

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana J. Majstorović

**EKSPRESIJA I BIOHEMIJSKA I  
FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA  
R-MC 17 ANTIGENA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivana J. Majstorović

**EXPRESSION AND BIOCHEMICAL AND  
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF  
R-MC 17 ANTIGEN IN RAT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

## Podaci o mentorima i članovima komisije

### Mentori:

Akademik Miodrag Čolić

naučni savetnik, profesor emeritus Medicinskog fakulteta VMA Univerziteta odbrane u Beogradu

dr Biljana Božić Nedeljković

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

### Član komisije:

dr Tanja Džopalić

docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

## **Izjave zahvalnosti**

Eksperimentalni deo ove doktorske teze urađen je najvećim delom na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije, a delom na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Želela bih najpre da izrazim zahvalnost i poštovanje **mentorima i članovima komisije**:

Akademiku Miodragu Čoliću, mom mentoru, za stručno vođenje i podršku koju mi je nesebično pružao tokom izrade ove doktorske teze. Privilegija je biti deo njegovog tima i učiti od njega.

Profesorki Biljani Božić (Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu) za svesrdnu pomoć, ideje i sugestije koje je iznalazila u momentima kada se činilo da rešenja nema.

Dr Tanji Džopalić (Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu) za podršku u radu i ohrabrenju u poslednjim momentima.

Takođe bih želela da izjavim zahvalnost i poštovanje **kolegama i prijateljima**:

Profesorki Dragani Vučević, načelniku Odeljenja za molekulska medicinu Instituta za medicinska istraživanja VMA (Medicinski fakultet, Univerzitet odbrane), koja je stručno i kao iskren prijatelj od početka do kraja učestvovala u izradi ove teze. Imam sreću da je osoba koju krasi najlepše ljudske osobine, pored visoke profesionalnosti i stručnosti, podelila svoje veliko znanje sa mnom. Nastaviću da radim tako da ne izneverim njeno poverenje.

Profesoru Saši Vasiljiću, načelniku Odseka za ćelijsko i tkivno bioinženjstvo Instituta za medicinska istraživanja VMA (Medicinski fakultet, Univerzitet odbrane) za nesebičnu pomoć u izradi eksperimentalnog dela teze. Imala sam sreću da bez

mnogo lutanja završim deo doktorskog rada iz oblasti timusnih dendritskih ćelija, zahvaljujući njegovoj stručnosti i dugogodišnjem bavljenju ovom oblašću.

Dr Vesni Ilić (Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu), za iskreno zanimanje za moj rad, a bez čije velike stručne pomoći i iskrene podrške ova teza ne bi mogla da bude završena.

Dr Dušanu Mihajloviću (Medicinski fakultet, Univerzitet odbrane) za pomoć i strpljenje u realizaciji ovog rada.

Dr Sergeju Tomiću (INEP) za pomoć u realizaciji ovog rada.

Svim kolegama i saradnicima sa Instituta za medicinska istraživanja VMA, za pomoć i podršku kad god su mi bile neophodne.

Zahvalnost dugujem svojoj porodici za sav, podsticaj, podršku i strpljenje koju su mi pružali svih ovih godina. Bez njihove ljubavi ne bih uspela.

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta *Regulatorni mehanizmi u zapaljenskim imunskim reakcijama MFVMA/9/16-18*, koji finansira Ministarstvo odbrane Republike Srbije.

## **Ekspresija i biohemijska i funkcionalna karakterizacija R-MC 17 antigena pacova**

### *REZIME*

Razvoj T limfocita u timusu je rezultat niza dvosmernih komunikacija između timocita i ćelija mikrosredine, posredovanih pretežno adhezivnim molekulima. U Institutu za medicinska istaživanja VMA je napravljen panel monoklonskih antitela (mAt) R-MC serije, koja prepoznaju timusne epitelne ćelije (TEC). Cilj ovog rada je bio biohemijska, imunohistohemijska i funkcionalna karakterizacija antigena koga detektuje R-MC 17 mAt. Ovo mAt detektuje antigen od 205 kDa u timusu pacova. Na osnovu poređenja biohemijskih karakteristika anti-DEC 205 mAt (HD83) i unakrsne imunoprecipitacije antigena iz lizata timusa pacova pomoću ova dva mAt zaključeno je da R-MC 17 mAt detektuje pacovski DEC-205 molekul. R-MC 17 antigen je jako ispoljen na kortikalnim TEC, medularnim timusnim dendritskim ćelijama (TDC), DC u parakorteksu i interfolikularnim zonama limfnog čvora i DC u periarteriolarnom limfnom omotaču slezine. Slaba imunoreaktivnost je detektovana na limfocitima u folikulima limfnog čvora i slezine i makrofagama u crvenoj pulpi slezine. Takođe, ekspresija DEC-205 molekula je detektovana na oko 40% ćelija TEC linije sa karakteristikama ćelija „dadilja“. R-MC 17 mAt podstiče vezivanje i emperipoezu timocita od strane ove epitelne linije. Istovremeno, ekspresija R-MC 17 antigena je podjednaka na subpopulacijama TDC pacova ( $CD11b^+$  i  $CD11b^-$ ), i ne menja se pod uticajem GM-CSF-a. Oba anti-DEC 205 mAt (R-MC 17 mAt i HD83 mAt) stimulišu apoptozu timocita u kokulturi sa TDC i ovaj proces je povezan sa povećanim vezivanjem timocita za TDC. R-MC 17 mAt inhibira proliferaciju singenih timocita i alogenih T limfocita pacova u kokulturi sa TDC u prisustvu anti-TCR (R7.3) mAt. Intratimusna aplikacija R-MC 17 mAt dovodi do smanjenja celularnosti timusa pacova što je povezano sa indukcijom apoptoze timocita. Fenotipska analiza subpopulacija timocita nakon intratimusne aplikacije R-MC 17 mAt pokazuje smanjenje ukupnog broja  $CD4^+CD8^+$  i  $CD4^+CD8^-$ , a povećanje ukupnog broja  $CD4^-CD8^+$  timocita, dok je ukupan broj zrelih  $CD5^+TCR^{jako+}$  timocita nepromenjen. Sveukupno, ovi rezultati prvi put opisuju potencijalnu funkciju R-MC 17 antigena u timusu. Opisani mehanizmi mogu biti povezani sa procesima intratimusne diferencijacije timocita i prezentacije

autoantigena u timusu od strane kortikalnih TEC i medularnih TDC, a što u krajnjem ishodu ima uticaj na procese selekcije (delecije autoreaktivnih klonova timocita).

*Ključne reči:* DEC-205, novi adhezivni molekuli, timusne epitelne ćelije, timusne dendritske ćelije, timociti, interakcija, apoptoza.

*Naučna oblast:* *Biologija*

*Uža naučna oblast:* *Imunobiologija*

*UDK:* 616-097:[591.443:636.028](043.3)



## **Expression and biochemical and functional characterization of R-MC 17 antigen in rat**

### *ABSTRACT*

Intrathymic development of T lymphocyte is mainly governed by an array of bi-directional interactions between thymocytes and thymic microenvironment, which are mostly provided by the adhesive molecules. The monoclonal antibody (mAb) panel of R-MC series, designed against thymic epithelial cells (TEC), was developed at the Institute of medical research (MMA). The aim of this doctoral thesis was focused on biochemical, immunohistochemical and functional characterization of the R-MC 17 antigen, detected by R-MC 17 mAb. R-MC 17 mAb recognizes the 205 kDa molecule expressed in the rat thymus. Based on similarity in biochemical features with an anti-DEC-205 mAb (HD83), and cross-immunoprecipitation of antigen from the thymic lysate with these two mAbs, R-MC 17 was considered to be the antibody specific for the rat DEC-205 molecule. Cortical TEC, medullary thymic dendritic cells (TDC), lymph node dendritic cells (DC) in paracortex and interfollicular zones, and spleen paraarteriolar-lymphoid sheaths DC, are highly positive with R-MC 17. Lymphocytes in lymph node and spleen follicles and red pulp macrophages in spleen, show weak R-MC 17 reactivity. About 40% of TEC-line cells with nursing characteristics express R-MC 17 antigen as well. R-MC 17 stimulates thymocyte binding and emperipoiesis displayed by this cell line. Concomitantly, R-MC 17 antigen is equally expressed on two rat TDC subpopulations (CD11b+ and CD11b-), and cultivation with GM-CSF has no effect. R-MC 17, as well as HD83, stimulates thymocyte apoptosis in co-culture with TDC, and this process is associated with the increased binding of thymocytes to TDC. R-MC 17 mAb inhibits proliferation of syngeneic thymocytes and allogeneic T lymphocytes in anti-TCR (R7.3)-stimulated cocultures with TDC. Intrathymic injection of R-MC 17 mAb decreases thymic cellularity, which was related to the induction of thymocyte apoptosis. Phenotypic analysis of thymocyte populations after intrathymic application of R-MC 17 mAb, indicates decrease of the absolute number of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, and increase of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> thymocyte subpopulations, while the absolute number of mature CD5<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup> thymocytes stays unchanged. Taken together, these results show, for the first time, a potential function of R-MC 17 antigen in rat thymus. Mechanisms

described, are potentially involved in the processes of intrathymic differentiation and the presentation of autoantigen in the thymus by the cortical TEC and medullary TDC, having final implications in the processes of thymic selection (deletion of autoreactive thymocytes).

*Keywords:* DEC-205, novel adhesion molecules, thymic epithelial cells, thymic dendritic cells, thymocytes, interaction, apoptosis.

*Scientific field:* *Biology*

*Narrower scientific field:* Immunobiology

*UDC:* 616-097:[591.443:636.028](043.3)

# Sadržaj

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>Timus – mesto oblikovanja repertoara T limfocita.....</b>	<b>1</b>
<b>Intratimusni put diferentovanja T limfocita.....</b>	<b>2</b>
<b>Selekcija T limfocita .....</b>	<b>7</b>
<b>Dendritske ćelije timusa.....</b>	<b>16</b>
Rezidentne i migratorne cDC .....	16
Plazmocitoidne DC .....	17
<b>Epitelne ćelije timusa.....</b>	<b>18</b>
Morfološke i ultrastrukturne karakteristike TEC .....	18
Fenotipska heterogenost TEC.....	21
<b>Timusni "crosstalk" .....</b>	<b>23</b>
<b>Adhezivni molekuli uključeni u vezivanje timocita i TEC.....</b>	<b>24</b>
<b>Novi adhezivni molekuli .....</b>	<b>27</b>
<b>Zajednički ("shared") molekuli.....</b>	<b>29</b>
<b>HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>34</b>
<b>Puferi, rastvori i medijumi .....</b>	<b>34</b>
<b>Eksperimentalne životinje .....</b>	<b>41</b>
<b>Biohemijska karakterizacija antigena.....</b>	<b>41</b>
Priprema ćelijskog ekstrakta.....	41
SDS-PAGE i <i>Western</i> blot timusnog lizata .....	41
Priprema imunoprecipitata .....	43
SDS-PAGE i <i>Western</i> -blot imunoprecipitacijom ispošćenog lizata.....	44
<b>Imunohemijske metode bojenja.....</b>	<b>44</b>
Priprema preseka tkiva za imunohistochemijska ispitivanja .....	44
Priprema citospin preparata.....	44
Imunoperoksidazno bojenje.....	45
Streptavidin-biotin imunoperoksidazno bojenje .....	45
APAAP (alkalna fosfataza anti-alkalna fosfataza) bojenje.....	46
Dvostruko imunohemijsko bojenje (peroksidaza/alkalna fosfataza).....	46
Imunofluorescentno bojenje tkiva.....	46
Kontrastiranje preparata .....	47
May-Grünwald Giemsa bojenje.....	47
Hematoksilin-eozin bojenje.....	47
<b>Uloga R-MC 17 mAt u interakciji timocita i R-TNC.1 .....</b>	<b>47</b>

Dugotrajne kulture R-TNC.1 epitelne ćelijske linije.....	47
Priprema jednoslojnih epitelnih kultura .....	48
Priprema kulture „viseće kapi” .....	48
Priprema suspenzije singenih timocita .....	48
Adhezivni esej .....	48
Esej emperipoeze .....	49
Uloga mAt R-MC 17 u adheziji i emperipoezi R-TNC.1 ćelija.....	49
<b>Uloga R-MC 17 mAt u interakciji timocita i TDC .....</b>	<b>50</b>
Izolacija TDC .....	50
Imunomagnetno prečišćavanje sveže izolovanih TDC.....	50
Kultivacija TDC .....	51
Prečišćavanje kultivisanih TDC.....	51
Priprema alogenih CD4 <sup>+</sup> T limfocita.....	52
Test proliferacije singenih timocita i TDC .....	52
Test proliferacije alogenih CD4 <sup>+</sup> T limfocita i TDC.....	53
Test rozeta TDC/timociti.....	53
Apoptoza timocita u kokulturi sa TDC .....	54
<b>Određivanje apoptoze.....</b>	<b>54</b>
Određivanje apoptoze primenom morfoloških kriterijuma.....	54
Određivanje apoptoze primenom AneksinV-FITC/propidijum jodida.....	55
<b>Citofluorimetrijska karakterizacija ćelija.....</b>	<b>55</b>
<b>Intratimusno ubrizgavanje mAt.....</b>	<b>57</b>
<b>Statistička obrada podataka.....</b>	<b>58</b>
<b>REZULTATI .....</b>	<b>59</b>
<b>R-MC 17 monoklonsko antitelo.....</b>	<b>59</b>
<b>Biohemijska karakterizacija R-MC 17 antigena.....</b>	<b>59</b>
<b>Imunohemijska karakterizacija R-MC 17 monoklonskog antitela.....</b>	<b>67</b>
Ekspresija R-MC 17 antigena u slezini .....	80
Ekspresija R-MC 17 antigena u limfnom čvoru.....	81
<b>Ekspresija R-MC 17 antigena <i>in vitro</i> .....</b>	<b>82</b>
Reaktivnost R-MC 17 mAt sa nelimfoidnim ćelijama timusa pacova u kulturi.....	82
Ekspresija R-MC 17 antigena na R-TNC.1 liniji timusa pacova .....	82
Ekspresija R-MC 17 antigena na sveže izolovanim TDC.....	85
Ekspresija R-MC 17 antigena na TDC iz kulture.....	87
Efekat GM-CSF na ekspresiju R-MC 17 antigena na TDC <i>in vitro</i> .....	91
<b>Funkcionalna karakterizacija R-MC 17 monoklonskog antitela na <i>in vitro</i> modelima.....</b>	<b>92</b>
Efekat R-MC 17 mAt na adhezivne karakteristke R-TNC.1 ćelijske linije <i>in vitro</i> .....	92
Efekat R-MC 17 mAt na emperipoeznu aktivnost R-TNC.1 ćelijske linije <i>in vitro</i> .....	93
Uticaj R-MC 17 mAt na proliferaciju timocita u kokulturi sa TDC <i>in vitro</i> .....	95

Uticaj R-MC 17 mAt na proliferaciju timocita u kokulturi sa GM-CSF-tretiranim TDC <i>in vitro</i> ....	102
Uticaj R-MC 17 mAt i HD83 mAt na adheziju i apoptozu timocita u kokulturi sa TDC.....	105
<b>Funkcionalna karakterizacija R-MC 17 monoklonskog antitela na <i>in vivo</i> modelu.....</b>	<b>111</b>
Efekat R-MC 17 mAt na celularnost timusa.....	112
Efekat R-MC 17 mAt na diferentovanje subpopulacija timocita .....	112
Efekat R-MC 17 mAt na intratimusnu apoptozu timocita .....	120
Uloga R-MC 17 antigena u intratimusnoj selekciji T limfocita <i>in vivo</i> .....	121
<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>125</b>
<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>140</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>142</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>157</b>

## UVOD

### TIMUS – MESTO OBLIKOVANJA REPERTOARA T LIMFOCITA

Timus je centralni organ imunskog sistema u kome se odigravaju procesi proliferacije i diferentovanja nezrelih timocita i njihovo sazrevanje u imunokompetentne T limfocite koji su sposobni da u perifernim organima prepoznaju strane peptidne antigene u kontekstu molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex* - MHC), a koji su tolerantni na autoantigene. Nastanak zrelih T limfocita je rezultat niza direktnih interakcija T limfocitnih prekursora sa ćelijama mikrosredine timusa kao i sa solubilnim produktima koje ove ćelije luče. Mikrosredinu timusa čine ćelijske komponente i vanćelijski matriks. Ćelijske komponente su epitelne ćelije (engl. *epithelial cells* - EC), makrofagi, dendritske ćelije (engl. *dendritic cells* - DC), endotelne ćelije, fibroblasti i druge ćelije (Boyd i sar., 1993, Ritter i Boyd, 1993).

Timusna stroma se embriološki primarno razvija iz epitela. Za pravilan razvoj timusa neophodna je interakcija između dva tipa epitela (ektodermalnog i endodermalnog porekla) i neuralnog grebena (Cordier i Haumont, 1980). Timusne stromalne ćelije (eng. *thymic stromal cells* - TSC) formiraju tri arhitektonski i funkcionalno različita regiona: korteks, kortikomedularnu zonu i medulu. Ovi region se na prvom mestu razlikuju po tipu dominantno prisutnih TSC (Schuurman i sar., 1997). Najbrojnije ćelije timusne strome, timusne epitelne ćelije (engl. *thymic epithelial cells* – TEC) su prisutne u svim delovima timusa. Manje prominentni tipovi TSC su različito distribuirani između ovih regiona. Fibroblasti se primarno nalaze u korteksu, makrofage i u korteksu i u meduli, DC u kortikomedularnoj zoni i meduli, a B limfociti u kortikomedularnoj zoni (Benoist i Mathis, 1999). Stromalna komponenta timusa je vanćelijski matriks (engl. *extracellular matrix* – ECM), koga čine neki tipovi kolagena, glukozaaminoglikani i glikoproteini kao što su fibronektin i laminin (Boyd i sar., 1993, van Ewijk, 1991). Najbrojnije ćelije timusa su timociti. Prema ekspresiji CD4 i CD8 koreceptorskih molekula u populaciji timocita razlikuju se 4 osnovne populacije: dvostruko negativni (engl. *double negative* - DN) CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (1-5%), dvostruko

pozitivni (engl. *double positive* - DP)  $CD4^+CD8^+$  (oko 80%) i jednostruko "single" pozitivni (engl. *single positive* - SP)  $CD4^+CD8^-$  i  $CD4^-CD8^+$  (10-15%) (Takahama, 2006). Timociti veoma pokretne ćelije, koje aktivno "pretražuju" površinu stromalnih ćelija timusa krećući se brzinom od 6 do 15  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Dzhagalov i Phee, 2012).

## INTRATIMUSNI PUT DIFERENTOVANJA T LIMFOCITA

Diferentovanje T limfocita u timusu započinje ulaskom T limfocitnog progenitora u timus. Progenitori T limfocita potiču iz najranijih hematopoetskih centara: žumančane kese i paraaortalnih fokusa a kasnije fetalne jetre i postnatalno iz kostne srži (Picker i Siegelman, 1999). Progenitorske ćelije ulaze u timus u predelu kortikomedularne zone i medule (Benoist i Mathis, 1999). Pokazano je da progenitorska populacija ćelija kostne srži miša ima sledeći fenotip:  $Lin^-IL-7R^+Thy1^-Sca1^{\text{slabo}^+}c\text{-kit}^{\text{slabo}^+}$ . U humanom sistemu progenitor T limfocita eksprimira jedinstven markerski niz koga čine: CD7, CD2, CD34 i citoplazmatski CD3 (Akashi i sar., 2000, Picker i Siegelman, 1999). Na mnoga pitanja o poreklu, usmerenosti progenitora ka razvoju T limfocita i faktorima koji ga privlače u timus, još uvek nema potpuno zadovoljavajućih odgovora (Fehling i von Boehmer, 1997). Prema dosadašnjim saznanjima smatra se da se finalna usmerenost ka razvoju T limfocita dešava na  $CD44^{\text{slabo}^+}CD25^+$  trostruko negativnom (engl. *triple negative* – TN) stadijumu diferentovanja (Benoist i Mathis, 1999). Pretpostavlja se da adhezivni molekuli i hemokinski signali imaju važnu ulogu u naseljavanju i regrutovanju timusnih progenitora iz krvi u timus. P selektin, ispoljen na timusnim endotelnim ćelijama i njegov ligand PSGL-1 (engl. *P-selectin glycoprotein ligand-1*), ispoljen na progenitorskim ćelijama imaju značajnu ulogu u ovom procesu (Rossi i sar., 2005, Scimone i sar., 2006). Sličnu ulogu imaju i signali posredovani CCR7 i CCR9 molekulima (Krueger i sar., 2010, Zlotoff i sar., 2010).

**Rana faza diferentovanja** se odvija u subkapsularnom (SK) regionu timusa. Najnezreliji timociti, koji su  $CD4^{\text{slabo}^+}CD8^-CD44^+CD25^-c\text{-Kit}^+$ , vrlo brzo gube CD4 molekul i postaju tipični TN timociti. Rani timocitni prekursori se brzo umnožavaju i tokom ekspanzije u TN1 stadijum uvećaju svoj broj 1000 puta (Petrie i Zuniga-Pflucker, 2007). U TN stadijumu diferentovanja T limfocita započinje rearanžiranje gena za T ćelijski receptor (engl. *T-cell receptor* – TCR), dešava se  $\beta$  selekcija i usmeravanje ka

razvoju u  $\alpha\beta$  ili  $\gamma\delta$  T limfocita. U TN populaciji ćelija izdvajaju se 4 subpopulacije koje se razlikuju prema ispoljavanju CD44 i CD25 molekula, statusu u kome se nalaze geni za  $\beta$  lanac TCR-a, membranskoj ekspresiji  $\beta$  lanca, procentu ćelija koje se dele i njihovoj zavisnosti od mezenhimskih ćelija kao i odgovoru na različite citokine. **CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>** (TN<sub>1</sub>) su najnezrelije ćelije među kojima se nalazi i frakcija koja eksprimira mali broj CD4 antigena. Ove ćelije nemaju rearanžirane gene za TCR, mogu da se diferentuju ne samo u T limfocite nego i u NK ćelije, B limfocite i DC i brzo se transformišu u sledeći stadijum **CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>** (TN<sub>2</sub>). Ova subpopulacija TN ćelija se rapidno deli pod uticajem citokina c-kit i IL-7. Interakcija c-kit/SCF i IL-7/IL-7R je u osnovi značajne ekspanzije TN<sub>1</sub> i TN<sub>2</sub> subpopulacije TN timocita. Takođe, u proliferaciji TN<sub>1</sub> ćelija značajnu ulogu ima *Hedgehog* signalni put (Petrie i Zuniga-Pflucker, 2007), dok je za početak njihove migracije ka kortikomedularnoj zoni, kao i za  $\beta$ -selekciju kritičan prenos signala posredstvom CXCR4 (Plotkin i sar., 2003). Ligand za CXCR4 je CXCL12 koji je ispoljen na kortikalnim TEC, venulama korteksa i SK zoni (Tramont i sar., 2010). Subpopulacija TN<sub>2</sub> takođe može da se diferentuje u DC ali ne i NK ćelije i B limfocite i ima gene za TCR u nivou matične loze. Rearanžiranje gena za  $\beta$ ,  $\gamma$ , i  $\delta$  lanac TCR kao i prisustvo nekih subjedinica CD3 molekula se najpre detektuje u sledećem razvojnom stadijumu, **CD44<sup>slabo+</sup>CD25<sup>+</sup>** (TN<sub>3</sub>) ćelijama. Iz ovog subseta se mogu razviti samo T limfociti. CCR9, čiji ligand je CCL25 (TECK), koordiniše migraciju na TN<sub>3</sub> stadijumu razvoja. Iako su podaci o ekspresiji CCL25 neujednačeni, najverovatnije je ovaj hemokin prisutan u medularnim TEC i DC (Misslitz i sar., 2004, Vicari i sar., 1997, Wurbel i sar., 2000). Ekspresija CCR9 je precizno regulisana tokom timopoeze. Počinje na TN<sub>3</sub> stadijumu, snažno se povećava nakon pre-TCR stimulacije, nakon diferentovanja TN<sub>4</sub> u DP i smanjuje se na zrelim CD4 SP timocitima (Norment i sar., 2000, Wurbel i sar., 2006). Neke od TN<sub>3</sub> ćelija ekspimiraju funkcionalan  $\beta$  lanac TCR-a u asocijaciji sa nepromenljivim pre-TCR $\alpha$  lancem (pT $\alpha$ ) i nekim subjedinicama CD3 molekula, formiraju tzv. **pre-TCR** i dalje se diferentuju u  $\alpha\beta$  T limfocite. Jedan broj **CD44<sup>slabo+</sup>CD25<sup>+</sup>** ćelija eksprimira  $\gamma\delta$  TCR. Uspešna ekspresija funkcionalnog  $\beta$  lanca TCR-a u TN<sub>3</sub> ćelijama inhibira preuređenje drugog TCR  $\beta$  lokusa (fenomen poznat kao alelsko isključivanje). Selektivna ekspanzija ove populacije ćelija, njihovo diferentovanje u **CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>** (TN<sub>4</sub>) ćelije i inhibicija daljeg rearanžiranja lokusa za  $\beta$  lanac TCR-a su događaji koji zavise od signala



indukovanog preko pre-TCR (Akashi i sar., 2000, Di Santo i sar., 2000, Fehling i von Boehmer, 1997, Robey i Fowlkes, 1998). Smanjenje ekspresije CD25 praćeno je promenama koje dovode do transformacije protimocita u tipične kortikalne DP timocite u toku 10 do 12 časova (Nikolić-Žugić, 1994a). Interesantno je zapažanje da je diferentovanje timocita iz TN<sub>1</sub> u TN<sub>3</sub> neophodno za kontrolu sazrevanja kortikalnih TEC i formiranje korteksa timusa (Dzhagalov i Phee, 2012).

