD8<sup>+</sup>, ale także odsetek komórek efektorowych wśród nich był niższy, niż po zastosowaniu wektorów kontrolnych.

Choć immunogenność wektorów lentiwirusowych jest uznawana za wadę tych nośników informacji genetycznej, to odpowiedź odpornościowa uruchomiona przeciwko antygenom wirusowym może być wykorzystana w celu zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowych. W wyniku transdukcji komórek nowotworowych oraz komórek prezentujących antygen znajdujących się w miejscu iniekcji, komórki rozpoczynają syntezę nowych, obcych antygenów, które następnie są prezentowane w kontekście cząsteczek MHC I. Komórki dendrytyczne prezentują te antygeny limfocytom T CD8<sup>+</sup> i pobudzają je do cytotoksyczności wobec komórek, które rozpoznają jako zainfekowane. Może także zachodzić zjawisko prezentacji krzyżowej, podczas której komórki dendrytyczne pochłaniają i przetwarzają egzogenne antygeny pochodzące ze zniszczonych zainfekowanych komórek nowotworowych, które następnie prezentują w kontekście cząsteczek MHC I limfocytom T CD8<sup>+</sup> indukując swoistą odpowiedź przeciwnowotworową (Goold i in. 2011; Hotblack i in. 2017). W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, wykazano, że podawane doguzowo wektory lentiwirusowe indukowały ogólnoustrojową odpowiedź odpornościową. Dziesiątego dnia od rozpoczęcia iniekcji wektorów LV, restymulowane komórki śledzionowe wykazywały podwyższoną zdolność do zabijania komórek MC38, niezależnie od rodzaju zastosowanych wektorów. Natomiast, analiza odsetka komórek CD107a<sup>+</sup> wykazała, że za podwyższoną aktywność cytotoksyczną odpowiadały przede wszystkim komórki NK, które należą do elementów

odpowiedzi wrodzonej. Wśród splenocytów pobranych od myszy traktowanych wektorami LV pojawiły się także limfocyty T CD4<sup>+</sup> o aktywności cytotoksycznej. Takie komórki, nazywane CD4<sup>+</sup> CTL, są identyfikowane podczas infekcji wirusowych i mogą pełnić funkcje analogiczne do klasycznych komórek CD8<sup>+</sup> CTL, z tą różnicą, że rozpoznają antygeny na komórkach docelowych w kontekście cząsteczek MHC II (Takeuchi i Saito 2017). Nie obserwowano natomiast istotnego zwiększenia zdolności limfocytów T CD8<sup>+</sup> do wydzielania ziaren cytotoxicytnych w odpowiedzi na kontakt z komórkami nowotworowymi, co świadczy o tym, że po zastosowaniu wektorów lentiwirusowych nie została pobudzona swoista wobec komórek MC38 odpowiedź zależna od CTL.

Ważny elementem schematu terapeutycznego, który zaproponowano w niniejszej pracy, jest cyklofosfamid. Cytostatyk ten jest jednym z chemioterapeutyków, które stosowane w odpowiedniej dawce wykazują właściwości immunomodulujące i przyczyniają się do wzmocnienia odpowiedzi przeciwnowotworowej indukowanej podczas immunoterapii. W zaprezentowanych doświadczeniach, CY podawano myszom jednokrotnie w dawce 150 mg/kg mc. We wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym laboratorium wykazano, że jednorazowe zastosowanie CY w tej dawce powoduje tylko okresowe zahamowanie wzrostu guzów, ale w połączeniu ze szczepionkami zawierającymi komórki dendrytyczne, wspomaga odnowę odpowiedzi przeciwnowotworowej (Rossowska i in. 2014). Udowodniono bowiem, że cyklofosfamid stosowany w niskich dawkach, powoduje selektywną eliminację limfocytów T regulatorowych, a także indukując immunogenną śmierć komórek nowotworowych przyczynia się jednocześnie do zwiększenia aktywności efektorowych limfocytów T oraz wspomaga powstawanie pamięci immunologicznej (Abu Eid i in. 2016). Analizy przeprowadzone ósmego i dwunastego dnia po podaniu cyklofosfamidu nie wykazały obniżenia odsetka limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> zidentyfikowanych w guzach. Lutsiak i in. wykazali, że cyklofosfamid indukuje apoptozę limfocytów T regulatorowych już 24 godziny po jego aplikacji, przy czym największy ubytek w liczebności tych komórek obserwuje się 3-4 dni później, a po 10 dniach ich poziom powraca do stanu początkowego (Lutsiak i in. 2005). Jest zatem prawdopodobne, że pomiary przeprowadzone ósmego i dwunastego dnia po iniekcji CY nastąpiły w momencie, gdy populacja limfocytów Treg uległa już odnowie. Odnotowano natomiast wpływ cyklofosfamidu na dojrzewanie TAM i DC. Komórki pochodzące z guzów myszy traktowanych cytostatykiem wykazywały zwiększony poziom ekspresji cząsteczek MHC II oraz CD86 w porównaniu do kontroli nietraktowanej. Efekt ten jest najprawdopodobniej związany z gromadzeniem w TME cząsteczek DAMP, uwalnianych przez komórki nowotworowe w trakcie procesu ICD indukowanego przez cyklofosfamid (Vanmeerbeek i in. 2020). Obecność tych cząsteczek w TME wywołuje zwiększony napływ komórek dendrytycznych, które po dotarciu do TME pochłaniają uwolnione antygeny nowotworowe, a następnie migrują do wartowniczych węzłów chłonnych, gdzie prezentują je dziewiczym limfocytom T. Schiavoni i in. wykazali, że cyklofosfamid promuje ekspansję populacji komórek dendrytycznych zdolnych do prezentacji krzyżowej, czego rezultatem

jest pobudzenie swoistych wobec antygenów nowotworowych limfocytów T cytotoksycznych (Schiavoni i in. 2011). Istotnie, w guzach myszy traktowanych CY odnotowano wzrost odsetka limfocytów T CD8<sup>+</sup> oraz w mniejszym stopniu, limfocytów T CD4<sup>+</sup> wśród leukocytów. Zmiany te korelowały również ze zwiększonym odsetkiem komórek efektorowych wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> zidentyfikowanych w wartowniczych węzłach chłonnych. W piśmiennictwie pojawiają się raporty świadczące o tym, że cyklofosfamid może zwiększać akumulację MDSC, co wpływa na zmniejszenie efektu terapeutycznego (Sevko i in. 2013; Mikišková i in. 2014). Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy nie potwierdziły tych obserwacji. Choć dwunastego dnia po podaniu cyklofosfamidu odnotowano wzrost odsetka PMN-MDSC w guzach, to komórki te nie wykazywały wyższej aktywności supresorowej wobec limfocytów T, niż komórki izolowane z guzów kontrolnych.

W wyniku zmian indukowanych przez cyklofosfamid, rozszerzenie schematu podań wektorów LV o jednokrotne podanie cytostatyku powodowało aktywację rozwijającej się w czasie swoistej wobec antygenów nowotworowych odpowiedzi przeciwnowotworowej. W doświadczeniu, w którym zastosowano przedłużony schemat iniekcji wektorów LV, a analizę przeprowadzono dziesiątego dnia po rozpoczęciu podań, obserwowano bowiem wzrost odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> wśród leukocytów naciekających guzy, a także podwyższoną aktywność komórek efektorowych w wartowniczych węzłach chłonnych. Ponadto, śledzionowe limfocyty T CD8<sup>+</sup> wykazywały zwiększoną zdolność do wydzielania ziaren cytotoxicytnych w odpowiedzi na powtórny kontakt z antygenami nowotworowymi, co bezpośrednio wskazuje na uruchomienie swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej po zastosowaniu cyklofosfamidu i wektorów LV. Należy jednak zaznaczyć, że zmiany te nie były zależne od redukcji stężenia IL-10 w guzach nowotworowych, ponieważ były obserwowane zarówno po podaniach wektorów kontrolnych, jak i wyciszających ekspresję IL-10.

