

Prilava hibridomov iz monocitov in tumorskih celic

V Stegel¹, A Kopitar², S Novaković¹

¹Onkološki inštitut Ljubljana

²Inštitut za imunologijo in mikrobiologijo, Ljubljana

Uvod: Tumorske vakcine predstavljajo velik izziv pri zdravljenju tumorjev in preprečevanju ponovitev bolezni. Ker od tumorskih vakcin pričakujemo terapevtsko delovanje in ne le profilaktičnega, je nujno potrebno čim bolj specifično spodbuditi osnovne efektorske mehanizme imunskega sistema, da le-ti takoj prepoznajo tumorske celice. V tej verigi medsebojnega sodelovanja imunske zmožnih celic imajo izredno pomembno vlogo za aktivacijo specifičnega delovanja citotoksičnih T limfocitov (CTL) predstavljene celice. To so celice, ki edine na svoji površini konstitutivno izražajo kostimulatorne molekule (CD80-B7.1, CD86-B7.2) nujno potrebne za uspešno aktivacijo CTL. Od predstavitev celic za prilavo tumorskih vakcin največkrat uporabljamo dendritske celice. To je heterogena skupina celic, ki nastaja iz mieloidnih in limfoidnih prekurzorov celic. V monocitni populaciji se prekurzorske dendritske celice razlikujejo od ostalih s fenotipskim izražanjem CD14, CD11c in CD13. Prilava vakcin na osnovi dendritskih celic temelji na treh osnovnih principih: (i) in vitro gojenje dendritskih celic skupaj s tumorskimi celicami ali njihovimi specifičnimi antigeni, (ii) prilava gensko spremenjenih dendritskih celic z vnosom genov, ki kodirajo specifične tumorske antigenske strukture in (iii) s prilavo hibridomov iz dendritskih in tumorskih celic. Namen našega dela je bil: (i) optimizacija pogojev za izolacijo značilne monocitne populacije, (ii) optimizacija pogojev postopka prilave hibridomov (elektrofuzije), (iii) prilava hibridomov ter (iv) uvedba metode za dokazovanje pripravljenih hibridomov.

Metode: Monocite smo gojili tri dni v gojišču RPMI z 10% FCS in 800 U/ml hGCSF. B16F1 pa smo gojili v gojišču EMEM z 10% FCS. Pred fuzijo smo celice obarvali z lipofilnimi barvili Dil in DiO. Koncentracija celic v fuzijski kamri je bila 2×10^7 celic/ml pri monocitih in 3×10^6 celic/ml. Volumen elektrofuzijske kamre je bil 250 μ l z 0,2 mm veliko režo med elektrodama. Elektrofuzijo smo izvedli z Multiporatorjem Eppendorf (Nemčija) v 25%, 50% in 75% hipoozmolarnem pufru z nizko prevodnostjo (120-180 μ S/cm). Celice smo najprej za 30s izpostavili sinusno nihajoči napetosti z jakostjo 500 V/cm in frekvenco 2 MHz (pre-alignment). Nato smo jih pulzirali z dvema zaporednima pulzoma kvadratne oblike z jakostjo električnega polja 2000V/cm. Dolžina pulzov je bila 30 μ s za monocite in 50 μ s za B16F1 celice. Po tretiranju celic z fuzogenimi pulzi smo celice ponovno za 30s izpostavili sinusno nihajoči napetosti z jakostjo 500V/cm (post-alignment). Delež fuziranih celic in delež živih celic smo

določili s pretočnim citometrom. Za določanje deleža živih celic smo uporabili propidijev jodid.

Rezultati: Delež živih monocitov pred fuzijo je bil 85%. Delež živih celic po fuziji v 25% hipoozmolarnem pufru je bil 80% in delež fuziranih celic 1%.

Delež živih monocitov po fuziji v 50% hipoozmolarnem pufru je bil 53% in delež fuzije pri istih pogojih 24%. Delež živih monocitov v 75% hipoozmolarnem pufru ni bil določen, delež fuzije pa je bil 15%.

Celice B16F1 so bile fuzirane v 50% hipoozmolarnem pufru. Delež fuzije je bil 25% in delež živih celic 40%.

Zaključek: Rezultati kažejo, da je elektrofuzija najbolj uspešna v 50% hipoozmolarnem pufru. Kljub opisanim rezultatom bi bilo v primeru zahteve po večji produkciji hibridomov potrebno dodatno optimizirati tako postopke pridobivanja dendritskih celic, kot tudi same pogoje priprave hibridomov.