*Selekcija posredovana pre-TCR-om.* Poslednjih nekoliko godina pokazan je veliki značaj stadijuma diferentovanja T limfocita u kome se CD44<sup>slabo+</sup>CD25<sup>+</sup> timociti transformišu u CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije. Molekul koji kontroliše ovaj stadijum naziva se pre-TCR. Još uvek nije potpuno precizno definisano kako pre-TCR kontroliše ovaj stadijum u diferentovanju. Ne zna se da li se pre-TCR vezuje za neki ligand ili je dovoljno samo njegovo pojavljivanje na membrani timocita. Pokazano je da je za potpunu biološku aktivnost pre-TCR potrebno prisustvo CD3 ε, γ, ζ/η i aktivnost PTK p56<sup>lck</sup> (von Boehmer i sar., 1999, Wiest i sar., 1999). Procesi koje reguliše pre-TCR, a koji prate prelazak CD44<sup>slabo+</sup>CD25<sup>+</sup> u CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije su: alelsko isključivanje lokusa za β lanac TCR-a, β selekcija, ćelijske deobe, eventualna ekspresija CD4 i CD8 molekula i početak rearanžiranja gena za α lanac TCR-a (Benoist i Mathis, 1999). Ukratko pre-TCR posreduje pozitivnu selekciju ćelija sa funkcionalnim β lancem TCR-a i povećava njihovu šansu da sklope funkcionalan αβTCR.

U svom razvojnem putu DN timociti prolaze kroz fazu u kojoj ekspimiraju jedan od koreceptorskih molekula CD4 ili CD8 i tada se nazivaju nezreli jednostruko pozitivni timociti (engl. *immature single positive* - ISP). Stadijum **ISP** nezrelih SP ćelija nije dovoljno proučen. Mišije ćelije ovakvog fenotipa spontano u kulturi prelaze u DP stadijum tako da ima mišljenja da je ovaj stadijum posledica različite kinetike pojavljivanja koreceptorskih molekula. Krucijalna regulatorna tačka u progresiji ka DP stadijumu je uspešno rearanžiranje gena za β lanac TCR-a (Benoist i Mathis, 1999, Picker i Siegelman, 1999, Takahama, 2006).

**Intermedijerna faza diferentovanja** timocita odvija se u korteksu timusa u kome borave **DP** timociti. U ovom stadijumu diferentovanja dešavaju se: rearanžiranje gena za α lanac TCR, pozitivna selekcija u sklopu MHC restrikcije prepoznavanja, linijsko usmeravanje (diferentovanje ka CD4 ili CD8 SP timocitima), negativna selekcija u cilju

obezbeđivanja tolerancije na sopstveno. Kao rezultat svih ovih događaja više od 95% svih DP ćelija nikada ne završi sazrevanje i podleže procesima programirane ćelijske smrti (engl. *programmed cell death* – PCD) (Vrisekoop i sar., 2014). Preduslov za uspešno diferentovanje timocita u korteksu je sposobnost prepoznavanja sopstvenih peptid/MHC kompleksa na TSC što je praćeno povećanjem ekspresije TCR/CD3 kompleksa i gubitkom ekspresije jednog od koreceptorskih molekula. Zavisno od toga da li eksprimiraju TCR koji specifično prepoznaje antigenski peptid na molekulima I ili II klase MHC, timociti se u ovoj fazi razvoja opredeljuju ka CD4 ili CD8 SP timocitima (linijsko usmeravanje). Samo polovina DP timocita eksprimira  $\alpha\beta$  TCR koji je neophodan preduslov za započinjanje procesa selekcije. Oko 25 % DP timocita su velike ćelije, blasti, koje se dele a ostatak su njihovi progenitori, male ćelije u G0 fazi koje se ne dele. DP timociti imaju veliku dinamiku deobe i dnevno se zameni jedna trećina ovih ćelija (Picker i Siegelman, 1999). Istraživanja na modelima himera su pokazala da se kortikalni DP timociti pre pozitivne selekcije kreću nasumično, relativno sporo (brzinom od 3 do 8  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Iznenadujuće, među njima je zapažen manji broj koji se ka meduli kretao značajno brže (10  $\mu\text{m}/\text{min}$  ili više), što je bilo u korelaciji sa pozitivnom selekcijom i ukazalo da su ove ćelije možda pozitivno selekcionisani timociti (Kurobe i sar., 2006). DP ćelije koje su uspešno savladale intermedijernu fazu maturacije migriraju kroz kortikomedularnu zonu ka meduli u kojoj se odvija finalna faza sazrevanja T limfocita. Najvažniji faktor koji usmerava migraciju pozitivno selekcionisanih DP timocita u medulu je signal posredovan angažovanjem hemokinskog receptora, CCR7. Ligandi za CCR7 su CCL19 i CCL21 čija je ekspresija u meduli mnogo veća nego u korteksu te ovaj hemokinski gradijent usmerava DP timocite ka meduli (Kurobe i sar., 2006, Misslitz i sar., 2004). Takođe, u kortiko-medularnoj migraciji DP timocita, mogli bi da učestvuju i CCR9 i CCR4, na šta ukazuju rezultati pojedinih istraživanja. CCL17 i CCL22 (ligandi za CCR4) su uglavnom ispoljeni u meduli, posebno na DC (Dzhagalov i Phee, 2012).

**Finalna faza diferentovanja** obuhvata transformaciju DP u SP timocite. Proces je postepen, odvija se kroz nekoliko faza i najvećim delom se dešava u meduli timusa. Tranzicija DP ka zrelijim formama timocita praćena je njihovim prolaskom kroz kortikomedularnu zonu u kojoj je skoncentrisan veći broj makrofaga i DC. Da bi prošli postavljenu makrofagno/DC barijeru timociti povećavaju ekspresiju nekih markera kao i

anti-apoptotskih molekula (Bcl-2) (Picker i Siegelman, 1999). U meduli se nastavlja selekcija započeta u korteksu. Rezultat odabira su SP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>jak<sup>o+</sup></sup> ili CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>jak<sup>o+</sup></sup> timociti. Odnos između dve populacije SP ćelija varira zavisno od vrste ispitivanih animalnih modela (Amadori i sar., 1995). Unutar zrelih CD4<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> SP timocita izolovane su dve glavne subpopulacije: CD8<sup>+/-</sup>CD4<sup>+</sup>HSA<sup>+</sup> (70% CD4<sup>+</sup> SP timocita) koja nije potpuno zrela, i druga, fenotipski potpuno zrela, CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>HSA<sup>+/-</sup> (30% CD4<sup>+</sup> SP timocita). Analogne subpopulacije identifikovane su i u okviru CD8<sup>+</sup> SP ćelija (Nikolić-Žugić, 1994a). Medularni timociti se razlikuju od perifernih T limfocita po veličini i ekspresiji nekih membranskih markera ali su stekli skoro sve osobine zrelih T limfocita (Picker i Siegelman, 1999). U regulaciji kretanja SP timocita u meduli učestvuju CCR4, CCR7, CCR9 i njihovi ligandi CCL17, CCL22, CCL19, CCL21, CCL25 (Dzhagalov i Phee, 2012). Na modelu TCR transgenih timocita pokazano je da je prosečna brzina kretanja timocita koji nisu podvrgnuti procesu negativne selekcije 15 μm/min, što ih čini najbržim ćelijama od bilo kog tipa koji je ispitivan u 3D modelima (Ehrlich i sar., 2009, Witt i sar., 2005). Primenom novih tehnologija, praćenjem kretanja timocita u realnom vremenu, procenjeno je da je broj antigen-prezentujućih ćelija (engl. *antigen presenting cells* - APC) koje SP timociti „pretraže“ tokom svog boravka u meduli od nekoliko stotina do nekoliko hiljada ćelija (Klein i sar., 2014). Potpuno zreli SP timociti migriraju iz timusa posredstvom krvnih i limfnih sudova u kortikomedularnu zonu mehanizmima koji su zavisni od Gi proteina (Benoist i Mathis, 1999). Identitet hemokinskog receptora koji učestvuje u usmeravanju zrelih T limfocita iz timusa je bio misterija, sve dok nije pokazano da sfingozin-1-fosfat receptor 1 (S1PR1) (koji je ispoljen na većini zrelih SP timocita) i njegov ligand S1P imaju ključnu ulogu u ovom procesu (Allende i sar., 2004, Matloubian i sar., 2004).

Po napuštanju timusa dešava se izvesna dodatna maturacija zrelih SP ćelija ako je suditi po evoluciji površinskih markera i funkcionalnoj kompetenciji (Benoist i Mathis, 1999). Dakle fenotipski zreli i čak antigenima aktivisani periferni T limfociti mogu da migriraju natrag u timus gde se lociraju u meduli formirajući deo pula SP ćelija (Picker i Siegelman, 1999). Pretpostavlja se da je ovo način kojim periferni imunski odgovor može povratno da moduliše timopoezu (Benoist i Mathis, 1999).

Procenjuje se da diferentovanje timocita unutar TN stadijuma traje oko 14 dana (Petrie i Zuniga-Pflucker, 2007, Shortman i sar., 1990). Timociti se 3-4 dana nalaze u

DP stadijumu (Egerton i sar., 1990). Raniji podaci su ukazivali da se timociti nalaze 7-14 dana u SP stadijumu (Tough i Sprent, 1995). Međutim, noviji podaci ukazuju da konvencionalni TCR $\alpha\beta$  timociti u meduli provedu samo 4-5 dana (Klein i sar., 2014, McCaughtry i sar., 2007).

## SELEKCIJA T LIMFOCITA

Jedno od najfascinatnijih ali i najkontroverznijih pitanja u imunologiji je uloga timusa u **selekcioisanju** T ćelijskog repertoara. Postojanje procesa selekcije u timusu generalno je prihvaćeno ali su osnovni ćelijski i genetski mehanizmi procesa i dalje na top listi vrućih imunoloških tema. U osnovi, timus se može smatrati mestom evolucije TCR čija je osnovna uloga da omogući takvu mikrosredinu u kojoj će preživeti samo oni klonovi timocita koji poseduju odgovarajući TCR dok će oni sa neodgovarajućim TCR biti odstranjeni. Procenjuje se da 3-5% DP timocita završi proces sazrevanja, a ostali bivaju uklonjeni u procesima selekcije (Vrisekoop i sar., 2014).

Očigledno je stoga da ćelija pre nego što bude selekcioisana na bazi TCR specifičnosti mora najpre da ispolji TCR na svojoj membrani. Ovaj uslov se ispunjava na DP stadijumu diferentovanja timocita. Smatra se stoga da je selekcija ograničena na DP i ranu fazu SP stadijuma diferentovanja T limfocita (Picker i Siegelman, 1999).

**Pozitivna selekcija** je proces koji omogućava selektivno preživljavanje i dalju ekspanziju T limfocita koji prepoznaju sopstvene i strane antigene u asocijaciji sa sopstvenim molekulima MHC. Prema tome pozitivna selekcija je istovremeno i proces učenja MHC restrikcije prepoznavanja (Ritter i Crispe, 1992, Sprent, 1993). Oni timociti koji nemaju sposobnost da prepoznaju kompleks sopstveni MHC/peptid ispoljen na nekoj od TSC bivaju eliminisani procesom PCD koja se u takvim ćelijama aktivira kao posledica neuspostavljenog kontakta sa TSC tj. neprimanja spasonosnog signala. Ova se apoptoza označava i kao "smrt usled zanemarenosti" ("death by neglect") (Goldrath i Bevan, 1999, Vrisekoop i sar., 2014).

Koncept pozitivne selekcije razvio se na temeljima različitih istraživanja čiji suštinski zaključak je bio da se potpuno sazrevanje T limfocita koji ekspimiraju transgeni TCR dešava i okončava jedino u životinja koje ekspimiraju MHC alele koji odgovaraju originalnom T ćelijskom klonu. Drugi važan zaključak ovih eksperimenata

je bio da je fenotip nastalih SP limfocita određen MHC restrikcijom njihovog receptora. Ovi rezultati su naveli na zaključak da klasa MHC molekula koja je angažovana tokom pozitivne selekcije na neki način uslovljava i određuje za koje gene će se uključiti transkripcioni program u ćeliji koja se diferentuje. Svi su ovi nalazi dodatno potvrđeni u eksperimentima na životinjama čiji su određeni geni bili predmet ciljane manipulacije. Najsnažniji nalaz je bio da odsustvo MHC I klase isključuje razvoj CD8<sup>+</sup> ćelija u timusu i obrnuto odsustvo II klase MHC isključuje razvoj CD4<sup>+</sup> limfocita (Benoist i Mathis, 1999, Jameson i Bevan, 1998).

Na osnovu rezultata istraživanja na različitim eksperimentalnim modelima zaključeno je da kortikalne TEC imaju dominantnu ulogu u procesu pozitivne selekcije. Iako pod izvesnim eksperimentalnim uslovima i timusne dendritske ćelije (engl. *thymic dendritic cells* – TDC), makrofage, medularne TEC i fibroblasti mogu indukovati pozitivnu selekciju smatra se da su u fiziološkim uslovima kortikalne TEC osnovni medijatori pozitivne selekcije (Benoist i Mathis, 1989, Benoist i Mathis, 1999, Chidgey i Boyd, 2001, Sprent i sar., 1988).

Sposobnost kortikalnih TEC da indukuju pozitivnu selekciju timocita nije samo posledica prezentovanja jedinstvenog repertoara kompleksa peptid/MHC već i delovanja specijalizovanih akcesornih molekula. Za sada je nepoznata priroda ovih akcesornih liganada ali je pokazano da se radi o membranskim molekulima koji se nepovratno gube sa membrane TEC tokom *in vitro* kultivacije u formi jednoslojnih kultura (Anderson i sar., 1997, Hare i sar., 2001). Ono što je poznato jeste da kortikalne TEC poseduju jedinstvenu mašineriju za preradu antigena, koja omogućava da ove ćelije ispoljavaju unikatan niz peptid/MHC kompleksa koji se naziva pMHC ligandom (Klein i sar., 2014). Istovremeno, pokazano je da kortikalne TEC ispoljavaju neobično visok stepen konstitutivne makroautofagije, što bi mogao biti jedan od mehanizama „nekonvencionalnog punjenja“ MHC II klase peptidima endogenim putem (Nedjic i sar., 2009). O pozitivnoj selekciji treba razmišljati kao o kontinuiranom dugotrajnom (višečasovnom) procesu (Merkenschlager, 1996, Merkenschlager i sar., 1994, Starr i sar., 2003, Takahama, 2006)

Sa razvojem modernih tehnologija postalo je moguće pratiti interakciju timocita sa različitim stromalnim ćelijama. Tako je primenom dvofotonske mikroskopije

pokazano da tokom pozitivne selekcije u korteksu timociti kontaktiraju i sa DC. Ovo istraživanje je pokazalo da su DC lokalizovane u blizini kapilara i CCL21<sup>+</sup> područja u korteksu timusa (Ladi i sar., 2008).

Jedna od najizraženijih fenotipskih promena koje prate pozitivnu selekciju je povećanje nivoa ekspresije TCR-a, gubitak jednog od koreceptorskih molekula, ispoljavanje nekih molekula koji su bitni za funkciju zrelih T limfocita (CD44, CD69, CD28, CD5, CD45, MHC I), modifikacija ekspresije HSA i PNA receptora (smanjuju se), indukcija intracelularnih proteina regulatora apoptoze iz Bcl-2 familije (Benoist i Mathis, 1999). Povećanje ekspresije Bcl-2 prati gubitak osetljivosti DP timocita na induktore apoptoze (zračenje, glukokortikoide, visokoafinitetno vezivanje TCR). Sa pozitivnom selekcijom koreliraju i neke promene u transkripciji gena (smanjena ekspresija RAG i TdT gena) (Brandle i sar., 1992). Pretpostavlja se da nakon inicijalnog signala za preživljavanje koji dobijaju u kontaktu sa TEC pozitivno selekcionisani timociti imaju i dodatne interakcije sa epitelnim ćelijama u cilju kompletiranja maturacionih zbivanja povezanih sa pozitivnom selekcijom (Sebzda i sar., 1999). Kao što je ranije istaknuto, nakon pozitivne selekcije zreli CD4 ili CD8 SP timociti povećavaju ekspresiju CCR7 što im omogućava migraciju iz korteksa u medulu gde su ispoljeni ligandi za CCR7 (Dzhagalov i Phee, 2012).

Tokom pozitivne selekcije timociti takođe donose odluku o *linijskom usmeravanju* tj. daljem diferentovanju ka CD4<sup>+</sup> ili CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Ranija istraživanja su ukazivala na mogućnost da je linijsko usmeravanje determinisano vremenskim trajanjem TCR signala više nego “snagom” signala. Kraći kontakt timocita sa APC indukuje diferentovanje ka CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita; duži kontakt sa istim ligandom indukuje sazrevanje CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> timocita (Yasutomo i sar., 2000). Kasnija istraživanja su pokazala da značajan broj CD69<sup>jako+</sup>TCR<sup>jako+</sup> DP timocita (pozitivno selekcionisani) i većina SP timocita ispoljavaju CCR7. Istovremeno, ekspresija CCR7 je bila izraženija na DP timocitima koji prepoznaju antigen u sklopu MHC I klase u poređenju sa DP timocitima koji prepoznaju antigen u sklopu MHC II klase. Ove činjenice su u osnovi tzv. **kinetičkog modela** linijskog usmeravanja timocita. Prema ovom modelu, nakon snažne i prolongirane interakcije sa kortikalnim TEC timociti se usmeravaju ka CD4 SP a slabiji i kraći signal dovodi do usmeravanja ka CD8 SP timocitima (Singer i sar., 2008, Yin i sar., 2007).

**Faktori koji utiču na pozitivnu selekciju su:** afinitet za selekcionišući ligand (određen gustinom TCR-a, gustinom liganda i konstantom vezivanja); aktivaciono stanje timocita i/ili putevi prenosa aktivacionog signala; veza signalnih molekula sa TCR-om tokom različitih razvojnih stadijuma T limfocita; svojstva TSC koje prezentuju antigene. Za nesmetan tok pozitivne selekcije neophodni su koreceptorski molekuli (Picker i Siegelman, 1999). Osim njih važnu ulogu imaju i sopstveni antigenski peptidi. Pokazano je da neki tipovi peptida imaju, a drugi nemaju sposobnost indukcije pozitivne selekcije. Peptidi koji se razlikuju od antigenskog peptida čak i u jednoj amino kiselini (koju TCR prepoznaje) mogu biti klasični kompetitivni antagonisti (inhibiraju aktivaciju T limfocita uprkos prisustva dovoljne količine stimulatornih kompleksa antigenski peptid/MHC). Neki od modifikovanih peptida mogu biti delimični agonisti (slabi stimulatori T limfocita). Jedan isti TCR može imati finu specifičnost za različite peptide od kojih su neki snažni stimulatori, drugi slabi stimulatori a treći inhibitori (antagonisti). Stoga se pretpostavlja da je pozitivna selekcija posredovana sopstvenim peptidima slabim agonistima koji izazivaju delimičnu aktivaciju timocita dovoljnu da prenesu pozitivan selekcionni signal i da ih zaštiti od PCD (Sebzda i sar., 1999, Vrisekoop i sar., 2014). Poređenjem peptida izolovanih iz MHC kompleksa kortikalnih TEC i APC slezine pokazana je sličnost za veliki broj peptida ali je značajna razlika uočena u gustini eksprimiranih kompleksa peptid/MHC (Marrack i sar., 1993). Da su pozitivna i negativna selekcija posredovane različitim setom peptida potvrđeno je nalazima da delecija katepsina L (proteaze ispoljene u kortikalnim TEC), ne utiče na prezentaciju antigena od strane APC slezine, ali sprečava pozitivnu selekciju (Nakagawa i sar., 1998).

Pozitivno selekcionisani T limfociti su heterogena ćelijska populacija u kojoj prema različitim procenama ima 5 do 75% potencijalno autoreaktivnih T limfocita koji se eliminišu u sledećem koraku, negativnoj selekciji. **Negativna selekcija** je proces sticanja tolerancije na sopstvene antigene i u timusu se postiže delecijom (fizičkom eliminacijom) ili funkcionalnom inaktivacijom (anergijom) potencijalno autoreaktivnih klonova T limfocita (Benoist i Mathis, 1999, Sebzda i sar., 1999). Smatra se da negativna selekcija putem *klonske delecije* ima ključnu ulogu u indukciji autotolerancije i sprečavanju autoimunosti. Osnovu delecije čini specifično vezivanje TCR za sopstveni kompleks antigenski peptid/MHC molekul na APC koje u timocitima indukuje PCD.

Ovakav tip apoptoze naziva se aktivacijom izazvana ćelijska smrt (engl. *activation-induced cell death* - AICD) jer je posledica vezivanja (ligacije) TCR-a i prenosa aktivacionih signala. Po svojim mehanizmima AICD se razlikuje od apoptoze timocita koji nisu pozitivno selekcionisani (smrt ćelije kao posledica neprimanja spasonosnog signala, tzv. umiranje zbog zanemarenosti) (Anderson i sar., 1996). Mehanizmom klonske delecije se eliminišu svi oni timociti čiji se TCR previše snažno vezuje za komplekse peptid/MHC ispoljene na nelimfoidnim TSC hematopoetskog porekla (Klein i Kyewski, 2000, Nikolic-Zugic, 1991). To je potvrđeno eksperimentima urađenim na transgenim životinjama, primenom superantigena i monoklonskih antitela (mAt) prema različitim segmentima V $\beta$  lanaca TCR (Benoist i Mathis, 1999). Na osnovu svih ovih istraživanja generalno je prihvaćen stav da u *in vivo* uslovima TDC imaju ključnu ulogu u procesu negativne selekcije timocita mehanizmima klonske delecije (Ardavin, 1997, Klein i Kyewski, 2000, Pobezinsky i sar., 2012). Timusne DC se izdvajaju po ekspresiji mnogobrojnih adhezivnih i kostimulatornih molekula (LFA-1, ICAM-1, CD30L, CD80, CD86 i CD40) (Ardavin, 1997). Slično pozitivnoj selekciji, u procese negativne selekcije su uključeni koreceptorski molekuli ali i drugi adhezivni i kostimulatorni molekuli (LFA-1, ICAM-1, CD28) i njihovi ligandi (Benoist i Mathis, 1999) kao i molekuli iz familije TNFR (Sebzda i sar., 1999). Jedna od interakcija sa kontroverznom ulogom u procesu negativne selekcije je interakcija Fas/Fas-L. Nedavno je pokazano da blokiranje ekspresije Fas ali ne i Fas-L ometa tok negativne selekcije (Dautigny i sar., 1999). Drugi mehanizam negativne selekcije u timusu je *anergija*. Osnovna odlika ovog fenomena je da timocit reaktivan sa određenim antigenom nije odstranjen u timusu već perzistira na periferiji u neaktivnom stanju, odnosno nije sposoban da funkcionalno odgovori na dati antigen. Primenom različitih eksperimentalnih modela pokazano je da se anergija indukuje ukoliko potencijalno autoreaktivni timociti prepoznaju kompleks peptid/MHC ispoljen na medularnim TEC (Ardavin, 1997, van Meerwijk i MacDonald, 1999). Ostale hematopoetske ćelije imaju ulogu u uklanjanju apoptotičnih ćelija (makrofage) (Miyazaki i sar., 1993) ili parcijalnu ulogu u negativnoj selekciji (B limfociti) (Kleindienst i sar., 2000).