Badania nad rolą IL-10 w modulowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej wciąż przynoszą niejednoznaczne wyniki, które sugerują, że kierunek działania tej cytokiny może zależeć od stadium zaawansowania choroby, jak również od statusu immunologicznego gospodarza. Z jednej strony, IL-10 hamuje proces dojrzewania komórek dendrytycznych, co wpływa na skuteczność prezentacji antygenów limfocytom T i aktywacji komórek efektorowych. Z drugiej strony, cytokina ta jest niezbędna do utrzymania aktywności efektorowych CTL po indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej. Ten dualizm działania IL-10 może być odpowiedzią na pytanie, dlaczego terapie z wykorzystaniem inhibitorów IL-10 przynoszą różne rezultaty. W badaniach prowadzonych przez Llopiz i in., wykazano, że blokowanie IL-10 zapewniało efekt terapeutyczny tylko wówczas, gdy tę strategię połączono z podaniem szczepionek zawierających antygeny nowotworowe, które indukowały odpowiedź przeciwnowotworową, ale jednocześnie powodowały zwiększoną ekspresję IL-10 (Llopiz i in. 2015). Z kolei, Kalli i in. wykazali, że zastosowanie przeciwciał anti-IL-10 u myszy, które przed podaniem komórek B16 immunizowano za pomocą

komórek dendrytycznych stymulowanych peptydem gp100, skutkowało całkowitym zahamowaniem rozwoju czerniaka, natomiast zastosowanie tych dwóch elementów w formie monoterapii przynosi jedynie niewielki efekt przeciwnowotworowy (Kalli i in. 2013). Nasze badania wykazały, że neutralizacja IL-10 za pomocą przeciwciał podanych dootrzewnowo przed okołoguzowym wszczepieniem komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi przyczynia się do istotnego zwiększenia aktywności stosowanych szczepionek (Rossowska i in. 2015).

W schematach terapeutycznych przedstawionych w niniejszej pracy zastosowano wektory lentiwirusowe wyciszające ekspresję IL-10, które podano doguzowo dzień przed okołoguzową iniekcją komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi. Szczepionki komórkowe podawano trzykrotnie, w odstępach tygodniowych. Dane literaturowe, a także wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że zastosowane wektory lentiwirusowe indukują odpowiedź przeciwwirusową, przez co już kilka dni po ich podaniu, komórki efektorowe są zdolne do eliminacji transdukowanych komórek (Furmanov i in. 2010). Dlatego też, aby zwiększyć wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach, inokulację wektorów lentiwirusowych powtarzano przed każdym kolejnym podaniem komórek dendrytycznych. W opisanych doświadczeniach zastosowano BMDC, które uprzednio poddano stymulacji za pomocą antygenów nowotworowych w postaci lizatu komórek MC38. Rossowska i in. wykazali, że komórki dendrytyczne poddane takiej stymulacji mają większą zdolność do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych niż komórki niestymulowane, przez co skuteczniej aktywują miejscową odpowiedź przeciwnowotworową (Rossowska i in. 2007). Biorąc pod uwagę, że dojrzałe komórki dendrytyczne poddane działaniu IL-10 charakteryzują się mniejszą zdolnością do migracji, co wykazali Xu i in. (Xu i in. 2017), można przypuszczać, że BMDC/TAg w warunkach obniżonego stężenia IL-10 będą migrować w kierunku wartowniczych węzłów chłonnych i indukować odpowiedź swoistą wobec antygenów nowotworowych jeszcze efektywniej.

Choć w doświadczeniach, w których podania wektorów lentiwirusowych przeprowadzono w krótkim przedziale czasowym nie obserwowano znacznych różnic w odpowiedzi przeciwnowotworowej indukowanej przez wektory LV shIL-10 i LV shN, to zastosowanie schematu zakładającego podania wektorów w odstępach tygodniowych umożliwiło wykazanie zmian zachodzących pod wpływem redukcji stężenia IL-10 w guzach. Terapia oparta na doguzowym podaniu wektorów LV shIL-10 skutkowała bowiem zahamowaniem wzrostu guzów wynoszącym aż 71,5%, w odniesieniu do kontroli nieleczonej. W grupie traktowanej wektorami kontrolnymi odnotowano natomiast TGI wynoszące 40,5%, co świadczy o tym, że to zahamowanie ekspresji IL-10 w mikrośrodowisku nowotworu przyczynia się do spowolnienia wzrostu guzów. W poprzednich naszych badaniach, w których zastosowano przeciwciała anti-IL-10 w celu ogólnoustrojowej neutralizacji tej cytokiny, efekt terapeutyczny odnotowano dopiero wówczas, gdy schemat traktowania uzupełniono o okołoguzowe podanie komórek dendrytycznych

stymulowanych antygenami nowotworowymi (Rossowska i in. 2015). Natomiast, po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 w skojarzeniu z BMDC/TAg nie odnotowano poprawy skuteczności terapii – TGI było porównywalne do tego uzyskanego po monoterapii LV shIL-10. Z tego powodu, protokół terapii rozszerzono o jednokrotne podanie cyklofosfamidu, które przeprowadzono dwa dni przed pierwszą aplikacją wektorów LV shIL-10. Immunomodulujące działanie tego cytostatyku, potwierdzone podczas analiz przeprowadzonych w ramach wcześniej opisanych doświadczeń, wpłynęło na zwiększenie efektu terapeutycznego wektorów LV shIL-10 i BMDC/TAg – zahamowanie wzrostu guzów w odniesieniu do grupy, która otrzymała tylko cyklofosfamid wynosiło aż 87,3% dwa tygodnie po zakończeniu terapii.

W celu określenia zmian w miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej przeprowadzono analizę nacieku leukocytarnego w guzach pobranych od myszy tydzień po zakończeniu immuno-, jak i chemioimmunoterapii. Analiza populacji komórek mieloidalnych wykazała, że terapie z zastosowaniem wektorów LV shIL-10 skutkowały obniżeniem odsetka TAM wśród leukocytów naciekających guzy, co obserwowano również w doświadczeniach przeprowadzonych według krótkich schematów podań wektorów LV. Ta obserwacja jest niezwykle ważna w kontekście skuteczności stosowanej terapii, ponieważ uważa się, że wysoka liczebność tej populacji komórek u pacjentów cierpiących na nowotwory wiąże się ze złym rokowaniem. Jest to związane z tym, że wśród TAM znajdujących się w środowisku nowotworowym dominują makrofagi o polaryzacji M2, które wydzielają duże ilości IL-10 i TGF- $\beta$ , przez co obniżają aktywność komórek NK oraz efektorowych limfocytów Th i CTL, promują rekrutację MDSC i limfocytów Treg, a także hamują zdolność komórek dendrytycznych do wydzielania IL-12 (Zheng i in. 2017). Zmiana polaryzacji TAM w kierunku komórek typu M1, które oddziałując z limfocytami T indukują odpowiedź typu Th1, może przyczynić się do zniesienia supresorowego charakteru mikrośrodowiska i odnowy odpowiedzi przeciwnowotworowej. Po zastosowaniu w immunoterapii wektorów LV shIL-10 i BMDC/TAg w guzach wciąż przeważały makrofagi typu M2. Natomiast, chemioimmunoterapia z udziałem CY, wektorów LV shIL-10 i BMDC/TAg, która przyniosła największy efekt terapeutyczny, wpłynęła na zmianę polaryzacji makrofagów zidentyfikowanych w guzach w kierunku komórek typu M1. Ta terapia powodowała także istotne obniżenie odsetka M-MDSC wśród leukocytów naciekających guzy, czego nie obserwowano po zastosowaniu wektorów LV shIL-10 i BMDC/TAg bez cyklofosfamidu. Ponadto, zarówno po immuno-, jak i chemioimmunoterapii z udziałem wektorów LV shIL-10, odsetek PMN-MDSC był niższy niż ten obserwowany w grupie kontrolnej, co świadczy o tym, że zwiększony naciek tych komórek obserwowany krótko po zastosowaniu wektorów nie utrzymywał się w czasie i nie powodował zahamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej. Możliwe, że komórki te, podobnie jak wykazano w doświadczeniach *in vitro*, pod wpływem zmniejszonej produkcji IL-10 traciły właściwości supresorowe. Nie było jednak możliwości sprawdzenia ich aktywności ze względu na bardzo mały odsetek tych komórek w guzach nowotworowych uzyskanych po terapii. Co więcej, populacje

