



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

УЛОГА IL-33/ST2 СИГНАЛНОГ ПУТА У АКТИВАЦИЈИ И ФУНКЦИЈИ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА У МОДЕЛУ ТУМОРА ДОЈКЕ

Кључне речи :

Дендритске ћелије, IL-33, ST2, тумор дојке

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

ST2 молекул је члан Toll/IL-1 суперфамилије рецептора. Експримиран је на бројним имунокомпетентним ћелијама укључујући и дендритске ћелије и представља рецептор за IL-33, који појачава Th2 имунски одговор. У недостатку IL-33/ST2 сигналног пута развија се преваходно Th1/Th17 имунски одговор, што је показано на бројним моделима за инфективне и аутоимунске болести.

Дендритске ћелије представљају фамилију антиген презентујућих ћелија са јединственом морфологијом, површинским фенотипом и способношћу да активирају наивне Т лимфоците. ST2L је експримиран на површини дендритских ћелија, а IL-33/ST2 сигнални пут спречава фенотипско и функционално сазревање дендритских ћелија, смањујући им осетљивост на лиганде TLR као и капацитет активације наивних Т лимфоцита.

У овом истраживању испитаћемо број, фенотипску и функционалну зрелост дендритских ћелија у анти-туморском имунском одговору код ST2 дефицијентних мишева, у поређењу са нормалним BALB/C мишевима.

Циљ истраживања (100 речи):

Основни циљ планираног истраживања је да се испитају функционалне и фенотипске карактеристике дендритских ћелија у индукцији анти-туморског имунског одговора у мишјем моделу тумора дојке, као и евентуални утицај IL-33/ST2 сигналног пута на њихову активацију и функцију.

У складу са основним циљем поставили смо и посебне циљеве:

Циљ 1. Одредити процентуални удео и укупан број дендритских ћелија у дренажу лимфним чворовима и слезини код BALB/c и ST2 *knock-out* мишева пре и после апликације тумора.

Циљ 2. Одредити матурациони статус дендритских ћелија у дренажу лимфним чворовима и слезини код BALB/c и ST2 *knock-out* мишева после апликације тумора.



Циљ 3. Испитати продукцију IL-12, IL-6 и IL-10 у дендритским ћелијама код BALB/c и ST2 *knock-out* мишева после апликације тумора.

Актуелност истраживања

Молекул ST2 је члан фамилије рецептора за интерлеукин 1, IL-1R (1). Овај протеин се јавља у два основна облика: солубилни (sST2) и мембрански облик (ST2L) (1, 2). ST2L је експримиран на површини Th2 лимфоцита, као и мастоцита, инваријантних iNKT ћелија, базофила, еозинофила, дендритских ћелија и NK ћелија (3-6). Специфични лиганд за ST2L је IL-33, новиоткривени члан IL-1 цитокине фамилије, који везујући се за овај рецептор индукује секрецију IL-4, IL-5 и IL-13, што појачава Th2 имунски одговор (6). Супротно, остали чланови IL-1 фамилије цитокина (IL-1 β и IL-18) фаворизују Th1 имунски одговор. ST2 *knock-out* мишеви показују смањену активност Th2 ћелија, што помера равнотежу лимфоцитних субсета у правцу Th1/Th17 ћелија. То је показано у моделима инфективних, алергијских и аутоимунских болести (3, 7-10). Ипак, нема литералних података о улози IL-33/ST2 сигналног пута у анти-туморској имуности. Иако Th2 лимфоцити могу да индукују „регрутавање“ туморицидних еозинофила и макрофага у окружење тумора што за резултат може имати акутно одбацивање тумора, Th1 лимфоцити ипак обезбеђују далеко ефикасније антитуморске механизме и обезбеђују дуготрајан антитуморски одговор CD8+T лимфоцита (11-12).

Дендритске ћелије представљају фамилију антиген презентујућих ћелија са јединственом морфологијом, површинским фенотипом и способношћу да активирају наивне Т лимфоците. ST2L је експримиран на површини дендритских ћелија, а IL-33/ST2 сигнални пут спречава фенотипско и функционално сазревање дендритских ћелија, смањујући им осетљивост на лиганде TLR као и капацитет активације наивних Т лимфоцита (13).