U razmatranju učešća pojedinih tipova TSC u negativnoj selekciji timocita treba istaći činjenicu da rezultati istraživanja u velikoj meri zavise od primenjenih eksperimentalnih sistema. U sistemima kultura suspenzija ćelija, TEC i nelimfoidne



hematopoetske ćelije timusa imaju jednako učešće u negativnoj selekciji (Pircher i sar., 1993) dok su u reagregacionim kulturama daleko efikasnije hematopoetske nelimfoidne ćelije timusa (Merkenschlager i sar., 1994). Kortikalne TEC mogu u *in vitro* uslovima da indukuju apoptozu nezrelih timocita (Pircher i sar., 1993, Volkmann i sar., 1997). Takođe, istraživanjima na transgenim životinjama je pokazano da kortikalne TEC imaju sposobnost indukcije tolerancije ali je nejasno da li se radi o aktivaciji apoptoze ili indukciji anergije (Spain i Berg, 1992). Neki autori smatraju da kortikalne TEC mogu indukovati deleciju DP timocita koji se visokim aviditetom vezuju za one sopstvene peptide čija je koncentracija na kortikalnim TEC najveća i na taj način eliminišu iz T ćelijskog repertoara minoran subset autoreaktivnih timocita (Klein i Kyewski, 2000).

Nedavni podaci pokazuju da je broj timocita koji umiru u korteksu timusa u procesu negativne selekcije u stvari mnogo veći nego što se ranije mislilo i da čak može nadmašiti broj ćelija koje su prošle pozitivnu selekciju. Procenjeno je da se u korteksu timusa svakodnevno ukloni  $5 \times 10^5$  timocita, što je dvostruko više ćelija nego što se procesom negativne selekcije ukloni u meduli (Daley i sar., 2013, Stritesky i sar., 2013).

Smatra se da TDC i medularne TEC obavljaju komplementarne funkcije u indukciji autotolerancije pri čemu su TDC daleko moćniji induktori negativne selekcije odgovorne za klonsku deleciju najmanje 50% prethodno pozitivno selekcionisanih timocita. Timusne DC su istovremeno veoma efikasne u preuzimanju i obradi egzogenih proteinskih antigena koje potom prezentuju timocitima. Drugim rečima one osim sopstvenog genetskog programa mogu da odslikaju antigenski sastav vanćelijskog prostora. Timusne DC na periferiji su primarne akcesorne i APC koje pomažu aktivaciju naivnih T limfocita. Zbog toga je od ogromnog značaja da se iz periferije uklone svi zreli T limfociti koji bi mogli da reaguju sa sopstvenim peptidima asociranim sa MHC molekulima TDC. Drugim rečima, vrlo je važno da ono što je sopstveno za DC T limfociti ignorišu jer su strani peptidi asocirani za DC primarni okidač imunskog odgovora na periferiji (Klein i Kyewski, 2000, Pobeziński i sar., 2012).

Negativna selekcija se može dešavati na više maturacionih stadijuma T limfocita (počev od DP stadijuma sa slabom ekspresijom TCR pa sve do SP stadijuma sa jakom ekspresijom TCR, sličnoj ekspresiji TCR na perifernim T limfocitima), uz učešće više tipova ćelija i mehanizama delovanja (Picker i Siegelman, 1999). Rezistencija timocita

na deleciju se verovatno stiče neposredno pre njihovog napuštanja timusa što je u korelaciji sa ekspresijom Bcl-2 molekula. Rezultati istraživanja na transgenim životinjama su pokazali da mesto delecije određuje mesto prezentacije određenog antigena u timusu (korteks ili medula) (Benoist i Mathis, 1999). Razlika u stadijumu diferentovanja na kome se dešava delecija u normalnih i transgenih miševa objašnjava se ranijom pojavom CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T $\text{CR}^{\text{jako}^+}$  timocita u transgenim miševima (Schwartz, 1993).

Istraživanjima na transgenim životinjama je pokazano da u timusu može da se indukuje tolerancija i prema tkivno specifičnim sopstvenim antigenima. U meduli timusa, na malom broju medularnih TEC je detektovano prisustvo gena za specifične antigene perifernih tkiva i organa (jetre, mozga, oka, pankreasa, tireoidne žlezde i kože). Ova ektopična ekspresija tkivno-specifičnih antigena na medularnim TEC nazvana je "promiskuitetna ekspresija" (Derbinski i sar., 2005, Derbinski i sar., 2001, Klein i Kyewski, 2000, Klein i sar., 2014). Broj medularnih TEC koje ispoljavaju pojedine takve antigene iako veoma mali, 1-3% ovog tipa ćelija (npr. 50-500 ćelija za somatostatin u celom timusu), dovoljan je za indukciju tolerancije (Klein i Kyewski, 2000). Za sada jedini identifikovani molekularni regulator ovog procesa, koji kontroliše ekspresiju gena koji se striktno povezuju sa perifernim tkivima na subpopulaciji medularnog epitela timusa, nazvan je AIRE (engl. *Autoimmune regulator*) od autoimunski regulator (Abramson i sar., 2010, Klein i Kyewski, 2000).

Smatra se da nasuprot pozitivnoj selekciji koja može biti posledica interakcije timocita i jedne jedine kortikalne TEC (Merkenschlager, 1996, Merkenschlager i sar., 1994), procesu negativne selekcije timocita prethode mnogobrojne interakcije timocita i medularnih TEC i TDC (Klein i Kyewski, 2000).

Na pitanje kako je moguće formiranje specifičnog repertoara T limfocita ako se u toku oba selekciona procesa na identičan način vrši prepoznavanje kompleksa antigenski peptid/sopstveni MHC molekul još uvek nema adekvatnog molekularnog objašnjenja. Postoji nekoliko teorija od kojih ni jedna na zadovoljavajući način ne može da objasni brojne, ponekad i kontradiktorne rezultate iz ove oblasti. Teoriju koja ima najviše pristalica i do danas nije opovrgnuta predložili su Sprent i Webb 1987. Prema ovoj **afinitetno (aviditetnoj)** teoriji kvantitativne razlike u afinitetu/aviditetu TCR

ispoljenog na nezrelim timocitima za peptid/MHC kompleks na TSC određuju dalju sudbinu timocita. Niskoafinitetna interakcija ima za posledicu pozitivnu selekciju, a visokoafinitetna interakcija dovodi do negativne selekcije. Prema ovoj teoriji jedan organizam bi trebalo da poseduje funkcionalne T ćelije sa širokim repertoarom jačine vezivanja za kompleks strani peptid/sopstveni MHC molekul, koji je u rasponu afiniteta kritičnih za pozitivnu i negativnu selekciju (Sprent i sar., 1988, Sprent i Webb, 1987). I zaista, veliki broj eksperimentalnih nalaza pokazuju da jačina TCR-peptid/MHC interakcije diktira ne samo jačinu odgovora već i kvalitet odgovora, utičući na sudbinu i diferentovanje T limfocita tokom imunskog odgovora (Vrisekoop i sar., 2014). Varijanta afinitetnog modela je model tzv. **gustine antigenskih determinanti** koji se razlikuje od prethodnog po tome što u selekzione procese uvodi pojam relativne gustine kompleksa peptid/MHC molekul. Autori pretpostavljaju da pozitivna i negativna selekcija zavise od broja angažovanih TCR, odnosno od gustine sopstvenih peptida asociranih sa MHC molekulima na timusnim APC (peptid prisutan u maloj gustini-pozitivna selekcija; velika gustina peptida-negativna selekcija a gustina peptida ispod kritične tačke-nemogućnost selekcije). Ovim modelom se može objasniti različit potencijal obrade i prezentacije sopstvenih peptidnih antigena u sklopu MHC molekula između različitih timusnih APC. Timusne DC, makrofage i eventualno mala populacija B limfocita, koje su i na periferiji moćne APC, omogućavaju prezentaciju znatno veće gustine sopstvenih peptida na MHC molekulima i zbog toga su ove ćelije moćni medijatori negativne selekcije (klonske delecije). S druge strane, TEC imaju manju efikasnost proteolitičke obrade antigena i njegove asocijacije sa MHC molekulima pa su bolji medijatori pozitivne selekcije (Bevan, 1984). Po trećoj alternativnoj teoriji tzv. **peptidnom modelu** (Marrack i Kappler, 1988) u procesima selekcije primarni značaj ima priroda sopstvenih peptida. Autori smatraju da različite APC u timusu prezentuju različiti set sopstvenih peptida. Za pozitivnu selekciju je posebno značajan set tkivno-specifičnih peptida prisutnih na kortikalnim TEC koji nisu prisutni na drugim tkivima u organizmu. Stoga ne postoji potreba za delecijom timocita koji su pozitivno selekcionisani na tim ćelijama. Nasuprot njima, APC u meduli, prevashodno TDC ispoljavaju ubikvitarne peptide i indukuju klonsku deleciju timocita čiji su TCR specifični za ove peptidne antigene. Četvrti model, nazvan **razlika u signalizaciji** zasniva se na činjenici da kontakt TCR-peptid/MHC molekul nije sam po sebi dovoljan za aktivaciju T ćelija već su za to potrebni

kostimulatorni signali. U odsustvu kostimulatornih signala dolazi do anergije T ćelija. Na osnovu ovih saznanja postavljena je hipoteza da kostimulatorni signali regulišu i procese selekcije u timusu. Kortikalne TEC kao slabi kostimulatori su uključene u procese pozitivne selekcije (koja se zasniva samo na specifičnom prepoznavanju preko TCR-a) dok TDC (i druge timusne nelimfoidne ćelije hematopoetskog porekla) ispoljavaju brojne kostimulatorne molekule i mogu da regulišu procese i pozitivne i negativne selekcije (Nikolić-Žugić, 1994b). Po drugoj varijanti ovog modela **stadijum diferentovanja timocita** određuje procese selekcije. Najpopularnija hipoteza ovog tipa poznata je kao **hipoteza odvojenog receptora**. Prema ovoj teoriji pozitivna selekcija se dešava na nezrelim timocitima na kojima su TCR i CD3 fizički odvojeni tako da prenos signala preko TCR omogućuje samo delimičnu aktivaciju. Negativna selekcija se dešava na zrelijim timocitima koji ispoljavaju funkcionalan TCR/CD3 kompleks čije angažovanje dovodi do potpune aktivacije timocita čiji je krajnji rezultat AICD (Finkel i sar., 1991).

Na temeljima prethodno iznetih teorija selekcije i dosadašnjih saznanja nedavno su predložena dva osnovna modela selekcije. Prvi, **kvantitativno/aviditetni** model pretpostavlja da je pozitivna selekcija posledica niskoaviditetne interakcije timocita sa APC timusa, a negativna selekcija rezultat visokoaviditetne interakcije između navedenih populacija ćelija. Glavni faktori koji utiču na aviditet reakcije i sledstvenu sudbinu timocita su koreceptorni i adhezivni molekuli (koji utiču na trajanje i/ili jačinu signala koji se ostvaruju angažovanjem TCR-a) i solubilni faktori koji se sintetišu u timusu (citokini, glukokortikoidi). Pretpostavlja se da je ključni parametar koji određuje sudbinu timocita afinitet TCR za kompleks peptid/MHC i ukupna avidnost TCR za ligande ispoljene na TSC. Smatra se da višestruke interakcije TCR-ligand slabog afiniteta ili malobrojne interakcije visokog afiniteta obezbeđuju dovoljnu avidnost za indukciju signalne kaskade neophodne za pozitivnu selekciju. Za dostizanje praga neophodnog za indukciju tolerancije potrebni su jači signali. U prilog ovom modelu su i nalazi da različite koncentracije istog peptida mogu posredovati i pozitivnu i negativnu selekciju (Sebzda i sar., 1999).

Drugi **kvalitativno/peptidni** model pretpostavlja da kvalitativno različiti peptidi ostvaruju jedinstvene signale i pokreću pozitivnu i negativnu selekciju. U prilog ovom modelu su rezultati eksperimenata na transgenim miševima kojima je pokazano da nestimulatorni peptid antagonista omogućava pozitivnu selekciju a stimulatorni peptid

agonista izaziva klonsku deleciju. Ovaj model podržavaju i studije sa tzv. izmenjenim peptidnim ligandima kojima je pokazano da interakcija sa takvim ligandima izaziva pokretanje različitih intracelularnih signala (slabiju fosforilaciju  $\zeta$  lanca i gubitak aktivnosti ZAP-70). Direktna asocijacija antagonističkih peptida i pozitivne selekcije dovedena je u pitanje nalazima da antagonistički peptidi indukuju klonsku deleciju, inhibiraju negativnu selekciju ili inhibiraju razvoj T ćelija. Ispitivanja signalnih puteva asociiranih sa izmenjenim peptidnim ligandima nisu potvrdila koncept da antagonistički peptidi imaju sposobnost indukcije jedinstvenog signala. Pokazano je da niz izmenjenih peptidnih ligandima koji se funkcionalno rangiraju od agonista do antagonista može indukovati kvantitativno različite intracelularne signale. Drugim rečima, izmenjeni peptidni ligandi se ne mogu svrstati u apsolutne kategorije već se pretpostavlja da formiraju "gradijent" od antagonista preko parcijalnih agonista do agonista T ćelija (Palmer, 2003, Sebza i sar., 1999).

## DENDRITSKE ĆELIJE TIMUSA

U ukupnoj ćelijskoj masi timusa, TDC čine 0,5%. Dendrimske ćelije timusa se mogu svrstati u tri glavne klase, od kojih dve pripadaju konvencionalnim DC, koje se još nazivaju i klasične DC (cDC) a ostale pripadaju plazmacitoidnim DC (pDC) (Wu i Shortman, 2005). Heterogenost TDC nameće više pitanja koja se intezivno istražuju. Jedno od ključnih je moguća funkcionalna specijalizacija pojedinačnih subsetova TDC.

### Rezidentne i migratorne cDC

Oko dve trećine konvencionalnih TDC se mogu klasifikovati kao  $CD11c^{jako+}CD45RA^{-}$  ćelije. One se dalje, na osnovu različite ekspresije  $CD8\alpha$  i signalnog regulatornog proteina- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ , poznat i kao CD172a), mogu podeliti na  $CD8\alpha^{+}SIRP\alpha^{-}$  (oko dve trećine) i  $CD8\alpha^{-}SIRP\alpha^{+}$  (jedna trećina). Smatra se da  $CD8\alpha^{+}SIRP\alpha^{-}$  nastaju u intratimusnom putu diferentovanja i smatraju se rezidentnim cDC (Li i sar., 2009). One su fenotipski vrlo slične perifernim  $CD8\alpha^{+}$  cDC koje su naročito efikasne u prezentaciji egzogenih antigena u kontekstu MHC molekula I klase (unakrsna prezentacija) (Joffre i sar., 2012). Istraživanjima u *in vitro* uslovima je pokazano da timusne  $CD8\alpha^{+}SIRP\alpha^{-}$  takođe imaju kapacitet unakrsne prezentacije

antigena (Proietto i sar., 2008). Rezidentne cDC prezentuju sopstvene antigene koji potiču iz timusne mikrosredine (Klein i sar., 2014).

Manja populacija timusnih cDC,  $CD8\alpha^{-}SIRP\alpha^{+}$  se smatra migratornom populacijom cDC koja u timus dolazi sa periferije (Li i sar., 2009). Migratorne cDC mogu da prezentuju periferne sopstvene antigene koje su transportovale u timus ili da prezentuju antigene koji potiču iz krvi (Klein i sar., 2014).

Konvencionalne, rezidentne DC su dominantno prisutne u meduli timusa i značajno manje u korteksu. Nedavno je pokazano da je XCL1 (XC hemokinski ligand 1), poznatiji kao limfotaktin, ključni faktor medularne lokalizacije TDC. XCR1, receptor za XCL1, je ispoljen na  $CD8\alpha^{+}$  cDC. Kako su medularne TEC jedine TSC koje proizvode XCL1 (na AIRE-zavisani način), pretpostavlja se da XCL1/XCR1 hemokinska osa reguliše blisku prostornu lokalizaciju cDC i medularnih TEC (Lei i sar., 2011).

U kretanju migratornog ( $CD8\alpha^{-}SIRP\alpha^{+}$ ) subseta cDC ka timusu važnu ulogu ima CCR2 (Baba i sar., 2009). S druge strane, izgleda da ovaj hemokinski receptor nema značajnu ulogu u intratimusnoj poziciji cDC. Migratorne cDC mogu da se akumuliraju, osim u meduli, i u korteksu u blizini malih krvnih sudova kao i u kortikomedularnoj zoni (Klein i sar., 2014).

### **Plazmocitoidne DC**

Oko 30% svih TDC su pDC. One ulaze u timus kao migratorna populacija iz perifernih područja organizma, što ukazuje na blisku linijsku povezanost između perifernih i timusnih pDC (Li i sar., 2009). Kako pDC na periferiji imaju važnu zaštitnu ulogu u anti-virusnoj odbrani (produkcijom interferona tipa I), prisustvo pDC populacije u timusu ukazuje na sličnu mogućnost, odnosno aktivnost urođene imunosti u primarnom limfnom organu (Klein i sar., 2014).

Pretpostavljalo se da pDC nemaju značajnu ulogu u centralnoj toleranciji, primarno na osnovu ranijih nalaza da ove ćelije imaju slab antigen-prezentujući kapacitet (Villadangos i Young, 2008). Međutim, novija istraživanja dovode u pitanje ovu pretpostavku. Naime, pokazano je da timusne pDC imaju sposobnost da prezentuju peptidne antigene specifičnim timocitima i da podstaknu njihovo diferentovanje u

regulatorne T (Treg) limfocite *in vitro* (Wirnsberger i sar., 2009). Takođe, pokazano je da su pDC iznenađujuće efikasne u preuzimanju solubilnih ili čvrstih antigena na periferiji i njihovom transportu u timus *in vivo* (Klein i sar., 2014).

CCR9 koji kontroliše naseljavanje progenitora T ćelija u timus je takođe neophodan za regrutovanje pDC u timus (Hadeiba i sar., 2012). Posebnu važnost ima subpopulacija CCR9<sup>+</sup> nezrelih pDC koja u perifernim limfnim tkivima ima tolerogena svojstva (podstiče nastanak indukovanih Treg limfocita) i takvu funkciju bi mogla imati i u timusu (Hadeiba i sar., 2008).

## EPITELNE ĆELIJE TIMUSA

### Morfološke i ultrastrukturne karakteristike TEC

Epitelne ćelije timusa su nelimfoidne, sesilne ćelije koje grade trodimenzionalnu mrežu u kojoj su smeštene ostale ćelije timusa. Čine populaciju izrazito heterogenih ćelija koje se razlikuju kako po morfologiji i fenotipu, tako i po funkcionalnim svojstvima. U odnosu na topografske zone timusa kojima pripadaju dele se na SK, kortikalne, medularne i epitelne ćelije Hasalovih tela (HT). Primenom metoda elektronske mikroskopije, TEC čoveka, pacova i miša su detaljnije okarakterisane i pokazana je njihova detaljna ultrastruktura (Kendall, 1986, Ushiki, 1986, van Ewijk, 1988, von Gaudecker i sar., 1986).

van de Wijngaert i sar. (1984) su 1984. godine na osnovu ultrastrukturne analize, podelili **humane** epitelne ćelije timusa na šest tipova, a Brita von Gaudecker i sar. (1986) su dve godine kasnije opisali postojanje sledeće četiri grupe epitelnih ćelija u timusu čoveka:

**I grupa-TEC površinskog korteksa (subkorteksa)** su pločaste ćelije koje obavijaju pseudolobuluse i perivaskularne prostore (PV) u korteksu i meduli. Ovom opisu odgovara tip 1 epitelnih ćelija humanog timusa koje je Wijngaert okarakterisao kao SK-PV, nepravilnog oblika i izduženih citoplazmatskih produžetaka. Imaju heterohromatinsko jedro, a u citoplazmi mnoštvo tonofilamenata i sekretorne granule koje sadrže timusne hormone (Ritter i Crispe, 1992, van de Wijngaert i sar., 1984, von Gaudecker i sar., 1986).

**II grupa -TEC korteksa** su ćelije srednjeg i spoljašnjeg korteksa sa velikim i svetlim jedrom i uglavnom svetlom citoplazmom. Njihovi nastavci nekada mogu biti toliko dugi da dosežu do bazalne membrane (von Gaudecker i sar., 1986). Prema podeli Wijngaert-a i sar. u korteksu se nalaze tip 2, 3 i 4 epitelnih ćelija, za koje se smatra da predstavljaju različite stupnjeve diferencijacije jedne vrste ćelija. Ćelije koje pripadaju tipu 2 nalaze se u srednjem i spoljašnjem korteksu. Poseduju svetlu citoplazmu, veliko ovoidno euhromatinsko jedro, dobro razvijen Goldži aparat i male tamne inkluzije (van de Wijngaert i sar., 1984). U okviru ovog tipa opisane su ćelije sa jedrom veličine 6.8-10  $\mu\text{m}$  i jednim ili dva jedarca (Kendall, 1986). Tip 3 epitelnih ćelija ima sličnu distribuciju, nalazi se u srednjem i dubokom korteksu. Ove ćelije nepravilnog jedra, ograničenog heterohromatinom, u citoplazmi sadrže vakuole, endoplazmatski retikulum i brojne tonofilamente. Smatra se da *in vivo* drugi i treći tip epitelnih ćelija formiraju tzv. timusne ćelije dadilje (engl. *thymic nurse cells* – TNC). U dubokom korteksu Wijngaert i sar su opisali tip 4 epitelnih ćelija. Iste ćelije se nalaze i u meduli, imaju nepravilno, heterohromatinsko jedro, duge citoplazmatske produžetke, a u tamnoj citoplazmi sadrže mnogobrojne tonofilamente, mitohondrije, vakuole i sekretorne granule. Neki autori smatraju da one predstavljaju ćelije sa znacima degenerativnih promena (Boyd i sar., 1993).

**III grupa-TEC medule** su ćelije zvezdastog oblika, sa dugim citoplazmatskim nastavcima, heterohromatinskim jedrom nepravilnog oblika, imaju tamnu citoplazmu i brojne tonofilamente. Neke od ovih ćelija se sreću i u unutrašnjem korteksu i u bliskoj vezi sa svetlim kortikalnim ćelijama. Opis ove grupe odgovara prethodno navedenom četvrtom tipu epitelnih ćelija. Wijngaert i sar. su u meduli humanog timusa definisali dva tipa epitelnih ćelija. Tip 5 su nediferencirane ćelije koje se u malim grupama nalaze u meduli i kortikomedularnoj zoni. Imaju ovoidno jedro bogato heterohromatinom i malo organela u citoplazmi. Tip 6 su velike, svetle medularne ćelije sa ovalnim euhromatinskim ili heterohromatinskim jedrom, dobro razvijenim citoplazmatskim organelama, brojnim tonofilamentima i tubularnim strukturama. Za brojne sekretorne granule u blizini plazma membrane se smatra da sadrže timusne hormone.

**IV grupa-TEC HT.** Hasalova tela (HT) grade periferne, hipertrofične epitelne ćelije sa velikim svetlim jedrom i brojnim tonofilamentima i centralno postavljene ćelije različite elektronske gustine. Smatra se da su HT krajnja faza diferencijacije



epitelnih ćelija (Ritter i Crispe, 1992, van de Wijngaert i sar., 1984, von Gaudecker i sar., 1986).

Ultrastrukturalna analiza TEC pacova (Ushiki, 1986) i miša (van Ewijk, 1988) je takođe potvrdila njihovu različitost. U korteksu timusa **pacova** Ushiki je opisao zvezdaste ćelije sa dugim citoplazmatskim nastavcima kojima se međusobno spajaju. U citoplazmi imaju vakuole veličine 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ , a većina i fini granulirani sadržaj. Na periferiji korteksa nastavci ovih ćelija formiraju kontinuirani sloj oslanjajući se na bazalnu membranu. Takođe, one obavijaju i kapilare korteksa. U meduli je epitelna mreža složenija i epitelne ćelije ove zone Ushiki je podelio na dve grupe: a) zvezdaste ćelije sa tankim produžecima koje obrazuju finu mrežu u meduli i b) velike ćelije koje u citoplazmi imaju vakuole različite veličine. Na unutrašnjoj membrani pojedinih vakuola postoje prstoliki produžeci (mikrovili). One se često spajaju sa susjednim ćelijama istog tipa. Nalaze se međusobno grupisane ili u skupinama sa zvezdastim ćelijama medule.

Deset godina nakon ove studije De Wall i Rademarkes su dali novu podjelu TEC pacova. Na osnovu ultrastrukturnih karakteristika ovi autori su u korteksu identifikovali četiri podtipa TEC koje su označili kao EC.1-4 a u meduli šest tipova TEC koje su označili EC.1-6. Podtip *EC.1* nalazi se u SK regionu korteksa i PV medule. Sledeća tri tipa TEC su definisana na osnovu stepena elektronske gustine citoplazme kao svetle (*EC.2*), intremedijerne (*EC.3*) i tamne (*EC.4*) i opisane su i u korteksu i u meduli. Podtipovi 5 i 6 se nalaze samo u meduli. *EC.5* pokazuju ultrastrukturne karakteristike nediferenciranih ćelija a *EC.6* ispoljavaju snažnu metaboličku aktivnost. Kortikalne i medularne EC.2-4 se međusobno razlikuju prema prisustvu tonofilamenata koji su zastupljeniji u medularnim podtipovima 2 i 3. Najzastupljeniji podtipovi su EC.2 (60% u korteksu i 36% u meduli) i EC.3 (25% u korteksu i 54% u meduli). Iste godine Milićević i Milićević su u timusu normalnog pacova opisali sedam tipova TEC (četiri u korteksu i tri u meduli): tip 1, "subkapsularno/paraseptalno/perivaskularne"; tip 2 "svetle" smeštene u spoljašnjim regionima timusnog parenhima; tip 3 "intermedijarne" locirane u srednjem i dubokom korteksu; tip 4 "tamne" u dubokom korteksu i kortikomedularnoj zoni; tip 5 "nediferentovane" najčešće locirane u kortikomedularnoj zoni ali se mogu zapaziti i u meduli; tip 6 "velike medularne" epitelne ćelije smeštene u

kortikomedularnoj zoni i meduli i tip 7 "vretenaste" koje su najbrojnije ćelije medule (Milicevic i Milicevic, 1997).