komórek mieloidalnych zidentyfikowanych w guzach traktowanych wektorami LV shIL-10 charakteryzowały się podwyższonym poziomem ekspresji MHC II na swojej powierzchni. W badaniach przeprowadzonych przez Bogen i in. wykazano, że makrofagi wykazujące wysoki poziom ekspresji cząsteczek MHC II prezentują antygeny nowotworowe limfocytom T CD4<sup>+</sup> pobudzając wydzielanie IFN- $\gamma$ , który wpływa na zwiększenie aktywności cytotoksycznej makrofagów typu M1 wobec komórek nowotworowych (Bogen i in. 2019). Podwyższony poziom ekspresji MHC II na powierzchni komórek dendrytycznych również świadczy o ich zdolności do prezentacji antygenów egzogennych limfocytom T CD4<sup>+</sup>, a poziom ekspresji tej cząsteczki na powierzchni M-MDSC rośnie wraz ze wzrostem ich stopnia zróżnicowania w kierunku populacji TAM (Bronte i in. 2016). Wpływ neutralizacji IL-10 na aktywność endogennych komórek dendrytycznych zaobserwowali Ruffell i in. Wykazali oni, że zablokowanie IL-10 u myszy obarczonych rakiem gruczołu piersiowego poprzez zastosowanie przeciwciał anti-IL-10R powodowało zwiększenie ekspresji IL-12 przez komórki dendrytyczne, czego efektem była aktywacja limfocytów T cytotoksycznych i poprawa skuteczności chemioterapii z udziałem paklitakselu (Ruffell i in. 2014). Podobnie, w niniejszej pracy obok zmian w proporcjach populacji komórek mieloidalnych w TME oraz ekspresji MHC II na ich powierzchni obserwowano również zmiany w udziale procentowym limfocytów. Immunoterapia z udziałem wektorów LV shIL-10 skutkowała podwyższeniem odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>. Z kolei, szczepionki zawierające BMDC/TAg powodowały wzrost odsetków komórek NK i NKT. Jednak, zastosowanie tych składowych w formie terapii skojarzonej nie indukowało zmian na poziomie obserwowanym w monoterapiach. Ponadto, choć w grupie traktowanej BMDC/TAg odnotowano obniżony odsetek limfocytów Treg, to po uzupełnieniu terapii o wektory LV shIL-10 nie obserwowano tego efektu. Natomiast po zastosowaniu chemioimmunoterapii z udziałem CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10, wśród leukocytów infiltrujących guzy stwierdzono najwyższy odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK i NKT, a z drugiej strony odnotowano najniższy odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4<sup>+</sup> w porównaniu do pozostałych grup.

Analiza ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej wykazała, że immuno- oraz chemioimmunoterapia z zastosowaniem wektorów LV shIL-10 indukowała zwiększenie aktywności cytotoksycznej limfocytów T CD8<sup>+</sup> i komórek NK, co obserwowano jako podwyższony odsetek komórek wydzielających ziarna cytolityczne. Efekt ten był jeszcze silniejszy, gdy terapię uzupełniono o BMDC/TAg. Ocena zdolności restymulowanych splenocytów do produkcji cytokin wykazała jednak różnicę pomiędzy polaryzacją odpowiedzi indukowanej przez zastosowane schematy terapeutyczne. Zaobserwowano, że BMDC/TAg, stosowane w skojarzeniu z cyklofosfamidem, wpływały na podwyższenie zdolności do produkcji IFN- $\gamma$  przez splenocyty, a efekt ten był nasilony, gdy terapię uzupełniono o podania wektorów LV shIL-10. Natomiast, zastosowanie BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 w postaci immunoterapii indukowało także zwiększony poziom produkcji IL-10 oraz IL-4, cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi typu

Th2, co nie było obserwowane po zastosowaniu schematu rozszerzonego o podanie cytostatyku. Te obserwacje wskazują, że choć immunoterapia z udziałem BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 pobudza ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową, to uzupełnienie schematu o jednokrotne podanie cyklofosfamidu przyczynia się do powstania odpowiedzi typu Th1, co dodatkowo potwierdzono oceniając poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych T-bet i FoxP3 w śledzionowych limfocytach T. Pojawienie się odpowiedzi typu Th1 może stanowić marker prognostyczny nie tylko podczas badań prowadzonych na modelach mysich nowotworów, ale również u pacjentów onkologicznych. U chorych z rakiem jelita grubego, u których liczba limfocytów Th1 zidentyfikowanych w węzłach chłonnych objętych przerzutami przeważała nad liczbą limfocytów Th2 wykazano wydłużony czas przeżycia ogólnego (Nizri i in. 2016). Tosolini i in. zaobserwowali również, że wydłużony czas przeżycia wolny od choroby u pacjentów poddanych resekcji guza pierwotnego raka jelita grubego był związany z wysoką ekspresją genów charakterystycznych dla limfocytów Th1 lub dla komórek o aktywności cytotoksycznej Z kolei, wysoka ekspresja genów związanych z występowaniem limfocytów Th17 korelowała ze złym rokowaniem i szybką wznową choroby (Tosolini i in. 2011)

Z badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wynika, że zastosowanie w protokole immunoterapii wektorów LV shIL-10 przyczynia się do zwiększenia skuteczności szczepionek BMDC/TAg w indukcji miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od aktywności T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> i komórek NK. Niemniej jednak, terapia ta nie powodowała znacznych zmian w obrębie populacji komórek supresorowych, takich jak M-MDSC, limfocyty Treg i makrofagi typu M2. Rozszerzenie protokołu immunoterapii o jednokrotne podanie immunomodulującej dawki cyklofosfamidu, wpłynęło na znaczną redukcję M-MDSC i limfocytów Treg oraz polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1. Zmiany zachodzące w TME pod wpływem chemioimmunoterapii z udziałem CY, BMDC/TAg i wektorów LV shIL-10 umożliwiły pobudzenie ogólnoustrojowej odpowiedzi typu Th1.

Pomimo zachęcających wyników badań podstawowych, w tym tych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, wprowadzenie schematów terapii przeciwnowotworowych z udziałem wektorów lentiwirusowych, podawanych *in vivo*, do protokołów klinicznych wymaga określenia zasad bezpiecznego użycia tej formy terapii oraz zapewnienia jej selektywności i wydajności. Obecnie wektory lentiwirusowe są już z powodzeniem stosowane do modyfikacji *ex vivo* limfocytów T za pomocą sekwencji kodujących receptory CAR, stosowanych w immunoterapiach przeciwnowotworowych (Milone i O'Doherty 2018). Opracowano również procedury preparacji wektorów LV zgodne z zasadami Dobrej Praktyki Produkcyjnej (ang. *Good Manufacturing Practice*, GMP), dzięki czemu możliwa jest produkcja na dużą skalę wektorów wysokiej jakości (Poorebrahim i in. 2019). Niemniej jednak, przy zastosowaniu wektorów LV do modyfikacji komórek w warunkach *in vivo* napotkać można problemy związane z niską wydajnością transdukcji, koniecznością stosowania tkankowo specyficznych promotorów warunkujących celowaną

ekspresję genów oraz immunogennością (Milone i O'Doherty 2018). Podczas badań podstawowych prowadzonych na modelach zwierzęcych, jak i prób klinicznych, w których określano miejsca integracji wektorów LV z genomem oraz oceniano obecność wektorów zdolnych do replikacji nie stwierdzono nieprawidłowości świadczących o niskim stopniu bezpieczeństwa stosowanych wektorów lentiwirusowych (Olbrich i in. 2017). Aby całkowicie wyeliminować ryzyko występowania mutagenezy insercyjnej, opracowano system wektorów lentiwirusowych nieintegrujących z genomem (Philippe i in. 2006). Choć w wyniku terapii przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy nie obserwowano efektów ubocznych w postaci pogorszenia stanu zdrowia zwierząt, to wykazano, że stosowane wektory LV indukowały przeciwwirusową odpowiedź odpornościową. Dalsze modyfikacje systemu wektorów lentiwirusowych mające na celu obniżenie ich immunogenności oraz zwiększenie wydajności transdukcji są niezbędne, aby stały się one w pełni bezpiecznym oraz dobrze tolerowanym narzędziem do dostarczania genów w warunkach *in vivo*. Ponadto, monitorowanie stanu zdrowia pacjentów, którzy zostali poddani terapii z udziałem komórek modyfikowanych *ex vivo*, przyczyni się do poznania długofalowego wpływu zmian wprowadzanych za pośrednictwem wektorów lentiwirusowych.