Нашим прелиминарним резултатима показали смо да у туморском систему примарног карцинома дојке, ST2-дефицијентни мишеви показују закаснили раст примарног тумора, смањену инциденцу метастаза, повећану продукцију проинфламаторних цитокина и повећану цитотоксичност спленоцита. Али опет, улога дендритских ћелија није испитивана. Због свега наведеног, било би од интереса видети какав је број и функција дендритских ћелија у ST2 дефицијентних мишева после убризгавања тумора и у којој мери контрибуирају у релативној резистенцији на тумор.

Предмет и опис истраживања:

задачи, методологија, очекивани резултати

Експерименталне животиње

Као експерименталне животиње користиће се мишеви соја BALB/C и нокаут мишеви (ST2-/-) на BALB/C подлози, женског пола, старости од 8 до 12 недеља. Све експерименталне и контролне групе у истраживању обухватиће по 50 животиња.



Индуковање тумора

Тумори ће се индуковати апликацијом слабо имуногене малигне ћелијске линије 4Т1, сингене за BALB/С мишеве. Туморске ћелије ће се убризгавати субкутано, директно у млечну жлезду број 4.

Изолација ћелија

Након жртвовања мишева изоловаће се тумор дренирајући лимфни чворови и слезина. Пропуштањем поменутих органа кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) добиће се једноћелијска суспензија (леукоцити лимфног чвора и спленоцити). Коришћењем хипотоничног раствора ослободићемо се еритроцита из једноћелијске суспензије спленоцита.

Квантификација и фенотипизација дендритских ћелија

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишјих антитела (CD11c) одређиваћемо процентуални удео и укупан број дендритских ћелија у дренирајућим лимфним чворовима и слезини. Комбинацијом поменутог антитела са анти: CD80, CD86 и МНС II, CD27 CD11b одредићемо матурациони статус дендритских ћелија после апликације тумора.

Испитивање продукције цитокина дендритских ћелија

Проточном цитометријом, коришћењем анти- IL-12, IL-6 и IL-10 антитела за интрацелуларно бојење, мерићемо продукцију поменутих цитокина у дендритским ћелијама после апликације тумора.

Статистичка обрада података

Разлике између група анализираћемо или не-параметријским Mann-Whitney тестом или параметријским независним Т-тестом, у зависности од нормалности расподеле. Нормалност расподеле вредности унутар група анализираћемо Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk тестовима. Вредност p мању од 0.05 рачунаћемо као статистички значајну. За статистичку обраду свих података користиће се SPSS пакет, верзија 16.0.

Значај истраживања

Ово истраживање нам може дати нове податке о улози IL-33/ST2 сигналног пута у матурацији дендритских ћелија у анти-туморском имунском одговору на тумор дојке. Добијањем одговарајућих резултата истраживања отварају се врата потенцијалној терапијској примени испитиваних ћелија и молекула.

Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од једне године.



Литература

1. Vladimir Trajkovic, Matthew J. Sweet, Damo Xuc, T1/ST2—an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004; 15: 87–95.
2. Tago, K.; Noda, T.; Hayakawa, M.; Iwahana, H.; Yanagisawa, K.; Yashiro, T.; Tominaga, S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285: 1377-1383.
3. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* 1998;187:787–94.
4. Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* 1998;161:4866-74.
5. Molly D. Smithgall, Michael R. Comeau, Bo-Rin Park Yoon, Dawn Kaufman, Richard Armitage and Dirk E. Smith. IL-33 amplifies both Th1- and Th2- type responses through its activity on human basophils, allergen- reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International Immunology*, 2008., Vol. 20, No. 8, pp. 1019–1030
6. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479-90.
7. Mensah-Brown E, Shahin A, Parekh K, Hakim AA, Shamisi MA, Hsu DK, Lukic ML. Functional capacity of macrophages determines the induction of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1084:49-57
8. Nemanja Zdravkovic a, Allen Shahinb, Nebojsa Arsenijevic a, Miodrag L. Lukica, Eric P.K. Mensah-Brownc. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Mol. Immunol.* (2009)
9. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN (2000) T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 2000; 191:1069–1076.



10. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6930–5.
11. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188: 2357–2368.
12. Nishimura, T., M. Nakui, M. Sato, K. Iwakabe, H. Kitamura, M. Sekimoto, A. Ohta, T. Koda, and S. Nishimura. 2000. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46:S52–S61.
13. Nobuyasu Mayuzumi, Hironori Matsushima and Akira Takashima. IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39: 3331-3342.