Epitelne ćelije timusa miša se prema strukturnim karakteristikama mogu podeliti na najmanje tri tipa (van Ewijk, 1988, van Ewijk, 1991). Pretežno kortikalne, zvezdaste ćelije slične onima opisanim u korteksu timusa pacova; medularne, voluminoznije, ovalnog oblika, kratkih citoplazmatskih produžetaka, sa brojnim sekretornim organelama u citoplazmi i medularne ćelije koje su po obliku slične prethodnom tipu.

### **Fenotipska heterogenost TEC**

Pored morfološke i ultrastrukturne raznolikosti dodatna heterogenost epitelnih ćelija u okviru navedenih topografskih zona timusa otkrivena je korišćenjem citokeratinskih i monoklonskih antitela (mAt) koja prepoznaju različite antigene na TEC (Colic i sar., 1989, Kampinga i sar., 1989).

Na osnovu imunohistohemijskog obrasca bojenja u timusu i drugim organima, antitela koja obeležavaju TEC (anti-TEC antitela) su grupisana u pet glavnih grupa, klastera (engl. *clusters of thymic epithelial staining* - CTES) (Brekelmans i van Ewijk, 1990, Kampinga i sar., 1989).

CTES I su panepitelna mAt. CTES II mAt se vezuju za SK/PV i većinu medularnih TEC. CTES III detektuju razne molekule na kortikalnim TEC. CTES IV mAt obeležavaju medularne TEC i HT, dok CTES V prepoznaju jedino HT. Unutar svake grupe zapažena je dodatna heterogenost mAt (Brekelmans i van Ewijk, 1990, Kampinga i sar., 1989).

U laboratoriji Instituta za medicinska istraživanja (IMI) Vojnomedicinske akademije (VMA) ranije je produkovan panel mAt koja specifično prepoznaju epitel timusa pacova. Pojedina među ovim antitelima su svrstana u CTES klasifikaciju. Imunohistohemijskim metodama, primenom ovih mAt, potvrđena je heterogeneost TEC pacova. Pokazano je da su TEC koje ispoljavaju R-MC13 - R-MC 17, PT10B7 i R-TNC 2G9 antigene fenotipski različite od SC/PV TEC. SC/PV TEC, koje specifično prepoznaju mAt R-MC18-R-MC20 i mAt PT13D11 dele zajedničke antigene sa većinom medularnih TEC. Nasuprot ovome, pojedine medularne TEC, uključujući HT poseduju

sopstveni antigenski profil (R-MC 22, TE-R 4F10) (Colic i sar., 1992, Colic i sar., 1988, Colic i sar., 1994, Pavlovic i sar., 1993).

Takođe, pokazano je da se različiti regioni timusnog epitela razlikuju u ekspresiji citokeratinskih (CK) polipeptida (Colic i sar., 1989), što je pokazano i za druge vrste (De Souza i Savino, 1993, Savino i Dardenne, 1988). Poznato je da citokeratini formiraju citoskeletalne intermedijerne filamente epitelnih ćelija. Oni su heterogeni proteini koji pripadaju porodici koju sačinjava najmanje 20 različitih polipeptida. CK male molekulske mase (40-56 kDa) su kiseli (tip I) dok su CK veće molekulske mase (53-68 kDa) bazni (tip II). Tip I i II CK su često specifično ispoljeni u parovima u zavisnosti od tipa epitela, perioda diferentovanja epitela ili embrionalnog razvoja (Moll i sar., 1982). Koristeći panel mAt koji prepoznaju različite CK polipeptide ili parove CK, Čolić i sar. su pokazali da je u adultnom timusu pacova CK8 panepitelni marker. SC/PV i većina medularnih TEC ispoljavaju CK7, CK16 i CK19. Kortikalne TEC i subpopulacija medularnih TEC poseduju CK18, dok je ekspresija CK10 ograničena na subpopulaciju medularnih TEC, uključujući HT (Colic i sar., 1989). Osim toga, ovi autori su pokazali da su CK različito ispoljeni u fetalnom, neonatalnom i adultnom timusu (Colic i sar., 1990).

Multimarkerska fenotipska analiza primenom dvostrukih i trostrukih obeležavanja ćelija anti-CK i/ili anti-TEC antitelima je pokazala postojanje najmanje šest fenotipski različitih TEC subpopulacija (TEC PH 1-6) u adultnom timusu pacova. Kortikalne TEC (TEC-PH 2) poseduju njihove sopstvene antigenske karakteristike. SC/PV TEC (TEC PH-1) dele zajednički fenotipski profil sa subpopulacijom medularnih TEC. Druge četiri različite TEC subpopulacije (TEC PH 3-6) su lokalizovane u meduli. TEC PH 3, 5 i 6 su tri fenotipski različite TEC subpopulacije. Među njima TEC PH 5 bi mogao biti terminalno diferentovani medularni epitel dok je TEC PH 4 verovatno stadijum diferentovanja medularnih TEC ka tipu 5 ćelija (Colic i sar., 1989). U ovom momentu nije jasno da li primećene razlike odražavaju različito poreklo TEC subpopulacija (endodermalno korteks *vs.* ektodermalno medula), različite stadijume razvoja TEC (posebno u meduli) ili predstavljaju subpopulacije sa različitim funkcijama.

Sve TEC ispoljavaju molekule I klase MHC. Molekuli II klase MHC prisutni su na skoro svim kortikalnim TEC miša, pacova i ljudi (Anderson i Takahama, 2012, De Waal i Rademakers, 1997). Ekspresija molekula MHC II na medularnim TEC je

različita kod različitih vrsta. Ovi molekuli su prisutni na TEC medule timusa miša, dok su samo pojedine TEC medule timusa čoveka (verovatno tip 5) u blizini HT (pri čemu su sama HT negativna) pozitivne (Ritter i Crispe, 1992). U pacovskom sistemu molekuli II klase MHC su slabo prisutni ili potpuno odsutni na medularnim TEC. Nasuprot nekim ranijim nalazima i SK epitel humanog i mišijeg timusa može ispoljavati molekule II klase MHC (De Waal i Rademakers, 1997).

### **TIMUSNI "CROSSTALK"**

Jedinstvena strukturna organizacija timusne strome formira se rano tokom ontogeneze. Timociti direktno utiču na integritet timusne mikrosredine i taj fenomen je označen kao timusni "crosstalk". Blokiranje diferencijacije timocita na nivou TN CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ima za posledicu gubitak tipične organizacije kortikalnih TEC tj. transformaciju trodimenzionalne u dvodimenzionalnu mrežu (karakteristika tipična za TEC koje nisu primile odgovarajući signal od timocita iz okruženja). Tercijerna konfiguracija TEC (karakteristična za timus) je neophodna za specifičnu interakciju timocita i TEC. Smatra se da TN CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> timociti prenose kortikalnim TEC signal koji dovodi do formiranja trodimenzionalne konformacije. Na ovaj način kreirana mikrosredina korteksa omogućava dalju progresiju timopoeze i sazrevanje timocita koji u sličnom kontaktu sa medularnim epitelom učestvuju u korektnom formiranju mikrosredine medule neophodne za pravilan razvoj zrelih timocita. Trenutno nije poznato da li timociti odgovorni za modelovanje TEC indukuju proliferaciju i diferencijaciju ili samo prostornu transformaciju već diferenciranog epitela. Molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovog procesa su trenutno u centru pažnje. Veruje se da su uključeni signali posredovani Wnt proteinima za koje je pokazano da regulišu proliferaciju i diferentovanje epitelnih ćelija a eksprimiraju se u različitom stepenu u zavisnosti od stadijuma diferentovanja timocita. Signali koji se razmenjuju prilikom kontakta TN timocita i TEC neophodni su i za formiranje TNC. Van Ewijk i sar. su pokazali da fenotipski definisan subset TN timocita (prelazni stadijum diferentovanja između TN CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> i TN CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) direktno utiče na brojnije formiranje TNC kompleksa i smanjenje broja fibroblasta. Novoformirane TNC verovatno pripadaju tipu I TNC a proliferišući timociti u njima su najverovatnije TN timociti na prelazu

CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> u CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> stadijum razvoja (Dzhagalov i Phee, 2012, van Ewijk i sar., 2000).

## ADHEZIVNI MOLEKULI UKLJUČENI U VEZIVANJE TIMOCITA I TEC

Kortikalne TEC ispoljavaju brojne adhezivne molekule. Većina medularnih TEC eksprimira adhezivne molekule koji se sreću i na kortikalnom epitelu. Međutim, za razliku od kortikalnih, medularne TEC ispoljavaju i kostimulacijske molekule (CD80, CD86) (Vukmanovic, 1996).

**Integrini** su molekuli uključeni u međucelijske kontakte kao i kontakte ćelija sa proteinima **ECM**. Na membrani ćelija integrini se ispoljavaju kao  $\alpha\beta$  heterodimeri. Oba lanca pripadaju tipu I transmembranskih glikoproteina. Do sada je opisano 16  $\alpha$  i 8  $\beta$  lanaca. Lanci  $\alpha$  označeni kao  $\alpha_{1-9}$ ,  $\alpha_{IIb}$ ,  $\alpha_V$ ,  $\alpha_E$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_X$  i  $\alpha_D$ . Lanci  $\beta$  su označeni brojevima  $\beta_{1-8}$ . Lanci  $\alpha$  i  $\beta$  svojim mnogobrojnim kombinacijama formiraju heterodimere sa različitim specifičnostima. Različiti  $\alpha\beta$  heterodimeri mogu da se vezuju za isti ligand. Većina integrina se vezuje za proteine ECM ali i za odgovarajuće ligande na površini ćelije (Bluestone i sar., 1999).

Najznačajniji integrini u imunskom sistemu, koji učestvuju u migraciji, proliferaciji i sazrevanju T limfocita pripadaju subfamilijama  $\beta_1$  i  $\beta_2$ .

**Subfamilija  $\beta_1$  integrina.**  $\beta_1$  integrini (raniji naziv VLA antigeni od engl. *very late activation*)  $\alpha_{1-6}/\beta_1$  (CD49a-f/CD29) vezuju se skoro isključivo za proteine ECM. Jedini član ove grupe koji se vezuje i za fibronektin i za membranski molekul VCAM-1 (CD106), vaskularni ćelijski adhezivni molekul, je  $\alpha_4\beta_1$  heterodimer poznatiji kao VLA-4 (CD49d/CD29). VLA-1, VLA-2, VLA-3 i VLA-6 su receptori za laminin, VLA-1, VLA-2 i VLA-3 za kolagen, a VLA-3, VLA-4 i VLA-5 za fibronektin (Springer, 1990). Većina humanih timocita eksprimira značajan broj VLA molekula. DN timociti su VLA- $\beta_1^+$ VLA-4<sup>+</sup>VLA-5<sup>+</sup>VLA-6<sup>+</sup> a DP timociti kao i SP timociti su VLA- $\beta_1^+$ VLA-4<sup>+</sup>VLA-5<sup>-</sup>VLA-6<sup>+</sup> (Watt i sar., 1992). Većina DN i deo DP populacije timocita su VLA-4<sup>jakot</sup>. Daljom diferencijacijom se smanjuje broj ekspimiranih VLA-4 antigena (Sawada i sar., 1992). Podaci o ekspresiji  $\beta_1$  integrina na TEC se razlikuju. Više autora je pokazalo da se

VLA-4, VLA-5 i VLA-6 nalaze na TEC. Na TNC je pokazano prisustvo VLA-5 i VLA-6 molekula (Savino i sar., 2000). S obzirom na distribuciju komponenata ECM u timusu veruje se da  $\beta_1$  integrini imaju važnu ulogu u migraciji timocita kroz bazalne membrane ili kretanju unutar parenhima timusa. Distribucija proteina ECM u timusu različitih vrsta ostala je konzervirana u evolutivnom smislu. Kolagen tip I nalazi se u septama, tip IV kolagena, fibronektin i laminin u bazalnim membranama i u obliku fine mreže u meduli. Male količine proteina ECM nalaze se u korteksu i u okviru TNC. Laminin i fibronektin pojačavaju spontani izlazak timocita iz TNC, a antitela koja blokiraju ove proteine ECM i njihove receptore sprečavaju rekonstituciju TNC kompleksa (Savino i sar., 1993).  $\beta_1$  integrini učestvuju u adheziji timocita za TEC. Adhezija DN timocita za kloniranu TSC liniju (MRL104.8a) koja indukuje diferencijaciju ovih timocita, skoro se u potpunosti može blokirati dodatkom anti-fibronektinskih antitela, što ukazuje na značaj interakcije fibronektin (TSC)-fibronektin receptor (DN timociti) u diferentovanju timocita (Utsumi i sar., 1991). U timusu čoveka postoji jedinstvena subpopulacija kortikalnih DP timocita koja ispoljava konstitutivno aktivnu formu VLA-4, pomoću koje se ovi timociti vezuju za fibronektin ili VCAM-1 (Salomon i sar., 1994). VCAM-1 je selektivno ispoljen na kortikalnim TEC i TEC kortikomedularne zone humanog timusa i mogao bi biti ligand VLA-4 ispoljenom na prethodno opisanoj populaciji DP timocita. U timusu čoveka fibronektin je dominantno prisutan u meduli i mogao bi imati ulogu u regulaciji migracije uspešno selekcionisnih kortikalnih timocita (Salomon i sar., 1997). Postojanje konstitutivno aktivnog VLA-4 molekula u ranim fazama diferentovanja T limfocita potvrdili su i drugi autori koji su pokazali da populacija timocita koja ispoljava ovaj molekul ima povećan aviditet za VCAM-1<sup>+</sup> TSC. Među DN timocitima VLA-4 je najjače ispoljen na CD25<sup>+</sup> timocitima na kojima je detektovano prisustvo i  $\alpha_5$  lanca  $\beta_1$  integrina (Dalmau i sar., 1999). Intracelularni signalni putevi aktivirani adhezijom ćelija za specifične molekule ECM identifikovani su u različitim tipovima ćelija (T i B limfocitima, NK ćelijama, trombocitima, fibroblastima i dr.) (Schlaepfer i sar., 1999). U T limfocitima angažovanje  $\beta_1$  integrina praćeno je koordinisanom aktivacijom Syk, Src i Tec familija PTK i PI3K i promenama u aktinskom citoskeletu (Woods i Shimizu, 2001).

Guinta i saradnici su opisali integrin koji pripada VLA familiji a koji grade  $\beta_1$  lanac i novi  $\alpha$  lanac (Giunta, 1991). Ovaj molekul je ispoljen na površini medularnih TEC i uključen je u adheziju između TEC i timocita, ali ne i T limfocita periferne krvi.

**Subfamilija  $\beta_2$  integrina** (leukointegrini) (CD11a,b,c/CD18) su funkcionalno najheterogenija podgrupa integrina, pretežno eksprimirani na leukocitima. Vezuju se za različite površinske molekule, proteine ECM i neke solubilne komponente krvi. Jedan od najznačajnijih adhezivnih molekula leukocita uključujući i T limfocite, pripadnik ove familije, je LFA-1 (CD11a/CD18). Ligandi za LFA-1 su intercelularni adhezivni molekuli (ICAM) kojih ima tri (ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3).  $\beta_2$  integrinima pripadaju i Mac-1(CD11b/CD18) i p150/95(CD11c/CD18) (Bluestone i sar., 1999).

**Adhezivni molekuli iz superfamilije imunoglobulina.** Molekuli koji su svrstani u ovu superfamiliju imaju istaknutu ulogu u međucelijskim vezivanjima kako tokom normalnog funkcionisanja imunskog sistema tako i u stanjima inflamacije. Najvažniji članovi iz grupe **intercelularnih adhezivnih molekula** su ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) i ICAM-3 (CD50). ICAM-1 transmembranski glikoprotein (90-115 kDa) eksprimiran je na monocitima, NK ćelijama, limfocitima, DC, endotelnim ćelijama krvnih sudova (uključujući HEV), timocitima. IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  stimulišu ekspresiju ICAM-1 molekula na limfoidnim, epitelnim i endotelnim ćelijama, a IL-2 na T limfocitima i NK ćelijama (Patarroyo, 1991, Shavach, 1993). ICAM-2 je glikoprotein (55-65 kDa) ispoljen na endotelnim ćelijama, mirujućim limfocitima i monocitima (de Fougerolles i sar., 1991). Na ovčijim timocitima je pokazana slaba ekspresija ICAM-2 molekula (Zhao i sar., 2001). Njegova se pojava ne može indukovati prisustvom inflamatornih citokina (Nortamo i sar., 1991). ICAM-3 je ispoljen na limfocitima, monocitima, timocitima (Martinez-Caceres i sar., 1996). Ovaj molekul pokazuje 48% sličnosti sa ICAM-1 i 31% sličnosti sa ICAM-2 molekulom. Više je eksprimiran na mirujućim limfocitima i monocitima od ostala dva LFA-1 liganda i smatra se da ima važnu funkciju u započinjanju imunskog odgovora (Shavach, 1993). ICAM-4 je ispoljen na eritrocitima i eritroidnim prekursorima a ICAM-5 na ćelijama sive mase telencefalona. Njihova funkcija je za sada je malo poznata (Bluestone i sar., 1999).

Mnogobrojna *in vitro* ispitivanja su potvrdila značaj LFA-1/ICAM-1 zavisnog puta u interakciji timocita i TEC i ranim fazama diferentovanja mišijih timocita (Shaw i Luce,

1987, Singer i sar., 1990). Između 14. i 15. dana fetalnog razvoja miša 40-50% timocita su LFA-1<sup>+</sup>/ICAM-1<sup>+</sup>. Do 16. dana više od 90% fetalnih timocita je LFA-1<sup>+</sup>/ICAM-1<sup>jak<sup>o+</sup></sup>. Sa daljom diferencijacijom timociti gube ICAM-1 molekul pa su tako DN ćelije ICAM-1<sup>jak<sup>o+</sup></sup> a DP timociti ICAM-1<sup>slabo<sup>+</sup></sup> (Fine i Kruisbeek, 1991).

Integrini su **bidirekcionalni** signalni receptori sposobni da detektuju promene u vanćelijskom miljeu i da te informacije prenesu u unutrašnjost ćelije (engl. *outside-in signal*). Sa druge strane intracelularni signali mogu da regulišu adhezivni kapacitet integrina (engl. *inside-out signal*). Drugim rečima, intracelularni signali indukovani jednim membranskim receptorom dovode do funkcionalne aktivacije drugog molekula. Ovaj fenomen je glavna odlika ćelijske adhezije i naročito je značajan u imunskom sistemu u kome integrini imaju vrlo važnu funkciju u interakciji sa APC (Bluestone i sar., 1999).

Na različitim subpopulacijama TEC su ispoljeni i različiti lektini (Wiley i sar., 1990). Jedan od njih, galektin 1, sintetišu humane TEC. Ovaj lektin se vezuje za oligosaharidne ligande na površini timocita i T limfoblastoidnih ćelija. Vezivanje timocita za TEC *in vitro* je u ovom istraživanju inhibiralo poliklonsko antitelo na galektin 1 i dva mAt koja prepoznaju ugljenohidratne epitope na CD43 i CD45 ispoljenim na nezrelim ali ne i zreлим timocitima (Baum i sar., 1995). Ovi su rezultati ukazali da galektin 1 može biti važan za interakciju timocita sa TEC u korteksu.

## NOVI ADHEZIVNI MOLEKULI

Ranija istraživanja su pokazala da humane i mišije TEC ispoljavaju potencijalni ligand za CD6. CD6 je transmembranski protein tip I ispoljen na timocitima, zreлим T ćelijama, subpopulaciji B ćelija i pojedinim ćelijama mozga. U panelu anti-CD6 mAt, jedno mAt je ispoljilo sposobnost delimičnog blokiranja vezivanja timocita za TEC. Ligand za CD6 molekul na TEC je okarakterisan kao novi adhezivni molekul, molekulske mase 100-105 kDa, nazvan ALCAM (engl. *activated leukocyte cell adhesion molecule*) jer je ispoljen na aktivisanim leukocitima i drugim ne-limfnim ćelijama (Bowen i sar., 1995). Antigen slične molekulske mase (107 kDa) su identifikovali i Kina i saradnici (Kina i sar., 1991) na mišjoj timusnoj stromalnoj



ćelijskoj liniji primenom poliklonskog antiseruma. Nije poznato da li je ovaj adhezivni molekul identičan, sličan ili različit od ALCAM molekula.

Takođe, opisana su i dva nova adhezivna molekula za koja je pokazano da imaju ulogu u vezivanju timocita za kortikalne i medularne TEC linije. Prvi adhezivni molekul koji je nazvan 4F1, je ispoljen na kortikalnim TEC ali ne i na medularnim TEC u mišjem timusu. Autori su koristeći *western*-blot pokazali da se molekul za koji se 4F1 vezuje ispoljava u 4 forme: 29, 32, 40 i 43 kDa. Sve forme sadrže N-vezani ugljenohidratni deo i mogu postojati u formi transmembranskog molekula i fosfatidilinozitol-vezanoj konfiguraciji. Molekulska i funkcionalna karakterizacija su ukazivale da je 4F1 antigen novi adhezivni molekul uključen u vezivanje timocita za TEC *in vitro* i da može biti uključen u proces intratimusne diferencijacije T limfocita (Imami i sar., 1992). Drugi molekul, koga su identifikovali Couture i saradnici je prisutan na timusnim medularnim TEC koje selektivno vezuju CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocite. Ovaj adhezivni molekul je sastavljen od dva nekovalentno povezana glikoproteina molekulske mase 23 kDa i 45 kDa. Za vezivanje timocita neophodno je prisustvo oba glikoproteina. Heterodimer je povezan sa glikoproteinom molekulske mase 90 kDa. U daljim istraživanjima autori su pokazali da gp23/45-posredovan kontakt sa timocitima indukuje *de novo* fosforilaciju tirozina gp90 (verovatno autofosforilacijom), što je ukazalo da je protein tirozin kinaza odgovorna za neofosforilaciju gp90 i sama integralni deo adhezivnog kompleksa (Couture i sar., 1990).

Čolić i saradnici (Čolić, 1997) su tokom karakterizacije panela mAt koji specifično prepoznaju antigene ispoljene na TEC linijama pacova identifikovali dva mAt (1D6 i 4D1) koja delimično inhibiraju vezivanje timocita za ćelije medularne ali ne i za ćelije kortikalne TEC linije. 1D6 mAt *in situ* obeležava i kortikalni i medularni epitel kao i subpopulaciju timocita. Osim toga, ovo antitelo se vezuje za nervno tkivo i pojedine stromalne i hematopoetske ćelije u različitim organima. Ćelije medularne TEC linije (TE-R2.5) snažno ispoljavaju 1D6. Istovremeno, nestimulisane i IFN- $\gamma$ -stimulisane ćelije kortikalne TEC linije (R-TNC.1) su slabo pozitivne što je mogao biti jedan od razloga činjenice da ovo antitelo nije uticalo na vezivanje timocita za kortikalne TEC. Imunoprecipitacijom lizata TE-R2.5 ćelija dobijena je jasna traka od 135 kDa. Pojedine od ovih karakteristika ukazuju da bi 1D6 moglo da detektuje pacovski ekvivalent mišjeg adhezivnog molekula nervnih ćelija (NCAM) za koga je

pokazano da ima ulogu i u homotipskoj i u heterotipskoj adheziji timocita u timusu mehanizmima homofilnih interakcija (Brunet i sar., 1989). Međutim, da bi se potvrdila ova hipoteza neophodno je kloniranje 1D6 antigena.

Drugo opisano mAt, 4D1, vezuje se za medularne TEC (TE-R 2.5). In situ, ono obeležava SC i medularni epitel i makrofage, dok su timociti negativni. Osim toga, pojedine epitelne ćelije i komponente intersticijuma drugih organa su takođe pozitivne. Za sada nema podataka o prirodni antigena koji prepoznaje 4D1 mAt.