---

## Wnioski

Redukcja stężenia IL-10 w mikrośrodowisku nowotworowym, uzyskana poprzez doguzowe podanie wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję tej cytokiny, powoduje korzystne zmiany w TME, które sprzyjają reaktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej. Zastosowanie wektorów LV shIL-10 nie jest jednak wystarczające, aby w sposób znaczący zwiększyć skuteczność terapii na bazie komórek dendrytycznych. Dopiero uzupełnienie immunoterapii z udziałem wektorów LV shIL-10 i BMDC/TA<sub>g</sub> o jednokrotne podanie immunomodulującej dawki cyklofosfamidu powoduje znaczne zmniejszenie udziału procentowego komórek supresorowych w TME i polaryzację makrofagów w kierunku M1. Zniesienie supresji umożliwia szczepionkowym komórkom dendrytycznym indukcję miejscowej i ogólnoustrojowej swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej typu Th1, czego rezultatem jest długotrwały efekt terapeutyczny w postaci zahamowania wzrostu guzów.

# Spis rycin i tabel

## Ryciny

- Ryc. 1.     Udział komórek układu odpornościowego w procesie immunoedycji
- Ryc. 2.     Immunosupresorowy i immunostymulujący wpływ IL-10 na wybrane populacje komórek mikrośrodowiska nowotworu
- Ryc. 3.     Aktywacja limfocytów T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, komórek NK i NKT przez komórki dendrytyczne
- Ryc. 4.     Strategie terapeutyczne mające na celu redukcję aktywności supresorowej IL-10 w TME, stosowane w badaniach przedklinicznych
- Ryc. 5.     Schemat przedstawiający wykorzystanie komórek pakujących do produkcji wektorów lentiwirusowych trzeciej generacji kodujących shRNA wyciszające ekspresję genu w komórce docelowej
- Ryc. 6.     Mapa plazmidu transferowego pGLV3/H1/GFP+puro wykorzystanego w systemie lentiwirusowymi trzeciej generacji do ekspresji shRNA
- Ryc. 7.     Schematy doświadczeń *in vivo* mających na celu określenie efektu podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 stosowanych samodzielnie lub w połączeniu z cyklofosfamidem
- Ryc. 8.     Schematy doświadczeń *in vivo* mających na celu określenie efektu skojarzonej terapii złożonej z wektorów wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych stosowanych jako immunoterapia lub chemioimmunoterapia w połączeniu z cyklofosfamidem
- Ryc. 9.     Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w BMDC i MDSC transdukowanych w warunkach *in vitro* wektorami kodującymi trzy różne sekwencje shRNA dla IL-10 (shIL-10-1, shIL-10-2, shIL-10-3)
- Ryc. 10.    Charakterystyka fenotypowa BMDC transdukowanych wektorami kodującymi shRNA dla IL-10
- Ryc. 11.    Charakterystyka fenotypowa BMDC z wyciszoną ekspresją IL-10 stymulowanych antygenami nowotworowymi
- Ryc. 12.    Zdolność BMDC z wyciszoną ekspresją IL-10 do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych
- Ryc. 13.    Charakterystyka fenotypowa mysich komórek pochodzenia szpikowego
- Ryc. 14.    Ocena poziomu zróżnicowania MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10
- Ryc. 15.    Intensywność proliferacji limfocytów T w obecności MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10
- Ryc. 16.    Produkcja cytokin przez splenocyty hodowane w obecności MDSC z wyciszoną ekspresją IL-10

- Ryc. 17. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych
- Ryc. 18. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38
- Ryc. 19. Ocena nacieku komórek mieloidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 6-go lub 10-go dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 20. Schemat analizy proliferacji limfocytów T w hodowli mieszanej z komórkami CD11b<sup>+</sup> wyizolowanymi z guzów MC38
- Ryc. 21. Aktywność supresorowa komórek mieloidalnych izolowanych z guzów MC38 pobranych od myszy 6-go lub 10-go dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 22. Aktywność komórek mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe określona na podstawie poziomu ekspresji IRF8, Ki67, produkcji ROS oraz polaryzacji makrofagów
- Ryc. 23. Schemat analizy komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38
- Ryc. 24. Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 6-go lub 10-go dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 25. Schemat analizy limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych
- Ryc. 26. Ocena aktywności limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych przeprowadzona 6-go lub 10-go dnia po rozpoczęciu podawania wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 27. Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych po podaniach wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 28. Wydajność wyciszenia ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych
- Ryc. 29. Ocena nacieku komórek mieloidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 8-go lub 12-go dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 30. Aktywność supresorowa komórek mieloidalnych izolowanych z guzów MC38 pobranych od myszy 8-go lub 12-go dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 31. Aktywność komórek mieloidalnych naciekających guzy nowotworowe określona na podstawie poziomu ekspresji IRF8, Ki67, produkcji ROS oraz polaryzacji makrofagów
- Ryc. 32. Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach MC38 przeprowadzona 8-go lub 12-go dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 33. Ocena aktywności limfocytów w wartowniczych węzłach chłonnych przeprowadzona 8-go lub 12-go dnia od rozpoczęcia podawania cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10
- Ryc. 34. Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy po podaniu cyklofosfamidu i wektorów wyciszających ekspresję IL-10

- Ryc. 35. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii z udziałem wektorów wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi
- Ryc. 36. Udział procentowy subpopulacji komórek mieloidalnych wśród leukocytów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii
- Ryc. 37. Polaryzacja makrofagów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii
- Ryc. 38. Ekspresja MHC II na powierzchni subpopulacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii
- Ryc. 39. Udział procentowy komórek limfoidalnych wśród leukocytów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych immunoterapii
- Ryc. 40. Udział procentowy limfocytów Treg oraz limfocytów efektorowych w guzach MC38 pobranych od myszy poddanych immunoterapii
- Ryc. 41. Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii
- Ryc. 42. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu, wektorów wyciszających ekspresję IL-10 i komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi
- Ryc. 43. Udział procentowy subpopulacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii
- Ryc. 44. Polaryzacja makrofagów naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii
- Ryc. 45. Ekspresja MHC II na powierzchni subpopulacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii
- Ryc. 46. Udział procentowy komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38 pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii
- Ryc. 47. Udział procentowy limfocytów Treg oraz limfocytów efektorowych w guzach MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii
- Ryc. 48. Aktywność restymulowanych komórek śledzionowych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii
- Ryc. 49. Polaryzacja ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

## Tabele

- Tabela 1. Charakterystyka stosowanych linii komórkowych
- Tabela 2. Plazmidy wchodzące w skład systemu lentiwirusowego trzeciej generacji
- Tabela 3. Sekwencje docelowe shRNA wklonowanych do plazmidu pGLV3/H1/GFP+puro

- Tabela 4. Sondy do oznaczeń ekspresji genów metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym
- Tabela 5. Zestawy ELISA wykorzystane do oznaczenia stężeń wybranych cytokin
- Tabela 6. Przeciwciała monoklonalne stosowane do oznaczeń cytometrycznych oraz separacji magnetycznej
- Tabela 7. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami zastosowane w poszczególnych doświadczeniach
- Tabela 8. Charakterystyka fenotypowa populacji komórek identyfikowanych podczas analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej
- Tabela 9. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami zastosowane do oznaczeń komórek znajdujących się w węzłach chłonnych pobranych od myszy podczas poszczególnych doświadczeń

---

## Piśmiennictwo

Abu Eid R., Razavi G.S.E., Mkrtychyan M., Janik J., Khleif S.N.: Old-School Chemotherapy in Immunotherapeutic Combination in Cancer, A Low-cost Drug Repurposed. *Cancer Immunol Res*, 2016; 4: 377–382

Ahn Y.H., Hong S.O., Kim J.H., Noh K.H., Song K.H., Lee Y.H., Jeon J.H., Kim D.W., Seo J.H., Kim T.W.: The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor- $\beta$  receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8(+) T cell immunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015; 181: 164–178

Anger N., Rossowska J.: Myeloid-derived suppressor cells as a target for anticancer therapy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2018; 72: 1179–1198

Anguille S., Smits E.L., Lion E., van Tendeloo V.F., Berneman Z.N.: Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet Oncology*, 2014; 15: e257–e267

Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A., Obeid M., Ortiz C., Criollo A., Mignot G., Maiuri M.C., Ullrich E., Saulnier P., Yang H., Amigorena S., Ryffel B., Barrat F.J., Saftig P. i in.: Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.*, 2007; 13: 1050–1059

Baginska J., Viry E., Paggetti J., Medves S., Berchem G., Moussay E., Janji B.: The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity. *Front Immunol*, 2013; 4: 490

Berezhnoy A., Stewart C.A., Mcnamara II J.O., Thiel W., Giangrande P., Trinchieri G., Gilboa E.: Isolation and Optimization of Murine IL-10 Receptor Blocking Oligonucleotide Aptamers Using High-throughput Sequencing. *Mol Ther*, 2012; 20: 1242–1250

Biswas S.K., Mantovani A.: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.*, 2010; 11: 889–896

Bofill-De Ros X., Gu S.: Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*, 2016; 103: 157–166

Bogen B., Fauskanger M., Haabeth O.A., Tveita A.: CD4+ T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2019; 68: 1865–1873

Boshoff C., Weiss R.: AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 373–382

Breckpot K., Emeagi P.U., Thielemans K.: Lentiviral vectors for anti-tumor immunotherapy. *Curr Gene Ther*, 2008; 8: 438–448

Breckpot K., Escors D., Arce F., Lopes L., Karwacz K., Van Lint S., Keyaerts M., Collins M.: HIV-1 Lentiviral Vector Immunogenicity Is Mediated by Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR7. *J Virol*, 2010; 84: 5627–5636

Bronte V., Brandau S., Chen S.H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I.: Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*, 2016; 7: 12150

- Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., Yee J.K.: Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90: 8033–8037
- Busse D., de la Rosa M., Hobiger K., Thurley K., Flossdorf M., Scheffold A., Höfer T.: Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010; 107: 3058–3063
- Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A., Song J., Collins L.I., Piwnica-Worms D.R., Ley T.J.: Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 2007; 27: 635–646
- Carthew R.W., Sontheimer E.J.: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009; 136: 642–655
- Cavani A., Nasorri F., Prezzi C., Sebastiani S., Albanesi C., Girolomoni G.: Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J. Invest. Dermatol.*, 2000; 114: 295–302
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bouso P., Deist F.L., Fischer A.: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000; 288: 669–672
- Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N.: Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 2014; 6: 1670–1690
- Chen X., Mangala L.S., Rodriguez-Aguayo C., Kong X., Lopez-Berestein G., Sood A.K.: RNA Interference–Based Therapy and Its Delivery Systems. *Cancer Metastasis Rev*, 2018; 37: 107–124
- Constantino J., Gomes C., Falcão A., Cruz M.T., Neves B.M.: Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res*, 2016; 168: 74–95
- Conti P., Kempuraj D., Kandere K., Di Gioacchino M., Barbacane R.C., Castellani M.L., Felaco M., Boucher W., Letourneau R., Theoharides T.C.: IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol. Lett.*, 2003; 86: 123–129
- Corinti S., Albanesi C., la Sala A., Pastore S., Girolomoni G.: Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.*, 2001; 166: 4312–4318
- Corzo C.A., Cotter M.J., Cheng P., Cheng F., Kusmartsev S., Sotomayor E., Padhya T., McCaffrey T.V., McCaffrey J.C., Gabrilovich D.I.: Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.*, 2009; 182: 5693–5701
- Daurkin I., Eruslanov E., Stoffs T., Perrin G.Q., Algood C., Gilbert S.M., Rosser C.J., Su L.M., Vieweg J., Kusmartsev S.: Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer Res.*, 2011; 71: 6400–6409
- Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H.J., Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A.: Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 2010; 464: 1067–1070
- De Sanctis F., Sandri S., Ferrarini G., Pagliarello I., Sartoris S., Ugel S., Marigo I., Molon B., Bronte V.: The Emerging Immunological Role of Post-Translational Modifications by Reactive Nitrogen Species in Cancer Microenvironment. *Front Immunol*, 2014; 5: 69

- Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi M.G., Biagiotti R., Romagnani S.: Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.*, 1993; 150: 353–360
- Dennis K.L., Blatner N.R., Gounari F., Khazaie K.: Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol*, 2013; 25: 637–645
- Desfarges S., Ciuffi A.: Retroviral Integration Site Selection. *Viruses*, 2010; 2: 111–130
- Donnelly R.P., Dickensheets H., Finbloom D.S.: The Interleukin-10 Signal Transduction Pathway and Regulation of Gene Expression in Mononuclear Phagocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1999; 19: 563–573
- Dustin M.L.: The immunological synapse. *Cancer Immunol Res*, 2014; 2: 1023–1033
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001; 411: 494–498
- Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C., Wasiuk A., Guo Y., Noelle R.J.: Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.*, 2009; 229: 152–172
- Emadi A., Jones R.J., Brodsky R.A.: Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009; 6: 638–647
- Emmerich J., Mumm J.B., Chan I.H., LaFace D., Truong H., McClanahan T., Gorman D.M., Oft M.: IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8+ T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. *Cancer Res*, 2012; 72: 3570–3581
- Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W.: Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, 2010; 79: 351–379
- Ferlazzo G., Morandi B.: Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol*, 2014; 5: 159
- Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R.: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 1989; 170: 2081–2095
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806–811
- Francisco L.M., Salinas V.H., Brown K.E., Vanguri V.K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Sharpe A.H.: PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2009; 206: 3015–3029
- Fu C., Liang X., Cui W., Ober-Blöbaum J.L., Vazzana J., Shrikant P.A., Lee K.P., Clausen B.E., Mellman I., Jiang A.:  $\beta$ -Catenin in dendritic cells exerts opposite functions in cross-priming and maintenance of CD8+ T cells through regulation of IL-10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2015; 112: 2823–2828
- Fujii S., Shimizu K., Shimizu T., Lotze M.T.: Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ. *Blood*, 2001; 98: 2143–2151



Furmanov K., Elnekave M., Lehmann D., Clausen B.E., Kotton D.N., Hovav A.H.: The role of skin-derived dendritic cells in CD8<sup>+</sup> T cell priming following immunization with lentivectors. *J. Immunol.*, 2010; 184: 4889–4897

Galluzzi L., Vacchelli E., Bravo-San Pedro J.M., Buqué A., Senovilla L., Baracco E.E., Bloy N., Castoldi F., Abastado J.P., Agostinis P., Apte R.N., Aranda F., Ayyoub M., Beckhove P., Blay J.Y. i in.: Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 2014; 5: 12472–12508

Galvin K.C., Dyck L., Marshall N.A., Stefanska A.M., Walsh K.P., Moran B., Higgins S.C., Dungan L.S., Mills K.H.G.: Blocking retinoic acid receptor- $\alpha$  enhances the efficacy of a dendritic cell vaccine against tumours by suppressing the induction of regulatory T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013; 62: 1273–1282

Gardner A., Ruffell B.: Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.*, 2016; 37: 855–865

Ge Y., Domschke C., Stoiber N., Schott S., Heil J., Rom J., Blumenstein M., Thum J., Sohn C., Schneeweiss A., Beckhove P., Schuetz F.: Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012; 61: 353–362

Gerosa F., Baldani-Guerra B., Nisii C., Marchesini V., Carra G., Trinchieri G.: Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *J Exp Med*, 2002; 195: 327–333