### **ZAJEDNIČKI (“SHARED”) MOLEKULI**

Tehnologija produkcije mAt je omogućila otkriće različitih novih antigenskih determinanti na TEC (Lackmann i Boyd, 2008, Munoz i sar., 2002, Pasquale, 2008). Neočekivano, veliki broj ovih molekula su bili prisutni i na TEC i na timocitima. Detaljnijim istraživanjima je potvrđeno da oba tipa ćelija ove molecule sintetišu *de novo*. Takođe, pokazano je da su antigeni koji su detektovni na obe populacije ćelija identični i da se ne radi o unakrsno-reaktivnim epitopima. Značaj postojanja molekula koji “dele” dva tipa interagujućih ćelija nije do kraja jasan. Oni bi mogli biti uključeni u homotipsko ili heterotipsko vezivanje sa istom ili komplementarnom strukturom na površini druge ćelije. Alternativno, ovi molekuli mogu delovati kao receptori za solubilne ligande koji se proizvode autokrinim ili parakrinim mehanizmima (Boyd i sar., 1993, Ritter i Boyd, 1993).

Jedan takav zajednički molekul su okarakterisali u pacovskom sistemu Kinebuchi i saradnici primenom mišjeg mAt nazvanog 7D3. Pomenuti antigen je ispoljen na timusnom epitelu i većini timocita. 7D3 mAt prepoznaje polipeptid od 80 kDa na oba tipa ćelija, ali izgleda da je ovaj molekul različito glikoziliran na ove dve populacije ćelija. 7D3 je okarakterisan kao novi adhezivni molekul jer ima sposobnost da inhibira agregaciju timocita indukovanu forbolskim estrima i adheziju timocita ili ćelija timusnog limfoma za TEC. Interakcija je posredovana vezivanjem 7D3 antigena na TEC za neidentifikovani ligand za 7D3 na timocitima (Kinebuchi i sar., 1991).

Čolić i saradnici su takođe identifikovali dva antigena pomoću mAt G7E6 i mAt 3F10 koji su zajednički za timocite i ćelije timusne strome. Za razliku od 7D3 mAt, ova dva mAt značajno stimulišu vezivanje timocita za TEC. Zbog toga su dobili radni naziv

TSAMA1 i TSAMA2 (engl. *thymic shared adhesion modulating antigens*). G7E6 prepoznaje antigen od 61kDa ispoljen na timusnom epitelu, 40-50% timocita, svim granulocitima i monocitima ali ne na perifernim limfocitima. Takođe, ćelije kortikalne (R-TNC.1) i medularne (TE-R 2.5) TEC linije su pozitivne. Autori su pokazali da G7E6 stimuliše vezivanje timocita za obe linije, pri čemu je efekat izraženiji nakon prolongirane inkubacije (3 h). Zabeleženi efekat nije posredovan LFA-1 molekulom niti je bio posledica unakrsnog povezivanja relevantnih antigena na različitim tipovima ćelija delovanjem antitela. G7E6 delimično inhibira proliferaciju timocita indukovanu ConA i IL-2, ali ne utiče na apoptozu timocita (Čolić, 1997).

3F10 mAt prepoznaje antigen koji je široko distribuiran na različitim leukocitima i nelimfoidnim ćelijama. Skoro svi limfociti i različiti timocitni hibridomi su pozitivni. Ćelije obe TEC linije, i kortikalne (R-TNC.1) i medularne (TE-R 2.5), su takođe 3F10<sup>+</sup>. Autori su pokazali da je ekspresija antigena smanjena u prisustvu IL-1 ili TNF- $\alpha$ , ali ne i delovanjem IL-6 ili IFN- $\gamma$ . *Western* -blot analizom je pokazano da 3F10 mAt prepoznaje dva antigena (60kDa i 55kDa) u ukupnom lizatu timocita. Ovo mAt stimuliše homotipsku adheziju timocita kao i adheziju timocita za TEC na 37°C. Oba ispitivana procesa su se odvijala LFA-1-zavisnim mehanizmima (Antic Stankovic i sar., 2004, Arsenovic-Ranin i sar., 2000).

Niz adhezivnih molekula koji učestvuju u interakciji timocita i TEC je veoma dug. On se povećava iz godine u godinu. U tom nizu su i dva važna adhezivna molekula identifikovana na humanim TEC, CD40 (Galy i Spits, 1992) i CD23 (Dalloul i sar., 1991). Svi ovi rezultati jasno ukazuju na složenost mreže adhezivnih molekula i njihovih liganada ispoljenih na TEC i dodatno potvrđuju njihovu neophodnost za optimalan kontakt timocita i TEC. Neki među njima pokazuju različitu ekspresiju na određenim TEC linijama. Svi ovi nalazi idu u prilog koncepta da TEC subpopulacije u različitim regionima timusa obezbeđuju različite signale za različite faze razvoja timocita. Ono što je za sada nepoznato je dinamika njihovog učešća u procesu adhezije, koji među njima deluju sinergistički ili antagoistički jedni sa drugima, koji signali se aktiviraju nakon njihovog angažovanja, odnosno koji je njihov značaj u *in vivo* interakciji timocita i TEC. Upotreba dobro okarakterisanih mAt, koja specifično prepoznaju adhezivne molekule koji učestvuju u interakciji timocita sa TSC, je jedan od

načina da se dobije odgovor na mnoga od ovih pitanja i dodatno ispita proces intratimuskog razvoja T limfocita.

## **HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

U Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije produkovana je serija mAt dobijena fuzijom P3x-Ag.8 mišjih mijelomskih ćelija i splenocita BALB/c miševa imunizovanih homogenatom timusa AO pacova. Ovaj panel mAt nazvanih R-MC, je korišćen za imunohistohemijsku karakterizaciju epitelnog i mezenhinskog odeljka timusa pacova (Colic i sar., 1988). Jedno od njih je i R-MC 17 mAt. Ovo antitelo pokazuje interesantan obrazac bojenja, s obzirom da se vezuje za kortikalne TEC i pojedine keratin negativne ćelije u meduli, koje po morfologiji podsećaju na TDC. Antigeni koji imaju sličnu distribuciju u pacovskom timusu su vrlo retki. Detaljnim pregledom literaturnih podataka moglo se zaključiti da najbližnju distribuciju ispoljava DEC-205 antigen u mišjem timusu. R-MC 17 mAt nije unakrsno reaktivno sa drugim vrstama (miš i čovek). Istovremeno, do sada je produkovano nekoliko različitih anti- DEC-205 mAt (NLDC145, MR6, MG38, HD serija). Jedno od tih anti- DEC-205 mAt je HD83, specifično za humani DEC-205, unakrsno reaktivno sa DEC-205 antigenima miša, pacova i majmuna. Molekul DEC-205 je kloniran u mišjem i humanom sistemu. U pacovskom sistemu gen koji kodira ovaj molekul nije još okarakterisan. Takođe, skoro se ništa ne zna o funkciji ovog molekula u timusu.

Na osnovu navedenih činjenica postavljena je sledeća HIPOTEZA:

R-MC 17 mAt detektuje pacovski DEC-205 molekul koji učestvuje u interakciji kortikalnih TEC i TDC sa timocitima.

U cilju provere ove hipoteze postavljeni su sledeći CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Ispitati biohemijske karakteristike antigena u timusu pacova koga prepoznaje R-MC 17 mAt i uporediti sa karakteristikama DEC-205 molekula koga prepoznaje HD83 mAt.
2. Ispitati i uporediti tkivnu distribuciju antigena koga prepoznaju R-MC 17 mAt i HD83 mAt u timusu, slezini i limfnom čvoru pacova.
3. Ispitati ekspresiju R-MC 17 antigena na TEC liniji R-TNC.1 sa karakteristikama ćelija „dadilja“ i populacijama TDC.

4. Ispitati uticaj R-MC 17 mAt na procese emepripoeze timocita od strane R-TNC.1 ćelijske linije *in vitro*.
5. Ispitati uticaj R-MC 17 mAt i HD83 mAt na adheziju i apoptozu timocita *in vitro* u prisustvu TDC.
6. Ispitati uticaj R-MC 17 mAt na proliferaciju timocita u kulturi u prisustvu TDC sa ili bez anti-TCR mAt.
7. Ispitati efekat intratimusne aplikacije R-MC 17 mAt na celularnost, apoptozu i fenotipska svojstva timocita *in vivo*.

# MATERIJAL I METODE

## PUFERI, RASTVORI I MEDIJUMI

### Pufer RIPA sa koktelom inhibitora proteaza

- 1% NP-40
- 50 mM Tris-HCL, pH 7.5
- 150 mM NaCl
- 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- 20 mM NaF
- 2 mM EDTA (dinatrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline)
- 2 mM PMSF (fenilmetilsulfonil hlorid)
- 20 mM ε-ACA (ε-aminokaproična kiselina)
- 4 µg/ml aprotinin
- 100 µg/ml leupeptin
- 2 µM pepstatin A

### Monomerni rastvor 30% (Akrilamid/bisakrilamid), za 100 ml:

- 29,2 g akrilamida
- 0,8 g bisakrilamida
- destilovana voda do 100 ml

### Pufer gela za razdvajanje, 4x pH 8,8

- 1,5 M Tris HCl
- 0,4% SDS

**Pufer gela za nadslojavanje, 2x pH 6,8**

- 0,25 M Tris HCl
- 0,2% SDS

**Redukujući pufer za rastvaranje uzorka:**

- Neredukujući Pufer za uzorak
- 0,2 M DTT (ditiotreitol)

**Neredukujući pufer za rastvaranje uzorka, pH6,8:**

- 125 mM Tris
- 4% SDS
- 20% glicerol
- 0,02% bromfenol plavo

Tabela 1. Zapremine rastvora potrebnih za SDS-elektroforezu

<i>Rastvor</i>	<b>Gel za razdvajanje 6%</b>	<b>Gel za nadslojavanje</b>
Monomerni rastvor	3 ml	0,66 ml
Pufer gela za razdvajanje	3,75 ml	/
Pufer gela za nadslojavanje	/	1,25 ml
10% SDS	0,15 ml	50 µl
H <sub>2</sub> O	8 ml	3,05 ml
Amonijumpersulfat (10%)	75 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Ukupna zapremina	15 ml	5 m



**Pufer za elektroforezu 10x koncentrovan, pH 8,3, za 1l:**

- 30,28 g Tris
- 10 g SDS
- 150 g glicina
- destilovana voda do 1l

**Pufer za elektrotransfer:**

- 25mM Tris
- 192 mM glicin
- 20% metanol
- 0,1% SDS

**Pufer za ispiranje, TTBS, (pH 7,5):**

- 50 mM Tris/HCl
- 100 mM NaCl
- 0,05% Tween 20

**Pufer za blokiranje**

- 2,5% obrano (non-fat) mleko u prahu
- TTBS, pH 7.5

**Pufer za pripremu razblaženja antitela**

- 0,5% obrano mleko u prahu
- TTBS, pH 7.5

**TBS (engl. *Tris-buffered saline*), pH 7,6**

- 0,05 M Tris (Trishidroksimetilaminometan) pH7.6
- 0,15 M NaCl

**Kajzerov gel (Glicerol-želatinski gel za montiranje mikroskopskih preparata)**

- 10 g želatina (Sigma)

- 60 ml destilovane vode
- 70 ml glicerola (Zorka, Šabac)
- 250 mg fenola (Sigma)

**Supstrat za alkalnu fosfatazu (tablete)**

- 1 tableta Fast Red Substrate System (DAKO A/S Danska)
- 2 ml 0,1M TRIS pufer pH 8,2

**Supstrat za alkalnu fosfatazu (rastvor)**

- 5 ml 0,1 M TRIS pH 8.2
- 100 µl dimetilformamida za naftol supstrat
- 10 µl 1 M levamisola
- 5 mg FAST RED

**Supstrat za peroksidazu iz rena** (engl. *horseradish peroxidase-HRP*)

- 10 ml TBS
- 6 mg DAB (diaminobenzidin- tetrahlorid) (Sigma)
- 0,04 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zorka, Šabac)

**Rastvor pararozanilina** (fiksativ za citospin preparate)

Pararozanilin 4% u 2M rastvoru HCl (napravljen zagrevanjem na 70°C) je nakon filtriranja pomešan sa 4% NaNO<sub>2</sub> u destilovanoj vodi (jednake zapremine) i nakon 1 min ova suspenzija je rastvorena u dejonizovanoj vodi (1:100).

**Osnovni (kompletni) medijum za kultivaciju ćelija** je RPMI medijum sa 10% fetalnog telećeg seruma (FCS ) inaktivisanog 30 minuta na 56°C. 100 ml ovog medijuma sadrži:

- 70 ml redestilovane vode
- 10 ml RPMI-1640 (Serva, Nemačka) (10x)
- 10 ml FCS-a (Flow Laboratories, UK)
- 1 ml L-glutamina 200 mmol/l (ICN-Flow)
- 3,25 ml 7,5% NaHCO<sub>3</sub> (Apoteka VMA)
- garamicin 40 mg/ml (ICN-Galenika)
- 50 i.j./ml penicilina (ICN-Galenika)
- 50 mg/ml streptomicina (ICN-Galenika)

**Osnovni (kompletni) medijum za kultivaciju TEC** je RPMI medijum sa 15% fetalnog telećeg seruma (FCS) i istim sastojcima kao i kompletni medijum za kultivaciju ostalih ćelija uz dodatak (na 100 ml):

- 50 nM deksametazona (ICN-Galenika)
- 10 ng/ml epidermalnog faktora rasta (Serva)
- 5 µl/ml insulina (Serva)

**Rastvor tripsina** (*Serva*) 0.01% u 0.02% PBS EDTA korišćen je za odvajanje EC od podloge bočica za kultivaciju.

**Rastvor Na-EDTA** 0.2 g/l u PBS-u korišćen je za ispiranje EC pre tripsinizacije.

**PBS (*Phosphate-buffered saline*) pH 7.56**

- 14 ml 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Serva)
- 36 ml 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Serva)
- 100 ml 16% NaCl (Zorka, Šabac)
- 850 ml destilovane vode

**PBS1**

- 0,01% NaN<sub>3</sub>
- PBS

**PBS2**

- 2 % inaktivisani teleći serum
- PBS1

**Fiksativ za citofluorometrijsku analizu**

- 10 % Puffer fosfatni sa formalinom i acetonom pH 6,6 (Apoteka, VMA)
- PBS1

**Formalin 4% (Apoteka, VMA)**

**OptiPrep™ gradijent** (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norveška) gustine 1,078 g/ml, osmolarnosti 390 mOsm, korišćen je u izolaciji ćelija, pripremljen od 5 ml gradijenta (početne gustine 1,320 g/ml i osmolarnosti 260 mOsm) i 16,6 ml 1,25% NaCl

Tabela 2. Korišćena monoklonska antitela

	R-MC 17 ascit	NG2B12 ascit	R-MC 17 12,4 mg/ml	HD83 1,7 mg/ml	OX-6	5G1	VAM 4.1 20 mg/ml	OX-6- PE	ED8- FITC	W3/25 - FITC	OX-8- biotin	CD5- FITC	R7,3- biotin
Specifičnost mAt	p 205 kDa	CD18	p 205 kDa	DEC 205	MHC II	**		MHC II	CD11b	CD4	CD8	CD5	$\alpha\beta$ TCR
Izvor	IMI VMA	IMI VMA	IMI VMA	*	Serotec	IMI VMA	IMI VMA	Serotec	Serotec	BD Pharmingen	Serotec	Serotec	#
Citofluorometrija (razblaženje)	1:200		1:200					1:10	1:10	1:50	1:10	1:50	1:10
Imunohemija (koncentracija ( $\mu$ g/ml) /razblaženje)	1:200		5-15	5-15	1:500	1:200	5-15						
WB lizata (razblaženje)	1:500 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000	1:500 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000	1:1000	1:500 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000									
Imunoprecipitacija Eksp. 1			uzorak 1 (2 $\mu$ g) uzorak 2 (0,5 $\mu$ g)	uzorak 3 (2 $\mu$ g) uzorak 4 (0,5 $\mu$ g)									
Imunoprecipitacija Eksp. 2			uzorak 1 (4 $\mu$ g) uzorak 2 (2 $\mu$ g)	uzorak 3 (1 $\mu$ g) uzorak 4 (0,5 $\mu$ g)									
WB ispošćenog lizata (razblaženje)			1: 4000	1: 10000									

\*Poklon dr Parka (J.Koreja);\*\*Kortikalne i KMZ makrofage; SHC-5G1 (R-MC 41) (Čolić i sar. 1990);#Poklon dr Huniga (Nemačka)

## **EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE**

U eksperimentima su korišćeni pacovi AO soja, oba pola, starosti 6-8 nedelja. Životinje su razmnožavane i odgajane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja VMA, u prostorijama sa optimalnim uslovima: konstantna temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  i vlažnost vazduha od 50%. Životinje su hranjene briketiranom hranom (Vetprom, Zemun) a vodu su dobijale iz plastičnih pojilica.

Za sve eksperimente životinje su birane metodom slučajnog uzorka, nakon čega su i dalje čuvane pod istim mikroklimatskim uslovima. U cilju izolovanja pojedinih organa i tkiva, životinje su eutanazirane prekomernom dozom anestetika.

## **BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ANTIGENA**

### **Priprema ćelijskog ekstrakta**

Timociti (pripremljeni kako je opisano na str. 48 su lizirani u RIPA puferu ( $100 \times 10^6$  timocita/ml pufera) sa dodatkom koktela inhibitora proteaza ( $20 \mu\text{l/ml}$ ) u koncentraciji duplo većoj od standardne koncentracija zbog osetljivosti ciljnog proteina na proteaznu destrukciju. Ćelije su lizirane 40 min na  $+4^\circ\text{C}$  (na ledu i u frižideru) uz mućkanje na svakih 5-10 minuta. U cilju odvajanja nesolubilizovanih delova tkiva, lizat je centrifugiran na  $20.000 \times g$  (20 min,  $+4^\circ\text{C}$ ). Dobijeni supernatant je zatim alikvotiran u hladne ependorf-epruvete i uskladišten na  $-70^\circ\text{C}$  gde je čuvan do nastavka eksperimenta.

Koncentracija ukupnih proteina u lizatu je određena BCA (engl. *bicinchoninic acid*) metodom za kolorimetrijsku detekciju i kvantifikaciju proteina, prema uputstvu proizvođača (*BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL 61105*) i iznosila je 2 mg/ml.

### **SDS-PAGE i Western blot timusnog lizata**

Uzorak za SDS-PAGE (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) elektroforezu je pripremljen tako što je u  $300 \mu\text{l}$  odmrznutog lizata najpre dodato  $10 \mu\text{l}$  koktela inhibitora proteaza, a zatim je lizat pomešan sa neredukujućim puferom za rastvaranje uzorka u zapreminskom odnosu 1:1. Smeša je inkubirana 5 min na  $100^\circ\text{C}$  u vodenom kupatilu (uzorak za SDS-elektroforezu pod

neredukujućim uslovima). Ista procedura pripreme uzorka od 300 µl timusnog lizata je ponovljena sa redukujućim puferom za rastvaranje uzorka (uzorak za SDS-elektroforezu pod redukujućim uslovima).

Od monomernog rastvora, dodavanjem komponenti prema tabeli 1, pripremljena su dva 6% gela (debljine 1,5 mm) za razdvajanje. Nakon 1h gelovi za razdvajanje uzorka su polimerizovali i napravljeni su gelovi za nadslojavanje uzorka (prema tabeli 1) koji su naliveni preko gelova za razdvajanje. U formirani bunar za preparativnu elektroforezu 30 min kasnije naliveno je 600 µl uzorka za SDS-elektroforezu pod neredukujućim uslovima i 5 µl proteinskih standarda molekulske mase (*PageRuler, Prestained Protein Ladder 10-170 kDa, Fermentas; PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoFisher*) u zasebni bunarčić. Na drugi gel je naneto 600 µl uzorka za SDS-elektroforezu pod redukujućim uslovima, kao i markeri molekulske mase. Elektroforeza je urađena na sistemu *SE 260 Mighty Small II Vertical Slab Electrophoresis Unit (GE HealthCare LifeScience, USA)* (20 mA konstantna jačina struje, kad je uzorak prešao u gel za razdvajanje, jačina struje je povećana na 30 mA, u trajanju od 95 min).

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prebačeni sa gela na nitroceluloznu membranu (*Hybond ECL, GE HealthCare LifeScience USA*) *semi-dry* sistemom za elektrotransfer *Multiphor II system (LKB, Uppsala, Švedska)* (110 mA konstantna jačina struje, 90 min). Oba gela (pod neredukujućim i redukujućim uslovima) su u daljem postupku tretirana na isti način.

Kvalitet transfera je proveren u rastvoru 0,1% *Ponceau S* boje (*Sigma Aldrich*) u 5% sirćetnoj kiselini, a zatim su nitrocelulozne membrane (*Amersham Hybond ECL Nitrocellulose membrane, GE Healthcare, UK*) isprane u vodi i isečene na trake širine oko 4 mm. Traka sa markerima molekulske mase je isečena i odložena. Nakon blokiranja nespecifičnog vezivanja (1 h na sobnoj temperaturi) trake su inkubirane 2 h sa dvostrukim serijskim razblaženjima primarnog antitela (Tabela 2). Nakon 3 ispiranja, trake su inkubirane još 1 h sa sekundarnim antitelom (kozji anti-mišji Ig-HRP, *Pierce, 1 : 20 000*). Reaktivnost antitela je vizuelizovana autoradiografski, reagensima za ECL (*Enhanced Echemiluminescence Reagent System, Serva*) prema uputstvu proizvođača. Molekulska masa i kvantitativna analiza obeleženih proteina je određena

denzitometrijski uz pomoć softvera *ImageMaster, TotalLab v1.1 software (GE HealthCare LifeScience, USA)*.

### **Priprema imunoprecipitata**

Nakon trostrukog ispiranja (1000 xg, 5 min, +4 °C) u PBS-u, sefrozne kuglice (400 µl) *Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology)* su resuspendovane do finalne zapremine od 400 µl u PBS-u.

U lizat (1 ml) je dodat 1 µg izotipskog mAt VAM4.1 (u odnosu na imunoprecipitaciono At) zajedno sa 40 µl pripremljenih kuglica. Nakon inkubacije (45 min uz povremeno mešanje) kuglice su istaložene (1000 xg, 5 min, +4 °C). Ovako dobijen supernatant je prekliringom prečišćen lizat koji je korišćen za imunoprecipitaciju u prvom eksperimentu. Od njega je izdvojeno 30 µl koji su čuvani na -20°C do faze pripreme uzorka za elektroforezu (kontrolni uzorak).

Lizat je zatim podeljen na 4 jednaka dela (~ 250 µl), obeležena brojevima 1-4. U lizat su zatim dodata mAt prema redosledu (videti tabelu 2). Nakon 1h inkubacije na +4 °C (tokom koje su formirani imunokompleksi) dodate su sefrozne kuglice (40 µl/uzorku) i nastavljena je inkubacija (4 h, +4 °C) uz stalno mešanje. Nakon centrifugiranja (1000 xg, 5 min, +4 °C) odvojene su kuglice sa afinitetno vezanim imunokompleksima - imunoprecipitat. Supernatanti (ispošćen lizat) su pomešani sa neredukujućim puferom za rastvaranje uzorka u odnosu 1:1 i zagrejani u ključalom vodenom kupatilu 3-5 min na 100 °C. Na isti način je pripremljen kontrolni uzorak, tj. **netretiran lizat (prekliring)**. Za analizu imunoprecipitacijom prečišćenog antigena, kuglice su isprane 3 puta u PBS-u (pod istim uslovima) i na njih je dodat neredukujući pufer za rastvaranje uzorka (250 µl/uzorku). Kuvanjem 3-5 min na 100 °C u vodenom kupatilu pripremljeni su uzorci za SDS-PAGE.

U drugom eksperimentu, u 600 µl lizata je dodat koktel inhibitora proteaza, a 30 µl netretiranog lizata je odloženo na -20 °C do faze pripreme uzorka za elektroforezu (kontrolni uzorak). Lizat je podeljen na 4 jednaka dela (~125 µl/uzorku) u koja su dodata mAt prema tabeli 2. Nakon 1 h inkubacije na +4 °C, dodate su sefrozne kuglice (100 µl/uzorku) i inkubacija je nastavljena još 4 h pod istim uslovima. Dalje je procedura pripreme uzorka za SDS-PAGE bila kao što je napred opisano (u prvom



eksperimentu). Kontrolni uzorak - netretirani lizat, je korigovan dodavanjem PBS-a, pre dodavanja pufera za rastvaranje uzorka.

Procenat zaostalog antigena nakon imunoprecipitacije u prvom eksperimentu je određivan u odnosu na netretiran lizat posle prekliringa (100% reaktivnosti mAt u *Western-blotu*), a u drugom eksperimentu u odnosu na netretirani lizat.

### **SDS-PAGE i *Western-blot* imunoprecipitacijom ispošćenog lizata**

SDS-PAGE i elektrotransfer su urađeni na isti način kako je prethodno opisano, s tom razlikom što je napavljen gel sa 10 bunarića, umesto gelova za preparativnu elektroforezu (gde je 1 gel 1 uzorak). U oba eksperimenta su postojala po dva gela (gel 1 i gel 2). Uzorci sa gela 1 u *Western-blotu* su inkubirani sa R-MC 17 primarnim At, a sa gela 2 sa HD83 primarnim At (videti tabelu 2), dok je sekundarno At bilo isto - anti-mišji IgG konjugovan peroksidazom (1:20000).

Reakcija antitela je vizualizovana na autoradiografskom filmu ECL metodom. Molekulska masa i kvantitativna analiza obeleženih proteina je određena denzitometrijski uz pomoć softvera *ImageMaster, TotalLab v1.1 software (GE HealthCare LifeScience, USA)*.

## **IMUNOHEMIJSKE METODE BOJENJA**

### **Priprema preseka tkiva za imunohistohemijska ispitivanja**

Nakon žrtvovanja pacova, izvađeni organi pacova (timus, slezina, submandibularni limfni čvor) su očišćeni od okolnog tkiva i zamrznuti u tečnom azotu. Tkivni preseki (debljine 5-8  $\mu\text{m}$ ) su pravljani na kriotomu (*Leica CM 1850*) na temperaturi  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pločice sa presecima su nakon sušenja (najmanje 2 h na sobnoj temperaturi) fiksirane 10 min u acetonu (*Zorka, Šabac*). Do testiranja tkivni preseki su čuvani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ne duže od tri meseca).

### **Priprema citospin preparata**

Mikroskopske pločice, prethodno prevučene poli-L-lizinom (*Sigma, 0,01%*) su montirane u citocentrifugu (*ThermoScientific, Shandon*). Nakon toga je po 100  $\mu\text{l}$  ćelijske suspenzije (ukupna koncentracija  $1-3 \times 10^4$  ćelija) dodavano u svaku kasetu sa

pločicom i centrifugirano 5 min na 500 rpm. U pripremi preparata DC, zbog njihove povećane adhezivnosti, ćelijska suspenzija je pripremana na ledu i pre ubacivanja u centrifugu provučena dva puta kroz špric sa iglom širine 21G. Pripremljeni preparati su osušeni preko noći na sobnoj temperaturi, umotani u aluminijsku foliju i do upotrebe čuvani na -20 °C.

Neposredno pre bojenja, na citospin preparate je nanet pararozanilin (20 µl/polju, 2 min, sobna temperatura). Nakon blokiranja endogene peroksidaze i ispiranja u PBS-u dodat je 50% inaktivisani normalni kuneći serum u TBS-u (20 µl/polju). Posle 20 min inkubacije, na sobnoj temperaturi, pločice su isprane (TBS, 5 min) i naneto je primarno antitelo (razblaženja su napravljena u TBS, 1% BSA, 0,05% Tween 20). Nastavak procedure (nakon primarnog antitela) se nije razlikovao od imunohemijskog bojenja opisanog u nastavku.

### **Imunoperoksidazno bojenje**

Fiksirani kriostatski preseki tkiva su nakon preinkubacije sa 50% ovčijim serumom (20 min), inkubirani sa primarnim mAt (60 min, sobna temperatura ili preko noći na +4 °C). Nakon ispiranja u TBS-u, pločice su inkubirane 20 min u rastvoru metanola sa 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (blokiranje endogene peroksidazne reakcije). Pločice su, nakon toga, isprane a zatim inkubirane (30 min) sa sekundarnim antitelom (ovčji anti-mišji Ig konjugovan HRP ili F(ab)<sub>2</sub> fragment-HRP). Nakon ispiranja preseki su inkubirani 10 min u supstratu 0,06% 3,3- diaminobenzidin (DAB) i 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u TBS, ponovo isprani, a zatim blago kontrastirani u hematoksilinu (Alaun-živa hematoksilin, *Apoteka, VMA*) i montirani pomoću Kajzerovog gela.

### **Streptavidin-biotin imunoperoksidazno bojenje**

Nakon inkubacije sa primarnim monoklonskim antitelima na pločice je naneto sekundarno antitelo konjugovano biotinom (veća senzitivnost reakcije). Nakon 30 min inkubacije i ispiranja u TBS-u, na pločice je dodata streptavidin-peroksidaza (*Streptavidine-Peroxidase polymer, Sigma-Aldrich*) i inkubirana 30 min. Kao i kod imunoperoksidaznog bojenja, nakon ispiranja pločica, reakcija je vizuelizovana

dodavanjem hromogena i supstrata (DAB i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (5-10 min). Preparati su kontrastirani u hematoksilinu i montirani pomoću Kajzerovog gela.

#### **APAAP (alkalna fosfataza anti-alkalna fosfataza) bojenje**

Nakon 60 min inkubacije sa primarnim antitelom na sobnoj temperaturi ili preko noći na +4 °C, pločice su isprane u TBS-u i inkubirane 20 min sa sekundarnim (anti-mišji imunoglobulini), tzv. *bridging* antitelom. Nakon ispiranja, pločice su inkubirane (20 min, sobna temperatura) sa APAAP kompleksom (engl. *alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase*). Pločice su isprane u TBS-u (5 min) i nanet je supstrat za alkalnu fosfatazu. Nakon 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi pločice su isprane u TBS-u, kontrastirane hematoksilinom o montirane primenom Kajzerovog gela.

#### **Dvostruko imunohemijsko bojenje (peroksidaza/alkalna fosfataza)**

Nakon blokiranja endogene peroksidaze i 20 min inkubacije u 50% kunećem serumu, na testirane preparate je naneto prvo primarno mAt i pločice su inkubirane 45 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja (TBS, 5 min) na preparate je naneto sekundarno, izotip specifično antitelo, direktno konjugovano peroksidazom (kuneći anti-mišji Ig konjugovan HRP). Nakon 30 min inkubacije, prvi deo bojenja je završen kako je opisano za imunoperoksidazno obeležavanje (dodavanjem DAB-a i vodonik-peroksida). U nastavku, nakon ispiranja u TBS-u, preparati su inkubirani sa drugim primarnim mAt (45 min na sobnoj temperaturi), ponovo isprani u TBS-u, inkubirani sa sekundarnim izotip specifičnim antitelom (30 min na sobnoj temperaturi). Obeležavanje je završeno prema proceduri opisanoj za APAAP metodu. Nakon ispiranja 20 min u dejonizovanoj vodi preparati nisu kontrastirani, već su odmah montirani u Kajzerovom gelu.

#### **Imunofluorescentno bojenje tkiva**

U ovom bojenju se kao sekundarno antitelo koristio kozji anti-mišji Ig konjugovan Alexa Fluor 488 (*Thermo Fisher Scientific*). Nakon vezivanja sekundarnog antitela i ispiranja tkivnih preseka u TBS-u, na preparate je dodat 10 µM rastvor fluorescentne boje SYTO 59 (*SYTO 59 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain, Thermo Fisher Scientific*) i inkubacija je trajala 5 min. Preseci su isprani u TBS-u, montirani u

80% glicerolu i analizirani na konfokalnom fluorescentnom mikroskopu (*Zeiss LSM 510/Axiocvert 200M, Jena, Nemačka*) koristeći lasere (od 488nm do 650 nm) različitih intenziteta i imerzione objektivne (*Zeiss APO L 63x*), a signal je detektovan na detektoru za Alexa Fluor 488.

### **Kontrastiranje preparata**

Preparati su nakon imunohemijskog bojenja isprani u destilovanoj vodi i dodat je Alaun-živa hematoksilin. Posle 1-2 minuta (ili kraće) preparat je obilno ispran česmenskom vodom.

### **May-Grünwald Giemsa bojenje**

Citospin preparati su prelivevi *May-Grünwald* rastvorom i nakon 5 min isprani destilovanom vodom. Potom su 20 min tretirani rastvorom *Giemsa* (1:10 u destilovanoj vodi) i ponovo isprani destilovanom vodom. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, preparati su montirani pomoćun Kanada-balzama.

### **Hematoksilin-eozin bojenje**

Pločice sa fiksiranim ćelijama su isprane u destilovanoj vodi i osušene. Na osušene pločice nanet je Majerov hematoskilin (*Apoteka VMA*). Posle 10-15 minuta pločice su isprane tekućom vodom i na njih je nanet 0.1 % rastvor eozina (*Apoteka VMA*). Nakon 5-10 minuta pločice su isprane u tekućoj vodi i provučene kroz apsolutni alkohol i ksilol (do 1 min). Osušeni preparati su montirani pomoću Kanada balzama ili Kajzerovog glicerinskog gela.

## **ULOGA R-MC 17 MAT U INTERAKCIJI TIMOCITA I R-TNC.1**

### **Dugotrajne kulture R-TNC.1 epitelne ćelijske linije**

Timusna EC linija R-TNC.1 je klonirana na Institutu za medicinska istraživanja VMA (Colic i sar., 1994) iz dugotrajne kulture pacovskog epitela. Epitelne ćelije su kultivisane do formiranja konfluentnog sloja (2-3 dana). Od podloge bočica za kultivaciju su odvajane delovanjem 0,1% rastvora tripsina u 0,02% EDTA u PBS-u tokom 5-10 min inkubacije na 37 °C. Tripsinizacija je stopirana dodatkom RPMI medijuma sa 10% FCS. Ćelije iz bočice su pokupljene i centrifugirane 10 min na 1800

obrtaja. Talog ćelija je resuspendovan u svežem kompletnom medijumu i prebacivan u nove bočice za kultivaciju. Posle 2-3 dana kada bi EC formirale konfluentan sloj procedura je ponavljana. Ćelije su obično rasađivane u odnosu 1:4 do 1:5.

### **Priprema jednoslojnih epitelnih kultura**

Za adhezivne eseje ili eseje emperipoeze ćelije su kultivisane u pločama sa ravnim dnom od 96 mesta (*Flow*) ili na staklenim pločicama sa više mesta (*multi spot glass slides - Flow*). Nakon tripsinizacije i ispiranja ćelije su postavljane u različitim koncentracijama ( $0,5-2 \times 10^3/30-80 \mu\text{l}$  medijuma/polju) u polja pločice i kultivisane na  $37^\circ\text{C}$  do formiranja sloja odgovarajuće gustine (za adheziju-konfluentan sloj; za emperipoezu do 80% konfluentan).

### **Priprema kulture „viseće kapi”**

Za citofluorimetrijska ispitivanja ekspresije R-MC 17 antigena korišćena je ćelijska suspenzija R-TNC.1 kultivisana u Terasaki-pločama ( $1 \times 10^3/\text{polju}/80 \mu\text{l}$  punog medijuma) u kulturi „viseće kapi” 24 h u punom medijumu. Pri ovom postupku nije potrebno koristiti tripsin za odlepljivanje adherentnih ćelija, što omogućava detekciju antigena koji su potencijalno osetljivi na delovanje tripsina. Od ovako pripremljene R-TNC.1 ćelijske suspenzije pravljeni su i citospin preparati manuelnim nanošenjem ćelija na staklene pločice ( $0,1 \times 10^3/\text{polju}$ ).

### **Priprema suspenzije singenih timocita**

U sterilnim uslovima izvađen je timus AO pacova (mužjaci, starosti 8-12 nedelja) i prenet u petri šolju sa medijumom. Timociti su izdvojeni blagim pritiskom klipa plastičnog šprica na tkivo timusa postavljeno na mrežicu od nerđajućeg čelika potopljenu u medijumu (2% FCS RPMI). Ćelijska suspenzija je isprana istim medijumom, centrifugiranjem ( $1000 \times g$ , 10 min), resuspendovana u kompletnom medijumu i profiltrirana kroz najlonsku mrežicu. Vijabilnost i broj timocita određivani su brojanjem ćelija u 0,1% rastvoru Tripan-plavog.

### **Adhezivni esej**

R-TNC.1 EC su posle tripsinizacije odvojene od podloge bočica u kojima su kultivisane, staložene centrifugiranjem i nakon brojanja raspoređene u ploče sa 96 mesta

( $1 \times 10^4$  ćelija/polju u 200  $\mu$ l medijuma). Ovako pripremljene ćelije su kultivisane na 37 °C do obrazovanja konfluentnog sloja (2 dana). Na ovako pripremljene EC su dodavani timociti adultnog pacova ( $5 \times 10^5$  ćelija/polju/50  $\mu$ l RPMI medijuma sa 10% FCS-a). Ploče su inkubirane 30 min na 37 °C, a potom su okrenute otvorom naniže i tako centrifugirane 30 sekundi na 1000 obrtaja a onda brzo (da bi se sprečilo sušenje ćelija) u svako polje je dodat medijum (100  $\mu$ l/udubljenju). Na ovaj način uklonjeni su neadherentni timociti a adherentni timociti su najpre odvojeni od EC višestrukim pipetiranjem a potom izbrojani, pod svetlosnim mikroskopom.

Procenat vezivanja je određivan iz sledeće formule:

$$\% \text{ vezivanja} = \text{broj adherentnih timocita/ukupan broj timocita} \times 100$$

### **Esej emperipoeze**

Epitelne ćelije su tripsinizirane kao za adhezivni esej, a onda postavljene na staklene pločice sa deset polja ( $5 \times 10^3$  ćelija/80  $\mu$ l medijuma bez deksametazona/polju). Pločice su postavljane u Petrijeve posude i ćelije su kultivisane 24 h na 37 °C. Na tako pripremljene EC dodati su mirujući timociti adultnog pacova ( $5 \times 10^5$ /polju/80  $\mu$ l medijuma) i pločice su inkubirane 8 h na 37 °C. Nakon perioda inkubacije neadherentni i adherentni timociti su uklanjani energičnim ispiranjem pločica u PBS-u.

Preparati su potom fiksirani u alkoholnom rastvoru 4% formaldehida, obojeni hematoksilin-eozinom i montirani pomoću Kanada balzama. Ćelije su analizirane pod svetlosnim mikroskopom. Broj internalizovanih timocita je određivan na 500 R-TNC.1 ćelija na svakom polju. Stepem internalizacije je izražavan kao indeks emperipoeze (EI) iz sledeće relacije:

$$\text{EI} = \text{ukupan broj internalizovanih timocita/100 R-TNC.1 ćelija.}$$

### **Uloga mAt R-MC 17 u adheziji i emperipoezi R-TNC.1 ćelija**

U eksperimentima u kojima je procenjivan uticaj R-MC 17 mAt na adheziju i emperipoezu timocita od strane R-TNC.1 ćelija, EC su najpre preinkubirane sa R-MC 17 mAt 30 min na 4 °C. Kao kontrolno antitelo korišćeno je cBH11 (specifično se vezuje za Blastocystis hominis; IMI, VMA). Monoklonska antitela su bila kontinuirano

prisutna u testu, u koncentracijama od 15, 30 i 60  $\mu\text{g/ml}$  u testu emperipoeze, a tokom izvođenja adhezivnog eseja u koncentraciji od 60  $\mu\text{g/ml}$ .

U eksperimentu u kom je ispitivan uticaj R-MC 17 mAt na emperipoeznu aktivnost R-TNC.1 ćelija prema TDC-like ćelijama, EC su kultivisane sa ukupnom populacijom timocita tokom 8 h, kako je prethodno opisano, a EI je izračunat prema sledećoj formuli:

**EI** = ukupan broj internalizovanih TDC-like ćelija/100 R-TNC.1 ćelija.

## **ULOGA R-MC 17 MAT U INTERAKCIJI TIMOCITA I TDC**

### **Izolacija TDC**

Timusni lobusi su sterilno izolovani iz žrtvovanih životinja, iseckani na male komade i tretirani kolagenazom (0,5 mg/ml) (*Collagenaze type IV, Sigma*) i DNA-zom (0,02%) (*Sigma*), 20 min, 37 °C uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon digestije, nerazgrađeno tkivo timusa je prošlo čitavu proceduru još jednom. Ovako pripremljena suspenzija timusnih ćelija je resuspendovana u hladnom RPMI 1640 medijumu sa 0,02% Na-EDTA (*Apoteka VMA*) i istaložena centrifugiranjem (600 xg, 10 min). Dobijeni ćelijski pelet je resuspendovan u istom medijumu, profiltriran preko najlonske mrežice i provučen dva puta kroz špric sa iglom. Ovako pripremljena suspenzija ćelija naneta je pažljivo na hiperosmotski gradijent: 4 ml ćelijske suspenzije ( $3-4 \times 10^8$  ćelija) na 3 ml *OptiPrep* gradijenta (gustine 1.078 g/ml, osmolarnosti 390 mOsm). Epruvete su centrifugirane 15 min na 800 xg na hladnom. Nakon centrifugiranja sakupljen je interfazni prsten i resuspendovan u RPMI 1640 medijumu sa 2% FCS. Dvostrukim ispiranjem dobijena je finalna suspenzija timusnih ćelija obogaćena prisustvom TDC (čistoća ~ 40%).

### **Imunomagnetno prečišćavanje sveže izolovanih TDC**

Imunomagnetno prečišćavanje TDC izvedeno je upotrebom negativne i pozitivne imunomagnetne separacije, bazirane na MACS tehnologiji (*Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany*). Najpre je suspenzija timusnih ćelija obogaćena TDC isprana u puferu za sortiranje ćelija (2 mM Na-EDTA u PBS-u + 0,5% BSA). Nakon ispiranja ćelije (maksimalno  $1 \times 10^7$  ćelija u 100  $\mu\text{l}$ ) su inkubirane (10 min, +4 °C) sa koktelom

mAt: R7.3 (anti- $\alpha\beta$  TCR) mAt i 1G2 (anti-makrofagno) mAt i suspenzijom slobodnih magnetnih partikula (*Basic Microbeads, Miltenyi Biotec*). Nakon inkubacije sa koktelom mAt, ćelije su dva puta isprane u puferu za sortiranje ćelija i inkubirane 15 min na hladnom sa kozjim anti-mišjim Ig obeleženim biotinom (finalno razblaženje 1:50) (*Serotec*). Posle inkubacije i ispiranja u puferu za sortiranje, ćelije su inkubirane sa kompleksom magnetnih partikula i streptavidina (*Streptavidin-MicroBeads, Miltenyi Biotec*, 1:5). Magnetno obeležena ćelijska suspenzija isprana je nakon inkubacije i naneta na separacionu kolonu (LS<sup>+</sup>) postavljenu u magnetnom polju (*Midi MACS magnet*). Nakon dva ciklusa magnetne deplecije, kojom su na koloni izdvojeni timociti i makrofagi, čistoća sveže izolovanih TDC u negativnoj frakciji iznosila je oko 70%. Za ispitivanje akcesornog potencijala sveže izolovanih TDC u testu proliferacije timocita, prečišćenost negativno sortiranih TDC je dodatno povećana naknadnim imunomagnetnim sortiranjem. Negativna frakcija prethodno sortiranih TDC je imunomagnetno obeležavana upotrebom OX-6 mAt, a obeležene TDC su izdvojene na zidu separacione kolone u magnetnom polju. Čistoća TDC nakon opisanog postupka sortiranja ćelija iznosila je oko 90%. Ove ćelije su fenotipski analizirane protočnom citofluorimetrijom i/ili postavljane u kulturu sa timocitima (sa i bez dodatka GM-CSF-a).

### **Kultivacija TDC**

TDC ( $4-6 \times 10^5$ /polju ploče od 24 mesta) su kultivisane u kompletnom medijumu bez dodatka pacovskog rekombinantnog GM-CSF (kontrolni medijum) i u medijumu sa dodatkom pacovskog rekombinantnog GM-CSF (5 ng/ml) tokom 36 h ili 48 h. Ćelije su kultivisane na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> (*Flow, Irvine, UK*).

### **Prečišćavanje kultivisanih TDC**

Nakon isteka kulture, TDC su blagim pipetiranjem (uz dvostruko ispiranje toplim medijumom) pokupljene kao neadherentne ćelije, istaložene centrifugiranjem (600 xg, 10 min) i resuspendovane u kompletnom medijumu sa dodatkom 0,04% Na-EDTA. Neposredno pre nanošenja na gradijent suspenzija ćelija je provučena dva puta kroz špric sa iglom radi disocijacije ćelijskih agregata. Po 4ml ćelijske suspenzije ( $\sim 2 \times 10^6$  TDC) je naneto na 3 ml gradijenta *OptiPrep*<sup>TM</sup> (gustine 1.078 g/ml i osmolarnosti 415



mOsm) i centrifugirano (800 xg, 15 min, 4 °C). Dobijeni interfazni prsten je sakupljen i dva puta ispiran u potpunom medijumu. Ove ćelije su korišćene za analizu protočnom citofluorimetrijom, pravljenje citospin preparata koji su analizirani imunohemijskim metodama i za ispitivanje akcesornog potencijala kultivisanih TDC u testu proliferacije timocita.

### **Priprema alogenih CD4<sup>+</sup> T limfocita**

Alogeni CD4<sup>+</sup> T limfociti su izolovani iz submandibularnih limfnih čvorova DA pacova (mužjaci, starosti 8-12 nedelja) i prečišćeni negativnim imunomagnetnim sortiranjem koristeći sistem *MACS Technology*. Limfni čvorovi su najpre homogenizovani preko sterilne čelične mrežice u 2% RPMI medijumu. Dobijena suspenzija ćelija je istaložena centrifugiranjem (600 xg, 10 min). Nakon dvostrukog ispiranja (u PBS-u sa 2 mM Na-EDTA), ćelije su inkubirane sa koktelom monoklonskih antitela: OX-6 (anti-MHC II), OX-8 (anti-CD8), OX-33 (anti-CD45RA) i OX-42 (anti-CD11b/c) 10 minuta na 4°C. Posle inkubacije, ćelije su isprane u puferu za sortiranje ćelija (2 mM EDTA u PBS + 0,5% BSA) i inkubirane sa antitelom ovčjim anti-mišjim Ig-biotinom (15 min, 4 °C). Ćelije su potom isprane i dodatno inkubirane (15 min, 4 °C) sa streptavidin-mikrokuglicama, u odnosu 1:10 (mikrokuglice prema ukupnoj zapremini u kojoj se vrši obeležavanje). Nakon ispiranja obeležene ćelije su uklonjene nanošenjem na LS<sup>+</sup> kolonu za separaciju (*MACS Cell Separation – Milteniy biotec*). Urađena su dva ciklusa magnetne deplecije. Vijabilnost i broj ćelija je određena u Tripan-plavom. CD4<sup>+</sup> T limfociti su izolovani u negaivnoj frakciji sa čistoćom većom od 90% (utvrđeno protočnom citofluorimetrijom).

### **Test proliferacije singenih timocita i TDC**

Singeni timociti ( $1 \times 10^6$  po udubljenju) su kultivisani sa TDC (u različitim odnosima) u plastičnim mikrotitarskim pločama sa 96 udubljenja sa ravnim dnom (200 µl kompletnog medijuma/udubljenju) sa ili bez prisustva anti-TCR antitela (R7.3) (1 µg/ml). Ispitivan je uticaj mAt R-MC 17 (0,114 mg/ml) na akcesorni potencijal sveže izolovanih TDC i/ili kultivisanih TDC na proliferaciju singenih timocita. Kao irelevantno antitelo (Ir At) korišćeno je 1G2 (0,135 mg/ml). Broj sveže izolovanih TDC u kulturama sa dodatkom R7.3 je bio  $1,5 \times 10^4$ /bazenu, a duplo veći ( $3 \times 10^4$ /bazenu) u kulturama bez R7.3. Broj kultivisanih TDC u ovom testu (i u nestimulisanim i u R7.3-

stimulisanim kokulturama) je bio  $2 \times 10^4$ /bazenu. Istovremeno je ispitivano i delovanje na TDC koje su prethodno kultivisane u prisustvu GM-CSF (5 ng/ml) tokom 48 h. Broj TDC u ovim eksperimentima je bio  $2 \times 10^4$ /bazenu i u nestimulisanim i u kulturama u kojima je proliferacija timocita stimulisana delovanjem R7.3.

Kulture su inkubirane tokom 72 h na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Tokom poslednjih 18 sati kultivacije ćelijama je dodat radioaktivni timidin obeležen tricijumom (<sup>3</sup>H-timidin) (5 μCi/ml culture). Kulture su “skinute” pomoću automatskog skidača kultura *Titretek Cell Harvester*, ugradnja <sup>3</sup>H timidina je merena beta-brojačem (*LKB-1219 Rackbeta*) i izražavana kao broj otkucaja u minuti (cpm). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost broja otkucaja radioaktivnosti u minuti (cpm) triplikata kulture ± standardna devijacija (SD).