Ghiringhelli F., Menard C., Puig P.E., Ladoire S., Roux S., Martin F., Solary E., Le Cesne A., Zitvogel L., Chauffert B.: Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007; 56: 641–648

Giovarelli M., Musiani P., Modesti A., Dellabona P., Casorati G., Allione A., Consalvo M., Cavallo F., di Pierro F., De Giovanni C.: Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *J. Immunol.*, 1995; 155: 3112–3123

Glocker E.O., Kotlarz D., Klein C., Shah N., Grimbacher B.: IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011; 1246: 102–107

Goold H.D., Escors D., Conlan T.J., Chakraverty R., Bennett C.L.: Conventional dendritic cells are required for the activation of helper-dependent CD8 T cell responses to a model antigen after cutaneous vaccination with lentiviral vectors. *J. Immunol.*, 2011; 186: 4565–4572

Guéry L., Hugues S.: Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int*, 2015; 2015: 314620

van Gulijk M., Dammeijer F., Aerts J.G.J.V., Vroman H.: Combination Strategies to Optimize Efficacy of Dendritic Cell-Based Immunotherapy. *Front Immunol*, 2018; 9: 2759

Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., i in.: LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003; 302: 415–419

Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57–70

- Hanahan D., Coussens L.M.: Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012; 21: 309–322
- Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646–674
- Hanson E.M., Clements V.K., Sinha P., Ilkovitch D., Ostrand-Rosenberg S.: Myeloid-Derived Suppressor Cells Down-Regulate L-Selectin Expression on CD4+ and CD8+ T Cells. *J Immunol*, 2009; 183: 937–94
- Hargadon K.M.: Dysregulation of TGF $\beta$ 1 Activity in Cancer and Its Influence on the Quality of Anti-Tumor Immunity. *J Clin Med*, 2016; 5: 76
- Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R.J.: Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.*, 1994; 180: 631–640
- Howe S.J., Mansour M.R., Schwarzwaelder K., Bartholomae C., Hubank M., Kempinski H., Brugman M.H., Pike-Overzet K., Chatters S.J., de Ridder D., Gilmour K.C., Adams S., Thornhill S.I., Parsley K.L., Staal F.J.T. i in.: Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 3143–3150
- Hotblack A., Seshadri S., Zhang L., Hamrang-Yousefi S., Chakraverty R., Escors D., Bennett C.L.: Dendritic Cells Cross-Present Immunogenic Lentivector-Encoded Antigen from Transduced Cells to Prime Functional T Cell Immunity. *Mol. Ther.*, 2017; 25: 504–511
- Jarnicki A.G., Conroy H., Brereton C., Donnelly G., Toomey D., Walsh K., Sweeney C., Leavy O., Fletcher J., Lavelle E.C., Dunne P., Mills K.H.G.: Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J. Immunol.*, 2008; 180: 3797–3806
- Kalli F., Machiorlatti R., Battaglia F., Parodi A., Conteduca G., Ferrera F., Proietti M., Tardito S., Sanguineti M., Millo E., Fenoglio D., De Palma R., Inghirami G., Filaci G.: Comparative analysis of cancer vaccine settings for the selection of an effective protocol in mice. *J Transl Med*, 2013; 11: 120
- Kantoff P.W., Higano C.S., Shore N.D., Berger E.R., Small E.J., Penson D.F., Redfern C.H., Ferrari A.C., Dreicer R., Sims R.B., Xu Y., Frohlich M.W., Schellhammer P.F., IMPACT Study Investigators: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 363: 411–422
- Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D.: Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998; 95: 7556–7561
- Keller C.W., Freigang S., Lünemann J.D.: Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol*, 2017; 8: 570
- Khong H.T., Restifo N.P.: Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 999–1005
- Kim J.H., Kang T.H., Noh K.H., Bae H.C., Ahn Y.H., Lee Y.H., Choi E.Y., Chun K.H., Lee S.J., Kim T.W.: Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011; 165: 180–189

- Kim R., Emi M., Tanabe K.: Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007; 121: 1–14
- Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B., Zerafa N., Rodig S.J., Old L.J., Smyth M.J., Schreiber R.D.: Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 2007; 450: 903–907
- Koppelman B., Neefjes J.J., de Vries J.E., de Waal Malefyt R.: Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha/beta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity*, 1997; 7: 861–871
- Krneta T., Gillgrass A., Poznanski S., Chew M., Lee A.J., Kolb M., Ashkar A.A.: M2-polarized and tumor-associated macrophages alter NK cell phenotype and function in a contact-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.*, 2017; 101: 285–295
- Kundu N., Beaty T.L., Jackson M.J., Fulton A.M.: Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996; 88: 536–541
- Kurte M., López M., Aguirre A., Escobar A., Aguillón J.C., Charo J., Larsen C.G., Kiessling R., Salazar-Onfray F.: A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J. Immunol.*, 2004; 173: 1731–1737
- Lakins M.A., Ghorani E., Munir H., Martins C.P., Shields J.D.: Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells. *Nat Commun*, 2018; 9: 948
- Lamichhane P., Karyampudi L., Shreeder B., Krempsi J., Bahr D., Daum J., Kalli K.R., Goode E.L., Block M.S., Cannon M.J., Knutson K.L.: IL-10 release upon PD-1 blockade sustains immunosuppression in ovarian cancer. *Cancer Res*, 2017; 77: 6667–6678
- Landau N.R., Page K.A., Littman D.R.: Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J. Virol.*, 1991; 65: 162–169
- Landreneau J.P., Shurin M.R., Agassandian M.V., Keskinov A.A., Ma Y., Shurin G.V.: Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenviron*, 2013; 8: 57–64
- von Lanzanauer S.H., Wolk K., Höflich C., Kunz S., Grünberg B.H., Döcke W.D., Reineke U., Asadullah K., Sterry W., Volk H.D., Sabat R.: Interleukin-10 receptor-1 expression in monocyte-derived antigen-presenting cell populations: dendritic cells partially escape from IL-10's inhibitory mechanisms. *Genes & Immunity*, 2015; 16: 8–14
- Lazarevic V., Glimcher L.H., Lord G.M.: T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2013; 13: 777–789
- Lechner M.G., Russell S.M., Bass R.S., Epstein A.L.: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy*, 2011; 3: 1317–1340
- Lesokhin A.M., Hohl T.M., Kitano S., Cortez C., Hirschhorn-Cymerman D., Avogadri F., Rizzuto G.A., Lazarus J.J., Pamer E.G., Houghton A.N., Merghoub T., Wolchok J.D.: Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res.*, 2012; 72: 876–886
- Liechtenstein T., Perez-Janices N., Escors D.: Lentiviral Vectors for Cancer Immunotherapy and Clinical Applications. *Cancers (Basel)*, 2013; 5: 815–837

- Liechtenstein T., Perez-Janices N., Gato M., Caliendo F., Kochan G., Blanco-Luquin I., Van der Jeught K., Arce F., Guerrero-Setas D., Fernandez-Irigoyen J., Santamaria E., Breckpot K., Escors D.: A highly efficient tumor-infiltrating MDSC differentiation system for discovery of anti-neoplastic targets, which circumvents the need for tumor establishment in mice. *Oncotarget*, 2014; 5: 7843–7857
- Llopiz D., Aranda F., Díaz-Valdés N., Ruiz M., Infante S., Belsúe V., Lasarte J.J., Sarobe P.: Vaccine-induced but not tumor-derived Interleukin-10 dictates the efficacy of Interleukin-10 blockade in therapeutic vaccination. *Oncoimmunology*, 2015; 5: e1075113
- Llopiz D., Ruiz M., Infante S., Villanueva L., Silva L., Hervas-Stubbs S., Alignani D., Guruceaga E., Lasarte J.J., Sarobe P.: IL-10 expression defines an immunosuppressive dendritic cell population induced by antitumor therapeutic vaccination. *Oncotarget*, 2016; 8: 2659–2671
- Llopiz D., Ruiz M., Silva L., Sarobe P.: Enhancement of Antitumor Vaccination by Targeting Dendritic Cell-Related IL-10. *Front Immunol*, 2018; 9: 1923
- Lutsiak M.E.C., Semnani R.T., De Pascalis R., Kashmiri S.V.S., Schlom J., Sabzevari H.: Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*, 2005; 105: 2862–2868
- Ma X., Yan W., Zheng H., Du Q., Zhang L., Ban Y., Li N., Wei F.: Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res*, 2015; 4: 1465
- Manjunath N., Haoquan W., Sandesh S., Premlata S.: Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009; 61: 732–745
- Mansoori B., Mohammadi A., Jang S.S., Baradaran B.: Mechanisms of immune system activation in mammals by small interfering RNA (siRNA). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2016; 44: 1589–1596
- Marchi L.H.L., Paschoalin T., Travassos L.R., Rodrigues E.G.: Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon- $\gamma$ -dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. *Cancer Gene Ther.*, 2011; 18: 110–122
- Martin-Orozco N., Muranski P., Chung Y., Yang X.O., Yamazaki T., Lu S., Hwu P., Restifo N.P., Overwijk W.W., Dong C.: T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, 2009; 31: 787–798
- Mayordomo J.I., Zorina T., Storkus W.J., Zitvogel L., Garcia-Prats M.D., DeLeo A.B., Lotze M.T.: Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells*, 1997; 15: 94–103
- Mellman I.: Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*, 2013; 1: 145–149
- Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A.: The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol*, 2013; 31: 563–604
- Mikyšková R., Indrová M., Vlková V., Bieblová J., Šimová J., Paračková Z., Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Reiniš M.: DNA demethylating agent 5-azacytidine inhibits myeloid-derived suppressor cells induced by tumor growth and cyclophosphamide treatment. *J. Leukoc. Biol.*, 2014; 95: 743–753
- Milone M.C., O’Doherty U.: Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 2018; 32: 1529–1541

- Mittal S.K., Roche P.A.: Suppression of Antigen Presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol*, 2015; 34: 22–27
- Mocellin S., Panelli M., Wang E., Rossi C.R., Pilati P., Nitti D., Lise M., Marincola F.M.: IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes Immun.*, 2004; 5: 621–630
- Mondanelli G., Ugel S., Grohmann U., Bronte V.: The immune regulation in cancer by the amino acid metabolizing enzymes ARG and IDO. *Curr Opin Pharmacol*, 2017; 35: 30–39
- Moretta A.: Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 957–964
- Mukherji B., Chakraborty N.G., Yamasaki S., Okino T., Yamase H., Sporn J.R., Kurtzman S.K., Ergin M.T., Ozols J., Meehan J.: Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995; 92: 8078–8082
- Mumm J.B., Emmerich J., Zhang X., Chan I., Wu L., Mauze S., Blaisdell S., Basham B., Dai J., Grein J., Sheppard C., Hong K., Cutler C., Turner S., LaFace D., i in.: IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*, 2011; 20: 781–796
- Munn D.H., Sharma M.D., Baban B., Harding H.P., Zhang Y., Ron D., Mellor A.L.: GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, 2005; 22: 633–642
- Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D.L., Schneck J., Gabrilovich D.I.: Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8 $^+$  T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.*, 2007; 13: 828–835
- Ng T.H.S., Britton G.J., Hill E.V., Verhagen J., Burton B.R., Wraith D.C.: Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Front Immunol*, 2013; 4: 129
- Nizri E., Greenman-Maaravi N., Bar-David S., Ben-Yehuda A., Weiner G., Lahat G., Klausner J.: Analysis of histological and immunological parameters of metastatic lymph nodes from colon cancer patients reveals that T-helper 1 type immune response is associated with improved overall survival. *Medicine (Baltimore)*, 2016; 95: e5340
- Nizzoli G., Larghi P., Paroni M., Crosti M.C., Moro M., Neddermann P., Caprioli F., Pagni M., Francesco R.D., Abrignani S., Geginat J.: IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8 $^+$  memory T cells and, when produced by CD1c $^+$  DCs, shapes naive CD8 $^+$  T-cell priming. *European Journal of Immunology*, 2016; 46: 1622–1632
- Noman M.Z., Desantis G., Janji B., Hasmim M., Karray S., Dessen P., Bronte V., Chouaib S.: PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.*, 2014; 211: 781–790
- Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J.L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., M $\acute{e}$ tivier D., Larochette N., van Endert P., Ciccocanti F., Piacentini M. i in.: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.*, 2007; 13: 54–61
- Olbrich H., Slabik C., Stripecke R.: Reconstructing the immune system with lentiviral vectors. *Virus Genes*, 2017; 53: 723–732

- Opzoomer J.W., Sosnowska D., Anstee J.E., Spicer J.F., Arnold J.N.: Cytotoxic Chemotherapy as an Immune Stimulus: A Molecular Perspective on Turning Up the Immunological Heat on Cancer. *Front Immunol*, 2019; 10: 1654
- Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S.: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002; 16: 948–958
- Page K.A., Landau N.R., Littman D.R.: Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J Virol*, 1990; 64: 5270–5276
- Pajtasz-Piasecka E., Szyda A., Rossowska J., Krawczenko A., Indrová M., Grabarczyk P., Wysocki P., Mackiewicz A., Duś D.: Loss of tumorigenicity of murine colon carcinoma MC38/0 cell line after transduction with a retroviral vector carrying murine IL-12 genes. *Folia Biol. (Praha)*, 2004; 50: 7–14
- Paluskievicz C.M., Cao X., Abdi R., Zheng P., Liu Y., Bromberg J.S.: T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 2019; 10: 2453
- Peterson R.A.: Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*, 2012; 40: 186–204
- Petty A.J., Yang Y.: Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 2017; 9: 289–302
- Philippe S., Sarkis C., Barkats M., Mammeri H., Ladroue C., Petit C., Mallet J., Serguera C.: Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006; 103: 17684–17689
- Piller S.C., Caly L., Jans D.A.: Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets*, 2003; 4: 409–429
- Pluta K., Kacprzak M.M.: Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim. Pol.*, 2009; 56: 531–595
- Poorebrahim M., Sadeghi S., Fakhr E., Abazari M.F., Poortahmasebi V., Kheirollahi A., Askari H., Rajabzadeh A., Rastegarpanah M., Linē A., Cid-Arregui A.: Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2019; 56: 393–419
- Radojic V., Bezak K.B., Skarica M., Pletneva M.A., Yoshimura K., Schulick R.D., Luznik L.: Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunol Immunother*, 2010; 59: 137–148
- Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A.H., Piazuelo M.B., Delgado A., Correa P., Brayer J., Sotomayor E.M., Antonia S., Ochoa J.B., Ochoa A.C.: Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5839–5849
- Rossowska J., Anger N., Kicielińska J., Pajtasz-Piasecka E., Bielawska-Pohl A., Wojas-Turek J., Duś D.: Temporary elimination of IL-10 enhanced the effectiveness of cyclophosphamide and BMDC-based therapy by decrease of the suppressor activity of MDSCs and activation of antitumour immune response. *Immunobiology*, 2015; 220: 389–398

- Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Anger N., Wojas-Turek J., Kicielińska J., Piasecki E., Duś D.: Cyclophosphamide and IL-12-transduced DCs enhance the antitumor activity of tumor antigen-stimulated DCs and reduce Tregs and MDSCs number. *J. Immunother.*, 2014; 37: 427–439
- Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Szyda A., Zietara N., Duś D.: Tissue localization of tumor antigen-loaded mouse dendritic cells applied as an anti-tumor vaccine and their influence on immune response. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2007; 45: 349–355
- Rouas-Freiss N., Moreau P., LeMaout J., Carosella E.D.: The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*, 2014; 2014: 359748
- Routy J.P., Routy B., Graziani G.M., Mehraj V.: The Kynurenine Pathway Is a Double-Edged Sword in Immune-Privileged Sites and in Cancer: Implications for Immunotherapy. *Int J Tryptophan Res*, 2016; 9: 67–77
- Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V., Rosenbusch A., Ho C.M.T., Pryer N., Daniel D., Hwang E.S., Rugo H.S., Coussens L.M.: Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, 2014; 26: 623–637
- Sabado R.L., Balan S., Bhardwaj N.: Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.*, 2017; 27: 74–95
- Sato T., Terai M., Tamura Y., Alexeev V., Mastrangelo M.J., Selvan S.R.: Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol. Res.*, 2011; 51: 170–182
- Saxena M., Bhardwaj N.: Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment. *Trends Cancer*, 2018; 4: 119–137
- Schiavoni G., Sistigu A., Valentini M., Mattei F., Sestili P., Spadaro F., Sanchez M., Lorenzi S., D'Urso M.T., Belardelli F., Gabriele L., Proietti E., Bracci L.: Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res.*, 2011; 71: 768–778
- Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J.: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011; 331: 1565–1570
- Selvam C., Mutisya D., Prakash S., Ranganna K., Thilagavathi R.: Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends. *Chem Biol Drug Des*, 2017; 90: 665–678
- Serrano A.E., Menares-Castillo E., Garrido-Tapia M., Ribeiro C.H., Hernández C.J., Mendoza-Naranjo A., Gatica-Andrades M., Valenzuela-Diaz R., Zúñiga R., López M.N., Salazar-Onfray F., Aguillón J.C., Molina M.C.: Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol. Cell Biol.*, 2011; 89: 447–457
- Sevko A., Sade-Feldman M., Kanterman J., Michels T., Falk C.S., Umansky L., Ramacher M., Kato M., Schadendorf D., Baniyash M., Umansky V.: Cyclophosphamide promotes chronic inflammation-dependent immunosuppression and prevents antitumor response in melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 2013; 133: 1610–1619
- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D.: IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 2001; 410: 1107–1111

- Shen L., Li J., Liu Q., Song W., Zhang X., Tiruthani K., Hu H., Das M., Goodwin T.J., Liu R., Huang L.: Local Blockade of Interleukin 10 and C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 with Nano-Delivery Promotes Antitumor Response in Murine Cancers. *ACS Nano*, 2018; 12: 9830–9841
- Sica A., Saccani A., Bottazzi B., Polentarutti N., Vecchi A., van Damme J., Mantovani A.: Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J. Immunol.*, 2000; 164: 762–767
- Singh A., Trivedi P., Jain N.K.: Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018; 46: 274–283
- Sistigu A., Viaud S., Chaput N., Bracci L., Proietti E., Zitvogel L.: Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol*, 2011; 33: 369–383
- Srivastava M.K., Sinha P., Clements V.K., Rodriguez P., Ostrand-Rosenberg S.: Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.*, 2010; 70: 68–77
- Steinbrink K., Graulich E., Kubsch S., Knop J., Enk A.H.: CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*, 2002; 99: 2468–2476
- Steinbrink K., Wöfl M., Jonuleit H., Knop J., Enk A.H.: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.*, 1997; 159: 4772–4780
- Strioga M., Schijns V., Powell D.J., Pasukoniene V., Dobrovolskiene N., Michalek J.: Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immun*, 2013; 19: 98–111
- Tanikawa T., Wilke C.M., Kryczek I., Chen G.Y., Kao J., Núñez G., Zou W.: Interleukin (IL)-10 ablation promotes tumor development, growth and metastasis. *Cancer Res*, 2012; 72: 420–429
- Takeuchi A., Saito T.: CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front Immunol*, 2017; 8: 194
- Taylor A., Akdis M., Joss A., Akkoç T., Wenig R., Colonna M., Daigle I., Flory E., Blaser K., Akdis C.A.: IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007; 120: 76–83
- Terhune J., Berk E., Czerniecki B.J.: Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines (Basel)*, 2013; 1: 527–549
- Thepmalee C., Panya A., Junking M., Chieochansin T., Yenchitsomanus P. thai: Inhibition of IL-10 and TGF- $\beta$  receptors on dendritic cells enhances activation of effector T-cells to kill cholangiocarcinoma cells. *Hum Vaccin Immunother*, 2018; 14: 1423–1431
- Tomari Y., Zamore P.D.: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.*, 2005; 19: 517–529
- Tosolini M., Kirilovsky A., Mlecnik B., Fredriksen T., Mauger S., Bindea G., Berger A., Bruneval P., Fridman W.H., Pagès F., Galon J.: Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.*, 2011; 71: 1263–1271
- Urošević M., Dummer R.: HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin. Cancer Biol.*, 2003; 13: 337–342



- Vajdic C.M., McDonald S.P., McCredie M.R.E., van Leeuwen M.T., Stewart J.H., Law M., Chapman J.R., Webster A.C., Kaldor J.M., Grulich A.E.: Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA*, 2006; 296: 2823–2831
- Vanmeerbeek I., Sprooten J., De Ruyscher D., Tejpar S., Vandenberghe P., Fucikova J., Spisek R., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L., Garg A.D.: Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. *Oncoimmunology*, 2020; 9: 1703449
- Vannucci L., Lai M., Chiappesi F., Ceccherini-Nelli L., Pistello M.: Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.*, 2013; 36: 1–22
- Vesely M.D., Kershaw M.H., Schreiber R.D., Smyth M.J.: Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011; 29: 235–271
- Vyas J.M., Van der Veen A.G., Ploegh H.L.: The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8: 607–618
- Walter M.R.: The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014; 380: 191–212
- Wang R., Lu M., Zhang J., Chen S., Luo X., Qin Y., Chen H.: Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011; 30: 62
- Webb S.D., Sherratt J.A., Fish R.G.: Cells behaving badly: a theoretical model for the Fas/FasL system in tumour immunology. *Math Biosci*, 2002; 179: 113–129
- Whiteside T.L., Mandapathil M., Schuler P.: The Role of the Adenosinergic Pathway in Immunosuppression Mediated by Human Regulatory T Cells (Treg). *Curr Med Chem*, 2011; 18: 5217–5223
- Willems F., Marchant A., Delville J.P., Gérard C., Delvaux A., Velu T., de Boer M., Goldman M.: Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1994; 24: 1007–1009
- Wilson R., Doudna J.A.: Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*, 2013; 42: 217–239
- Wolf B.J., Choi J.E., Exley M.A.: Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 2018; 9: 384
- Wölfle S.J., Strebovsky J., Bartz H., Sähr A., Arnold C., Kaiser C., Dalpke A.H., Heeg K.: PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur. J. Immunol.*, 2011; 41: 413–424
- Woo S.R., Corrales L., Gajewski T.F.: Innate immune recognition of cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 2015; 33: 445–474
- Worbs T., Hammerschmidt S.I., Förster R.: Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2017; 17: 30–48
- Xu X., Liu X., Long J., Hu Z., Zheng Q., Zhang C., Li L., Wang Y., Jia Y., Qiu W., Zhou J., Yao W., Zeng Z.: Interleukin-10 reorganizes the cytoskeleton of mature dendritic cells leading to their impaired biophysical properties and motilities. *PLoS ONE*, 2017; 12: e0172523
- Yang L., Zhang Y.: Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol*, 2017; 10: 58

- Zahorchak A.F., Macedo C., Hamm D.E., Butterfield L.H., Metes D.M., Thomson A.W.: High PD-L1/CD86 MFI ratio and IL-10 secretion characterize human regulatory dendritic cells generated for clinical testing in organ transplantation. *Cell. Immunol.*, 2018; 323: 9–18
- Zeni E., Mazzetti L., Miotto D., Lo Cascio N., Maestrelli P., Querzoli P., Pedriali M., De Rosa E., Fabbri L.M., Mapp C.E., Boschetto P.: Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic factor in nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. J.*, 2007; 30: 627–632
- Zhao J., Cao Y., Lei Z., Yang Z., Zhang B., Huang B.: Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res.*, 2010; 70: 4850–4858
- Zhao S., Wu D., Wu P., Wang Z., Huang J.: Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 2015; 10: e0139598
- Zheng L.M., Ojcius D.M., Garaud F., Roth C., Maxwell E., Li Z., Rong H., Chen J., Wang X.Y., Catino J.J., King I.: Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 579–584
- Zheng X., Turkowski K., Mora J., Brüne B., Seeger W., Weigert A., Savai R.: Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget*, 2017; 8: 48436–48452
- Zhu J.: T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018; 10: a030338
- Zufferey R., Dull T., Mandel R.J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L., Trono D.: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.*, 1998; 72: 9873–9880
- Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L., Trono D.: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 1997; 15: 871–875