#### **Test proliferacije alogenih CD4<sup>+</sup> T limfocita i TDC**

U bazene ploče sa 96 mesta postavljen je konstantan broj TDC ( $2 \times 10^4$ /200 μl medijuma/polju) kultivisanih 48 h u punom medijumu na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> i TDC koje su prethodno kultivisane u prisustvu GM-CSF (kako je ranije opisano). Alogeni CD4<sup>+</sup> T limfociti iz limfnih čvorova DA pacova ( $2 \times 10^5$ /polju) su kultivisani sa ovako pripremljenim TDC 5 dana u kompletnom medijumu na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Tokom poslednjih 18 h kultivacije, ćelijama je dodat radioaktivni timidin obeležen tricijumom (<sup>3</sup>H-timidin) (5 μCi/ml kulture). Kulture su “skinute” pomoću automatskog skidača kultura *Titretek Cell Harvester*, ugradnja <sup>3</sup>H timidina je merena beta-brojačem (*LKB-1219 Rackbeta*) i izražavana kao broj otkucaja u minuti (cpm). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost broja otkucaja radioaktivnosti u minuti (cpm) triplikata kulture ± standardna devijacija (SD).

#### **Test rozeta TDC/timociti**

Sveže izolovane TDC najpre preinkubirane sa mAt: R-MC 17, HD83 i VAM4.1 (IrAt), sva u koncentraciji 10 μg/ml. Zatim su TDC pomešane sa sveže izolovanim timocitima u odnosu 1:5 u kompletnom medijumu i prebačene u Terasaki-ploče za postavku kulture “viseće kapi” (20 μl ćelija/polju ploče). Nakon 30 min inkubacije (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) ćelije su nežno pokupljene i napravljeni su citospin preparati koji su obojeni MGG metodom i analizirani pod svetlosnim mikroskopom. TDC koje su vezale

3 ili više timocita su brojane kao rozete. Za svaki uzorak izbrojano je 200 do 500 TDC i svako brojanje je rađeno u duplikatu. Određivana su dva parametra: formiranje rozeta (udeo TDC koje formiraju rozete u odnosu na ukupan broj TDC) i srednja vrednost broja timocita po rozeti.

### **Apoptoza timocita u kokulturi sa TDC**

Iz kulture sveže izolovanih TDC, koje su inkubirane 12 h u punom medijumu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), su izdvojene neadherentne ćelije (obogaćena populacija TDC). Ovako pripremljene TDC su postavljene u ploču sa 96 mesta sa ravnim dnom sa singenim timocitima u odnosu 1:5 u kompletnom medijumu na 37 °C, u 5% CO<sub>2</sub> u prisustvu mAt: R-MC 17, HD83 i VAM4.1 (sva mAt u koncentraciji 10 µg/ml). Posle 6 h kultivacije, određen je procenat apoptotičnih timocita primenom morfoloških kriterijuma i metodom Aneksin V FITC/propidijum jodid protočnom citofluorimetrijom.

## **ODREĐIVANJE APOPTOZE**

### **Određivanje apoptoze primenom morfoloških kriterijuma**

Apoptoza je određivana prema metodi Čolića i saradnika (Colic i sar., 2000). Ukratko, timociti čija apoptoza je određivana su fiksirani u rastvoru Türck-a (*Apoteka VMA*) (~1x10<sup>5</sup> ćelija u 50 µl Türck-a) i ostavljeni da se istalože na mikroskopskoj pločici. Preparati su analizirani na svetlosnom mikroskopu (*Reichert-Biovar*) brojanjem najmanje 500 ćelija po preparatu. Apoptotične ćelije karakteriše kondenzacija citoplazme, organela, hromatina, fragmentacije jedra i u krajnjem stadijumu formiranja apoptotskih tela. Rezultati su prikazani kao % apoptotičnih timocita u odnosu na broj ukupnih timocita.

Ovom metodom je određivana i **apoptoza timocita u rozetama sa TDC**. Apoptoza timocita je ispitivana na citospin preparatima timocita iz 30 min kokultivacije sa TDC u prisustvu i odsustvu R-MC 17, HD83 i VAM4.1 (kako je prethodno opisano). Citospin preparati su obojeni MGG-om, montirani pomoću Kanada balzama i posmatrani na svetlosnom mikroskopu (*Reichert-Biovar*). Rezultati su izraženi:

**% apoptotičnih timocita unutar rozeta** = broj apoptotičnih timocita u TDC rozetama/ukupan broj timocita u TDC rozetama x 100

### **Određivanje apoptoze primenom Aneksin V-FITC/propidijum jodida**

Timociti ( $1 \times 10^5$ ) čija apoptoza je određivana su nakon ispiranja (dva puta u hladnom PBS-u) resuspendovani u puferu za vezivanje (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) a zatim centrifugirani (600 xg, 10 min). Nakon centrifugiranja na 50 µl ćelijske suspenzije je dodat propidijum jodid (40 µg/ml) i Aneksin V FITC (10-100 µg/ml) prema uputstvu proizvođača (*Apoptosis Detection Kit, R&D Systems*). Nakon 15 min inkubacije (u mraku) na sobnoj temperaturi, ćelijama je dodato 300 µl 1x pufera za vezivanje i uzorci su odmah analizirani na protočnom citofluorimetru. Kontrolne ćelije su bile obojene samo sa Annexin V-FITC ili samo PI u cilju kompenzacije preliivanja signala u susedne FL-kanale. Nakon podešavanja protokola određen je procenat vijabilnih ćelija (Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), rano apoptotskih (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), kasno apoptotskih (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) i primarno nekrotičnih ćelija (Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>). Fluorescenca Annexin V-FITC i PI obeleženih uzoraka je određivana na protočnom citometru korišćenjem odgovarajućeg protokola.

### **CITOFUORIMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA ĆELIJA**

Iz životinja kojima su **mAt aplikovana intratimusno** izolovani su timusi, određena je celularnost kao i procenat apoptotičnih timocita (morfološkim kriterijumima). Ostatak **timocita** je ispran u hladnom PBS2 i urađena je imunofenotipska analiza na protočnom citofluorometru. Nakon brojanja, timociti su raspoređeni u epruvete za citofluorimetriju ( $1 \times 10^6$ /uzorku), istaloženi centrifugiranjem i dodata su primarna mAt za dvostruko obeležavanje: prva kombinacija anti-CD4 FITC + anti-CD8 biotin i druga kombinacija anti-CD5 FITC + anti-TCR (100 µl/uzorku u odgovarajućim razblaženjima, tabela 2). Nakon inkubacije (45 min, +4 °C) i ispiranja (PBS2) u prvu kombinaciju primarnih antitela je dodat streptavidin-PE (1:250) (*AbD Serotec, UK*). Posle inkubacije (30 min, +4 °C) ćelije su isprane u PBS1 i fiksirane u 4% formalinu (0,5 ml). U drugu kombinaciju primarnih antitela dodat je anti-mišiji Ig biotin (1:200) (*AbD Serotec, UK*) u PBS2 sa 3% NPS. Nakon 30 min inkubacije (+4 °C), i ispiranja na talog ćelija je dodat streptavidin-PE (1:250) i dodatno inkubirano 30 min pod istim uslovima. Obeležavanje je završeno ispiranjem ćelija u PBS1 i fiksiranjem u

4% formalinu (0,5 ml). Kontrolne ćelije su prošle identične procedure ali bez dodatka kombinacija primarnih antitela.

U eksperimentima u kojima je rađeno trostruko obeležavanje **TDC** primenom protočne citofluorometrije postupak obeležavanja ćelija se sastojao u sledećem. Sve ispitivane TDC (sveže izolovane, kultivisane, GM-CSF-tretirane) pre dodavanja primarnog mAt isprane u hladnom PBS2 i raspoređene u epruvete za citofluorometriju ( $1 \times 10^5$ /uzorku). Na ćelije je dodato 50  $\mu$ l primarnog neobebeženog mAt R-MC 17 (1:200) i inkubirano 30 min na +4 °C. Nakon ispiranja, ćelije su inkubirane sa 50  $\mu$ l sekundarnog antitela (ovčiji anti-mišiji Ig biotina, 1:50) (*Serotec, UK*) u prisustvu 4% normalnog pacovskog seruma u PBS2. Nakon 30 min, ćelije su prvo inkubirane 20 min u prisustvu 5% normalnog mišjeg seruma, a zatim nakon ispiranja inkubirane još 30 min sa 50  $\mu$ l streptavidin-PECy5 (1:160) (*eBioscience*). Posle dvostrukog ispiranja u PBS2, ćelije su inkubirane 30 min sa direktno obebeženim primarnim mAt anti-CD11b-FITC i OX-6-PE (u odgovarajućim razblaženjima, tabela 2). U završnoj fazi postupka, ćelije su dva puta isprane u PBS1 i fiksirane u 4% formalinu. Za određivanje nivoa nespecifične fluorescence ćelije su inkubirane sa IrAt (CBH11).

Detaljna fenotipska analiza CD11b<sup>-</sup> i CD11b<sup>+</sup> subpopulacije TDC je izvedena primenom softvera *FCS Express 4* na OX-6<sup>+</sup> ćelijama u regionima definisanim na osnovu ekspresije CD11b molekula.

Na sličan način urađena je i fenotipizacija **R-TNC.1** ćelija. Ukratko, nakon ispiranja, ćelije ( $1 \times 10^6$ ) su raspoređene u epruvete za citofluorimetriju i inkubirane (45 min, +4 °C) sa primarnim monoklonskim antitelima odgovarajućeg razblaženja (tabela 2). Nakon inkubacije i ispiranja u PBS2, na talog ćelija je dodato po 100  $\mu$ l sekundarnog antitela konjugovanog fluorescein-izotiocijanatom (FITC) (1:200). Posle inkubacije od 30 min, ćelije su isprane u PBS1 i fiksirane u 4% formalinu (0,5 ml). Za određivanje nivoa nespecifične fluorescence ćelije su inkubirane IrAt.

Nakon imunofluorescentnog obeležavanja ćelija, procentualna zastupljenost obebeženih ćelija u pojedinim ćelijskim populacijama određivana je na protočnom citometru EPICS XL-MCL (*Coulter, Krefeld, Nemačka*) sa argonskim laserom maksimalne snage 12W i talasne dužine 488 nm, korišćenjem programa *SYSTEM™ II software*. Pre svake analize je izvršena kompenzacija signala.

Rezultati citofluorimetrijske analize su predstavljeni kao procenat obeleženih ćelija, srednji intenzitet fluorescence (*mean fluorescence intensity*-MFI) i u obliku jednoparametarskih i dvoparametarskih histograma fluorescence. Jednoparametarski histogram je predstavljen intenzitetom fluorescence logaritamskom skalom na x osi i linearnom skalom broja analiziranih ćelija na y osi, a na dvoparametarskom histogramu obe skale nose logaritamsku podelu i predstavljena je fluorescenca dva različita fluorohroma.

### **INTRATIMUSNO UBRIZGAVANJE MAT**

Antitela, R-MC 17 i CBH11 (IrAt) su ubrizgana direktno u timus AO pacovima (starosti 6 - 8 nedelja) prethodno anesteziranim primenom tiopentala (45 mg/kg) (*Rotexmedica, Nemačka*). Eksperimentalnim grupama životinja (po 3 pacova) je u svaki lobus timusa aplikovano 1 mg/kg R-MC 17 u zapremini od 50  $\mu$ l, dok su kontrolne životinje (dve grupe po 3 životinje) primile IrAt CBH11 (u istoj koncentraciji) i PBS u istoj zapremini (50  $\mu$ l/lobusu). Nakon 5 dana životinje su žrtvovane i izolovani su timociti koji su analizirani kako je prethodno opisano.



**Slika 1. Uticaj R-MC 17 mAt na intratimusno diferentovanje T limfocita.** R-MC 17 mAt, IrAt i/ili PBS su ubrizgavani intratimusno u koncentraciji 1 mg/kg telesne mase pacova (50  $\mu$ l/lobusu). Nakon 5 dana životinje su žrtvovane, izolovan je timus i urađena je analiza subpopulacija timocita kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*.

## **STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD iz najmanje 3 nezavisna eksperimenta. Za upoređivanje tretmana sa odgovarajućom kontrolom korišćeni su parametarski testovi (Studentov *t*-test).

## REZULTATI

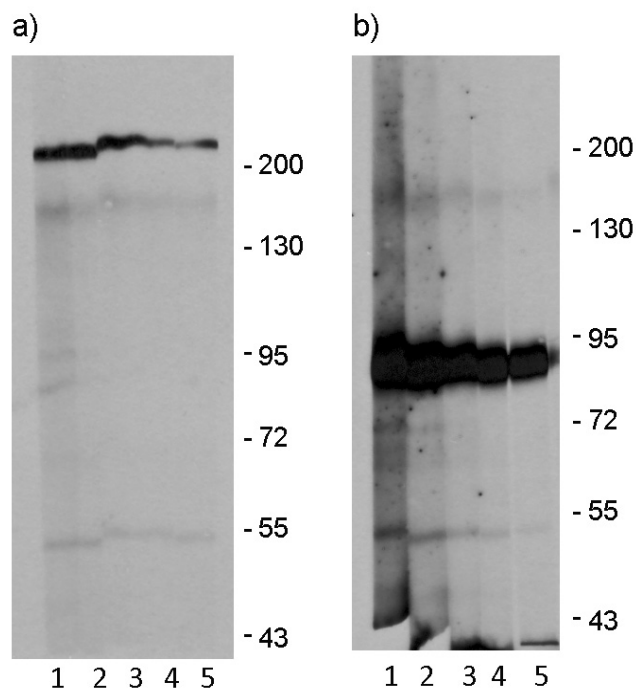
### R-MC 17 MONOKLONSKO ANTITELO

R-MC 17 mAt je dobijeno u IMI VMA fuzijom splenocita BALB/c miša imunizovanog susupenzijom timusa AO pacova obogaćenom nelimfoidnim ćelijama i P-3-X63-Ag 8.653 mijelomske ćelijske linije. Izotip ovog mAt je IgG1. Nakon fuzije i serije "screening" testova pokazano je da se antitelo selektivno vezuje za korteks timusa i pojedine ćelije u meduli (Čolić i sar., 1988.). Zbog interesantnog obrasca bojenja ovo antitelo je u daljim istraživanjima detaljnije okarakterisano biohemijski, imunohistohemijski i funkcionalno.

### BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA R-MC 17 ANTIGENA

Prvi cilj eksperimenata prikazanih u ovoj tezi je bio biohemijska karakterizacija antigena koje prepoznaje R-MC 17 mAt. Najpre je izvršeno liziranje i solubilizacija (nejonskim detergentom NP-40) antigena prisutnih u suspenziji ćelija timusa pacova obogaćenoj nelimfoidnom frakcijom (stromalne ćelije). Reaktivnost R-MC 17 mAt je ispitana *Western*-blotom, posle elektroforeze i prenosa na nitroceluloznu membranu. Pokazano je da R-MC 17 mAt pod neredukujućim uslovima jasno detektuje jedan molekul čija je molekulska masa iznosila oko 205 kDa. Kao pozitivna kontrola korišćeno je mAt istog izotipa (IgG1), NG2B12, ranije produkovano u IMI VMA, koje specifično prepoznaje molekul od 90-95 kDa, jedan od epitopa CD18 molekula pacova (Pavlović i sar., 1994.) (Slika 2).

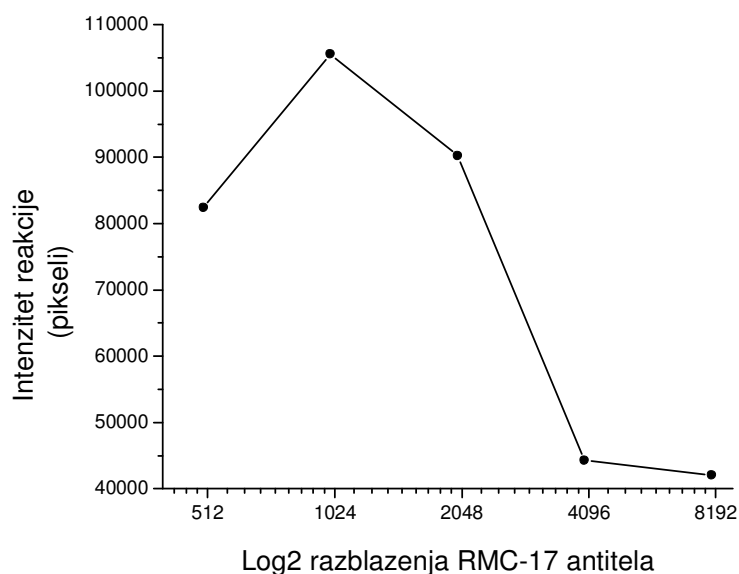




Slika 2. Biohemijska karakterizacija R-MC 17 antigena iz lizata timusnih ćelija pomoću SDS PAGE 6% i *Western-blot*a pod neredukujućim uslovima. a) R-MC 17 mAt (1-5 dvostruka serijska razblaženja R-MC 17); b) NG2B12 mAt (pozitivna kontrola) (1-5 dvostruka serijska razblaženja NG2B12). Brojevi sa strane označavaju proteinske standarde poznate molekulske mase.

Uočava se da R-MC 17 mAt reaguje sa molekulom od 200-205 kDa (a), a pozitivna kontrola NG2B12 mAt sa molekulom od 90-95 kDa (b). Molekulska masa antigena je određena na osnovu proteinskih standarda molekulske mase označene u kDa, primenom softvera (videti *Materijal i metode*), kojim je moguće izmeriti Rf vrednosti za svaku traku, kao i odrediti intenzitet autoradiografski detektovanog signala.

Takođe smo proverili reaktivnost R-MC 17 u različitim koncentracijama mAt. Na osnovu denzitometrijski dobijenih vrednosti intenziteta reakcije u *Western-blot*u, uočava se da, u opsegu primenjenih koncentracija mAt, reaktivnost mAt R-MC 17 ima zvonastu raspodelu (slika 3).



Slika 3. **Reaktivnost mAt R-MC 17.** Signali detektovani primenom različitih koncentracija mAt R-MC 17 u *Western*-blotu su kvantifikovani denzitometrijski.

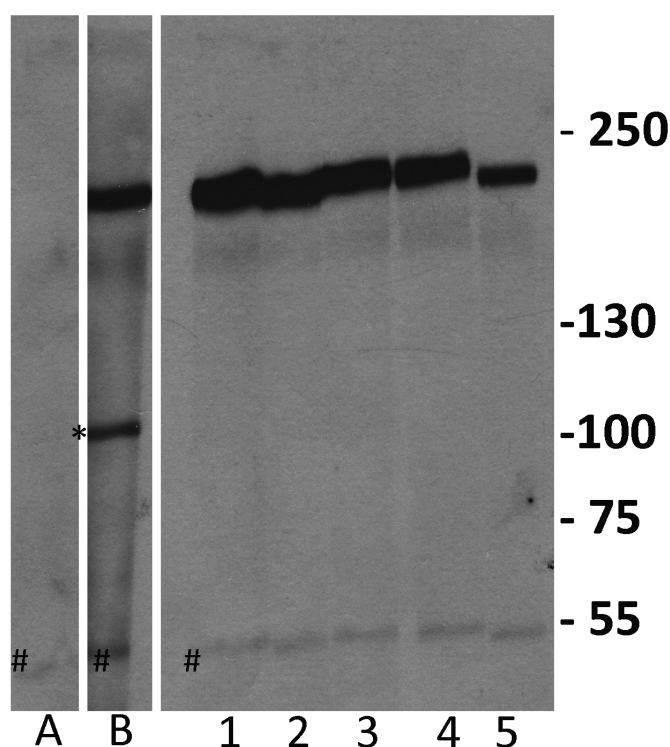
Pod neredukujućim uslovima, postojanje slobodnih sulfhidrilnih grupa, ali i intramolekulskih disulfidnih mostova, daje mogućnost formiranja nasumičnih disulfidnih veza kako intra- tako i inter-molekulskih, što može biti osnova za formiranje proteinskih agregata. Vezivanje detektujućeg antitela (R-MC 17) za ove agregate bi moglo da navede na pogrešan zaključak o molekularnoj masi ispitivanog molekula. Pod redukujućim uslovima, takođe dolazi do disocijacije disulfidnim mostovima povezanih subjedinica, ukoliko ispitivani protein ima kvaterni nivo strukture.

Imajući na umu ovu mogućnost, u sledećem koraku smo ponovili proceduru pod redukujućim uslovima (dodavanjem DTT, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*). Nakon SDS PAGE i *Western*-blota u redukujućim uslovima, pokazali smo da u lizatu timusnih ćelija obogaćenih nelimfoidnom frakcijom, R-MC 17 mAt gubi reaktivnost (*rezultati nisu prikazani*).

Polazeći od dobijenih rezultata o molekularnoj masi antigena koga detektuje R-MC 17 mAt i preliminarnih rezultata o tkivnoj distribuciji R-MC 17 antigena pretpostavili smo da bi R-MC 17 antigen mogao biti molekul DEC-205. U cilju potvrde ove

pretpostavke u narednom nizu eksperimenata smo koristili mAt HD83 koje prepoznaje DEC-205 molekul kod pacova.

Prvo smo proverili reaktivnost ovog antitela u lizatu timusa pacova i uporedili je sa R-MC 17 mAt primenom SDS-PAGE i *Western blot* analize u neredukujućim uslovima (slika 4) i softverskom obradom denzitometrijski kvantifikovanih signala.

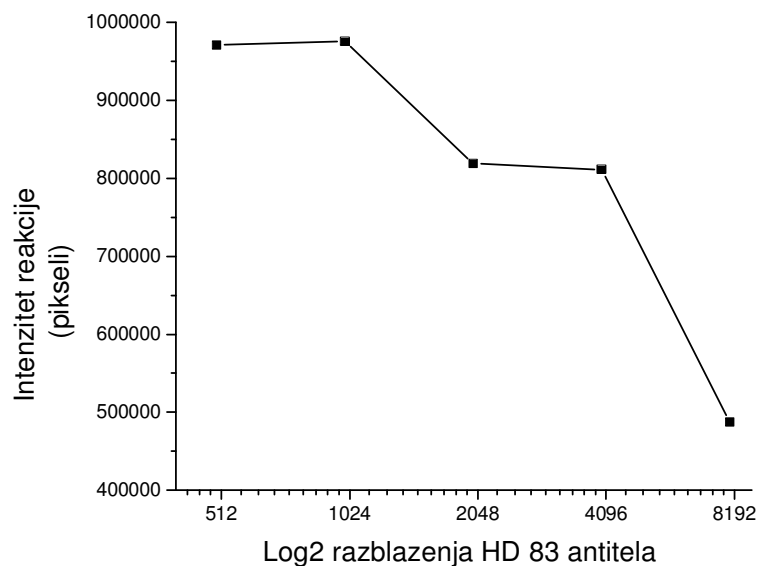


Slika 4. Biohemijska karakterizacija R-MC 17 antigena iz lizata timusnih ćelija pomoću SDS PAGE 6% i *Western-blot*a pod neredukujućim uslovima. A) negativna kontrola; B) R-MC 17 mAt (purifikovani ascit); 1-5) HD83 mAt (dvostruka serijska razblaženja anti-DEC205 mAt). Molekulska masa antigena je određena na osnovu proteinskih standarda poznate molekulske mase označene u kDa. \*-specifična reaktivnost mAt R-MC 17; #-nespecifična reaktivnost

Dobijeni rezultati su pokazali da RMC-17 mAt i HD83 mAt prepoznaju molekul iste molekulske mase u pacovskom timusu (slika 4)

Zatim smo proverili reaktivnost HD83 primenom *Western-blot*a pri različitim koncentracijama mAt. Uočava se da kriva denzitometrijski dobijenih vrednosti

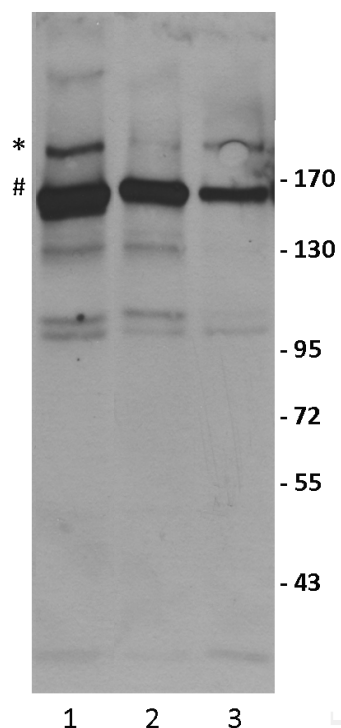
intenziteta reakcije u opsegu primenjenih koncentracija mAt ima dvostepeni oblik (slika 5), što ukazuje na mogućnost postojanja dva subklona ovog mAt.



Slika 5. **Reaktivnost mAt HD83.** Signali detektovani primenom različitih koncentracija mAt HD83 u *Western-* blotu su kvantifikovani denzitometrijski

U redukujućim uslovima, HD83 mAt, identično kao i R-MC 17 mAt, ne prepoznaje specifičan antigen u lizatu pacovskog timusa (*rezultati nisu prikazani*).

U cilju finalne provere da li HD83 mAt i R-MC 17 mAt prepoznaju identičan molekul u pacovskom timusu ili se radi o različitim molekulima iste molekulske mase, u narednoj seriji eksperimenata smo uradili imunoprecipitacijske eksperimente. Iz ukupnog lizata pacovskog timusa smo najpre imunoprecipitacijom mAt HD83 uklonili molekul DEC-205. Potom smo u ostatku lizata odredili reaktivnost R-MC 17 mAt, primenom SDS-PAGE. Trake odgovarajuće molekulske mase smo detektovali *Western-* blotom (slika 6).



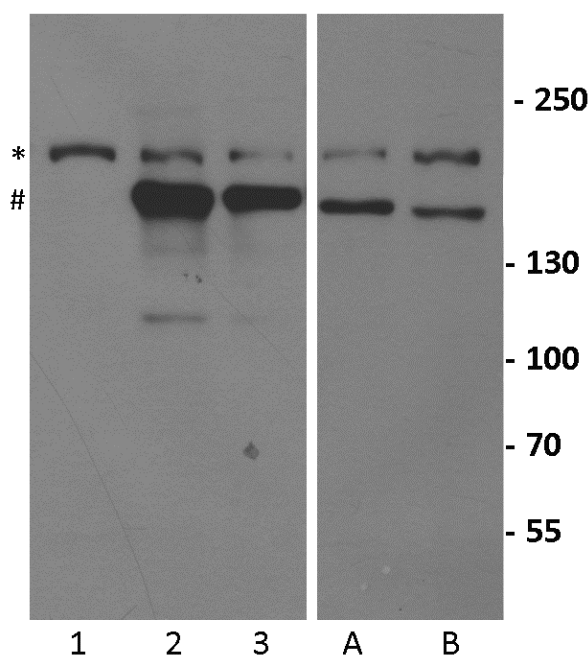
Slika 6. Biohemijska karakterizacija R-MC 17 antigena iz lizata timusnih ćelija pomoću SDS PAGE 6% i *Western-blot*a pod neredukujućim uslovima. 1) reaktivnost R-MC 17 mAt sa molekulom od 200-205 kDa u ukupnom lizatu; 2) odsustvo reaktivnosti R-MC 17 mAt posle specifične imunoprecipitacije HD83 mAt (4 µg/mg proteina) 3) odsustvo reaktivnosti R-MC 17 mAt posle specifične imunoprecipitacije HD83 mAt (1 µg/mg proteina). \*specifična reaktivnost mAt R-MC 17; #reaktivnost sekundarnog antitela u *Western-blot*u sa imunoglobulinima iz imunoprecipitata

Tabela 3. Softverska obrada denzitometrijski kvantifikovanog signala dobijenog u *Western-blot*u

Precipitujuće mAt	Ukupan lizat (prekliring)	HD83 4 µg/mg proteina	HD83 1 µg/mg proteina
% prisustva reaktivnosti R-MC 17 mAt	100%	15%	51%

Poređenjem reaktivnosti R-MC 17 mAt u ukupnom lizatu timusa i u HD83-osiromašenom lizatu detektovana je redukcija količine R-MC 17 antigena (slika 6, tabela 3). Autoradiografski signal je kvantifikovan denzitometrijski i softverski obrađen.

Zatim smo uradili isti eksperiment, ali smo obrnuli redosled primene mAt. Najpre smo uradili imunoprecipitaciju lizata timusa mAt R-MC 17. R-MC 17-osiromašeni lizat smo analizirali primenom SDS-PAGE. Potom smo ciljani antigen detektovali mAt HD83 primenom *Western*-blota.



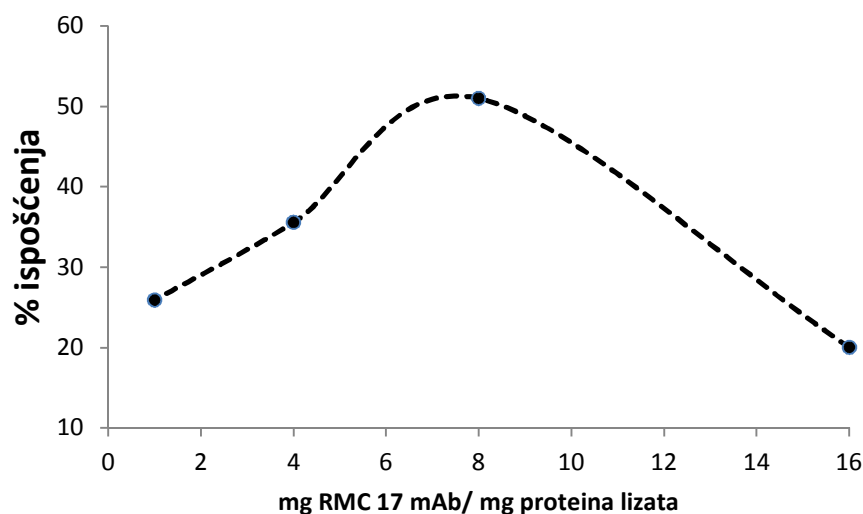
**Slika 7. Biohemijska karakterizacija HD83 antigena iz lizata timusnih ćelija pomoću SDS PAGE 6% i *Western*-blota pod neredukujućim uslovima.** 1) reaktivnost HD83 mAt sa molekulom DEC-205 (205 kDa) u ukupnom lizatu; 2) odsustvo reaktivnosti HD83 mAt posle specifične imunoprecipitacije R-MC 17 mAt (16  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteina); 3) odsustvo reaktivnosti HD83 mAt posle specifične imunoprecipitacije R-MC 17 mAt (8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteina); A) odsustvo reaktivnosti HD83 mAt posle specifične imunoprecipitacije HD83 mAt (4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteina) B) odsustvo reaktivnosti HD83 mAt posle specifične imunoprecipitacije HD83 mAt (2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteina) \*specifična reaktivnost mAt HD83; #reaktivnost sekundarnog antitela u *Western*-blotu sa imunoglobulinima iz imunoprecipitata

Tabela 4. **Softverska obrada denzitometrijski kvantifikovanog signala dobijenog u Western-blotu**

Precipitujuće mAt	Ukupan lizat	R-MC 17 16 µg/mg proteina	R-MC 17 8 µg/mg proteina	HD83 4 µg/mg proteina	HD83 2 µg/mg proteina
% prisustva reaktivnosti HD83 mAt	100%	91%	42%	33%	81%

Dobijeni rezultati su pokazali da je i u ovoj kombinaciji došlo do redukcije HD83-specifične proteinske trake (slika 7, tabela 4) i potvrdili prethodne rezultate.

Ono što se takođe uočava jeste da je zaostala reaktivnost HD83 mAt u lizatu posle specifične imunoprecipitacije manjom koncentracijom mAt R-MC 17 manja u poređenju sa reaktivnošću ovog mAt u lizatu osiromašenom delovanjem veće koncentracije R-MC 17. Denzitometrijskom obradom ovih signala izračunat je procenat ispošćenja odnosno deplecije R-MC 17 antigena u lizatu timusa. Dobijeni rezultati, prikazani na slici 8, su pokazali da primenjena veća koncentracija mAt R-MC 17 nije dovela do optimalne imunoprecipitacije, odnosno do formiranja maksimalne količine imunoprecipitata.



Slika 8. **Reaktivnost mAb R-MC 17 u reakciji imunoprecipitacije.** Signali detektovani primenom različitih koncentracija mAb R-MC 17 u reakciji imunoprecipitacije su kvantifikovani denzitometrijski. Izračunat je procenat ispošćenja u odnosu na ukupan (netretiran) lizat.

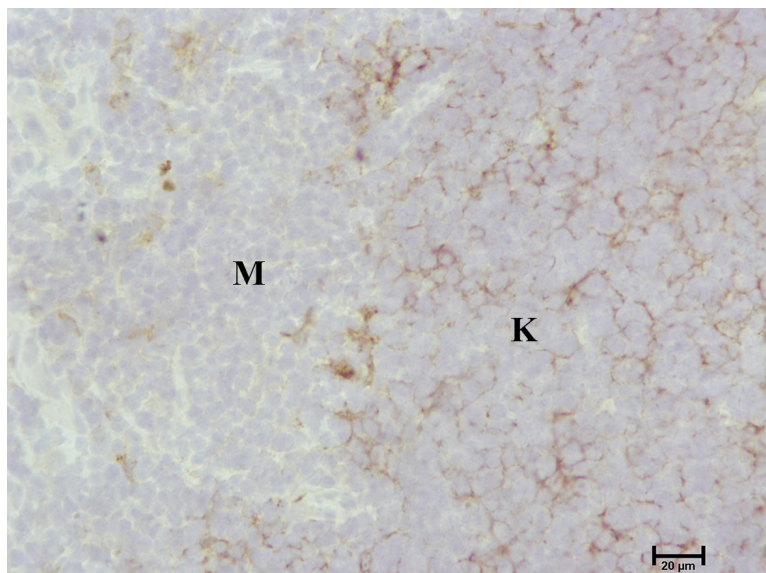
Na osnovu ovog dela rezultata sa velikom verovatnoćom možemo pretpostaviti da R-MC 17 mAb i HD83 mAb prepoznaju isti molekul, tj. da R-MC 17 mAb detektuje DEC-205 antigen u timusu pacova.

### **IMUNOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA R-MC 17 MONOKLONSKOG ANTITELA**

U okviru imunohistohemijske karakterizacije R-MC 17 mAb pošli smo od prvih publikovanih podataka da se ovo antitelo vezuje za keratin-pozitivne ćelije u korteksu timusa i pojedine keratin-negativne ćelije u meduli timusa (Čolić i sar., 1988.). Zbog toga je prvi cilj ovog dela istraživanja bio da se pokaže povezanost obrasca vezivanja R-MC 17 antitela u timusu sa ekspresijom MHC molekula II klase koristeći imunoenzimske metode (streptavidin-biotin imunoperoksidazno bojenje i APAAP). Analizom tkivnih preseka timusa potvrđeno je ranije zapažanje da se R-MC 17 mAb

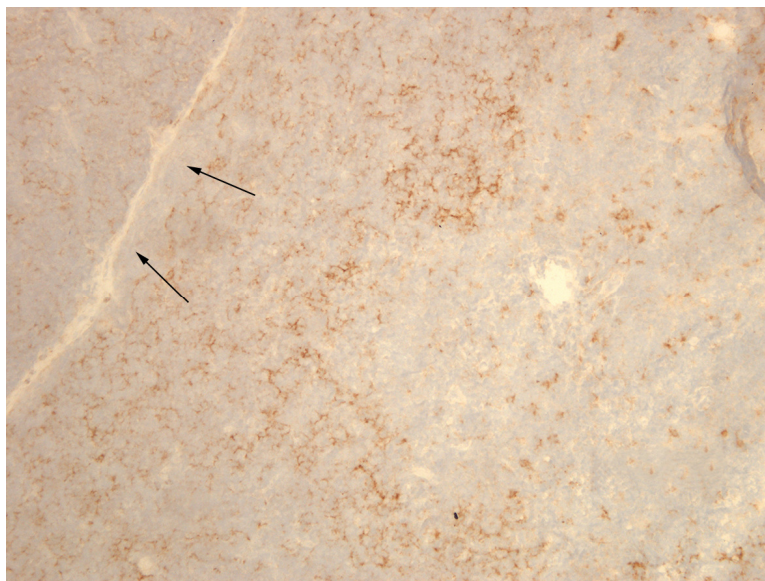


vezuje za kortikalne TEC i pojedine ćelije u meduli koje po morfološkim karakteristikama liče na DC (slika 9).



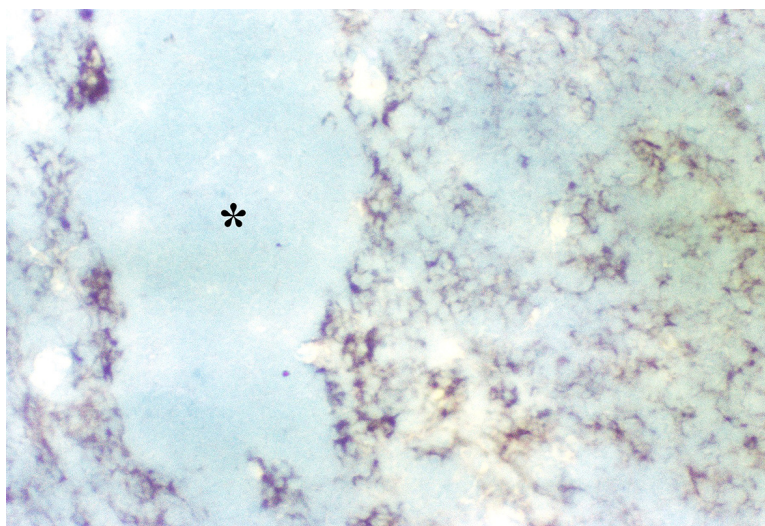
**Slika 9. Streptavidin-biotin imunoperoksidazno bojenje timusa pacova R-MC 17 mAt.** R-MC 17 mAt se vezuje za EC u korteksu (K) i pojedinačne ćelije u meduli (M) timusa. Uvećanje objektiva x 40.

Sloj subkapsularnog/subtrabekularnog epitela, je bio negativan (slika 10).



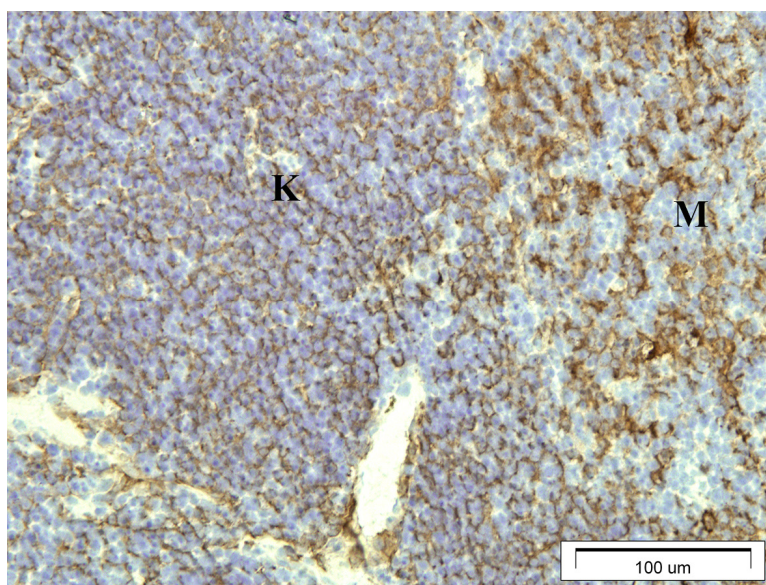
Slika 10. **Imunohistohemijsko bojenje timusa pacova pomoću R-MC 17 mAt.** Uočavaju se R-MC 17 negativne subkapsularne/subtrabekularne EC (strelica). Uvećanje objektiva x 10.

Takođe, bezepitelne zone u korteksu timusa su bile negativne (slika 11).



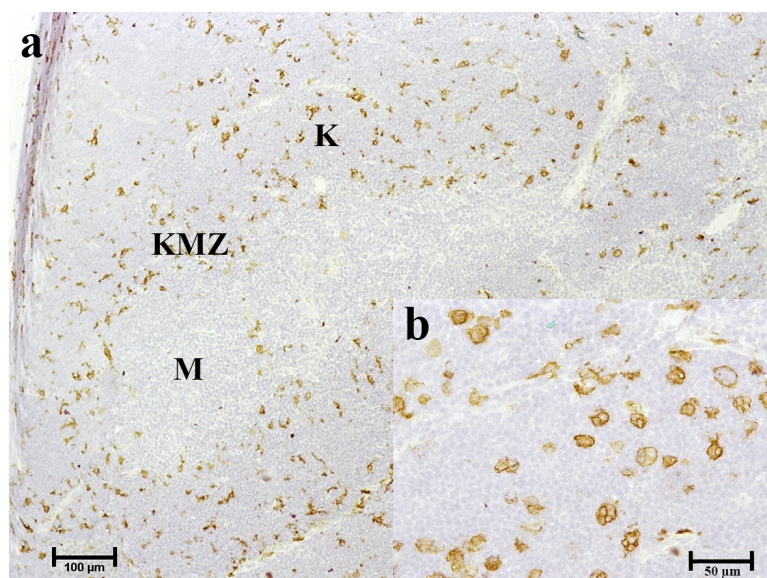
Slika 11. **Imunohistohemijsko bojenje timusa pacova pomoću R-MC 17 mAt.** Uočavaju se negativne bezepitelne zone (\*). Uvećanje objektiva x 40.

Molekuli II klase MHC u timusu su ispoljeni na znatno većem broju ćelija i to EC u korteksu i meduli, DC u meduli i makrofagama u korteksu i meduli (slika 12).



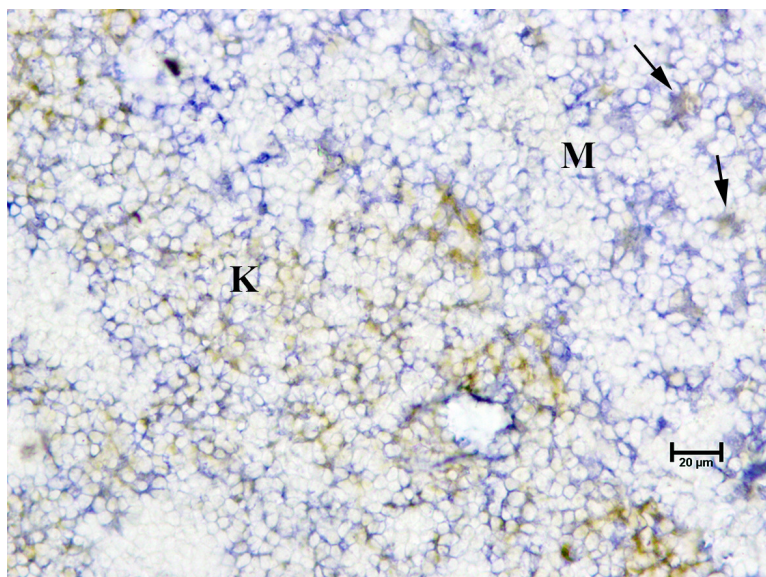
Slika 12. Streptavidin-biotin imunoperoxidazno bojenje timusa pacova OX-6 mAt. OX-6 mAt se vezuje za MHC molekule II klase na APC korteksa (K) (epitelne) i medule (M) timusa (EC, DC i makrofage). Uočava se jače vezivanje za MHCII<sup>+</sup> ćelije u meduli timusa u odnosu na korteks. Uvećanje objektiva x 20.

U cilju provjere da li se imunoreaktivnost R-MC 17 mAt poklapa sa reaktivnošću antitela za pacovske makrofage, preseci timusa su obojeni 5G1 mAt. Na slici 13 se uočava jasna pozitivnost makrofaga u korteksu i kortikomedularnoj zoni koja je drugačija od reaktivnosti R-MC 17 mAt.



Slika 13. Streptavidin-biotin imunoperoxidazno bojenje timusa pacova 5G1 mAt. 5G1 mAt se vezuje za makrofage korteksa (K) i kortikomedularne zone (KMZ) timusa. Uvećanje objektiva x 10 (a), x 40 (b).

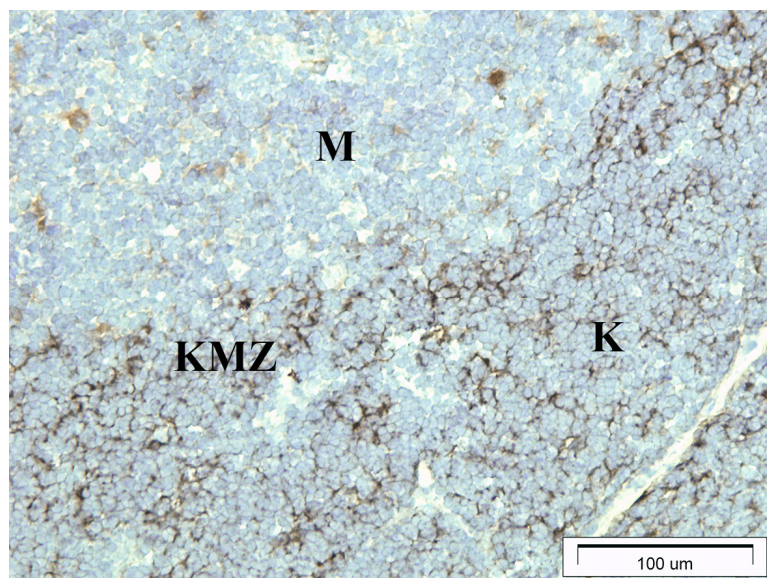
U narednom koraku je urađeno dvostruko obeležavanje ćelija pomoću R-MC 17 mAt i OX-6. Pokazano je da su kortikalne EC i pojedinačne ćelije u meduli timusa dvostruko (R-MC 17 i OX-6) pozitivne, odnosno istovremeno ispoljavaju i R-MC 17 antigen i molekule II klase MHC (slika 14).



Slika 14. Dvostruko imunohistohemijsko bojenje timusa pacova pomoću R-MC 17 mAt (HRP) i OX-6 mAt (APAAP). Uočava se da su kortikalne (K) EC i pojedinačne ćelije u meduli (M) istovremeno MHCII<sup>+</sup>R-MC 17<sup>+</sup> (strelica). Uvećanje objektivna x 40.

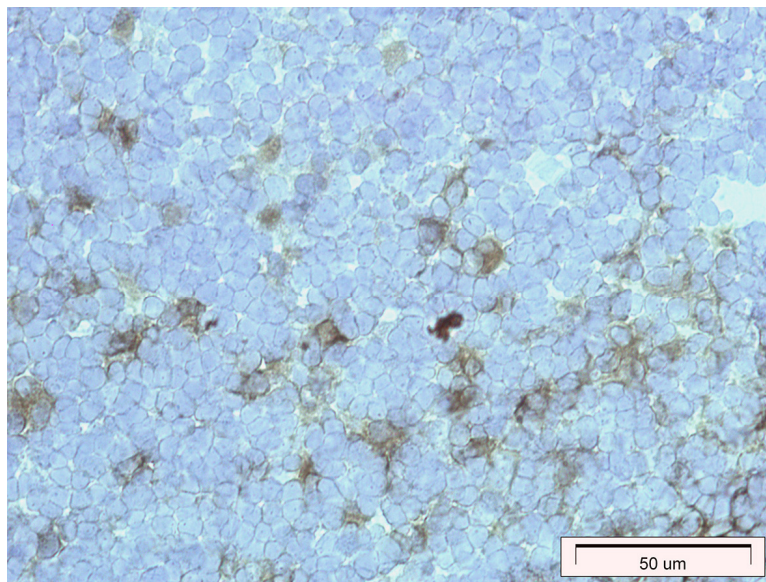
Na osnovu ovih nalaza i ranije karakterizacije sa anticitokeratinskim antitelima (Colic i sar., 1988) moglo se sa velikom verovatnoćom pretpostaviti da R-MC 17 mAt detektuje kortikalne TEC i medularne DC. Finalna potvrda ove hipoteze je bila na osnovu poređenja sa ekspresijom HD83 mAt.

HD83 mAt (anti-DEC 205 mAt) je pokazivalo identičan obrazac bojenja kao i R-MC 17 mAt s tim što je intenzitet reakcije bio nešto jači primenom HD83 mAt. U korteksu timusa HD83 mAt se vezivalo za kortikalne TEC (slika 15).



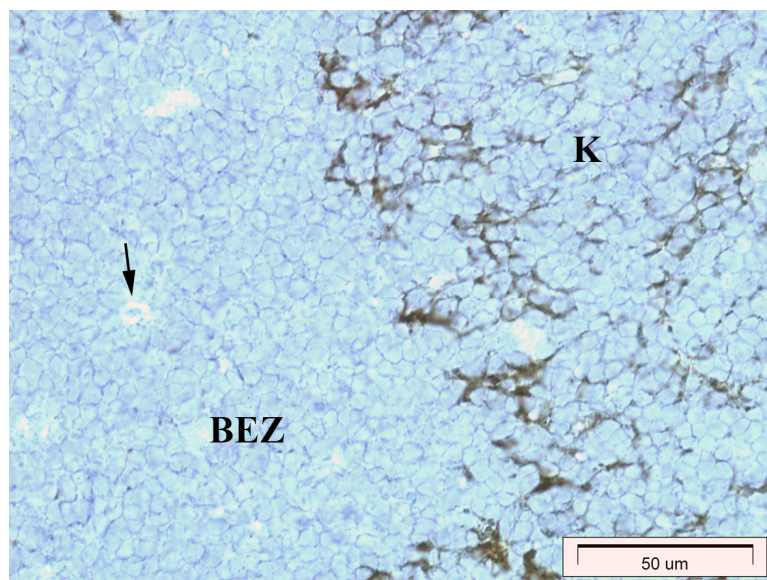
Slika 15. **Imunoperoksidazno bojenje timusa pacova HD83 mAt.** Uočava se snažna pozitivnost EC u kortikalnom (K) i regionu kortikomedularne zone (KMZ) timusa, kao i pojedinačne pozitivne ćelije u meduli (M). Uvećanje objektiva x 20.

U meduli timusa, ovo mAt je obeležavalo pojedinačne zvezdolike ili „razgranate“ ćelije koje su nalikovale TDC (slika 16).



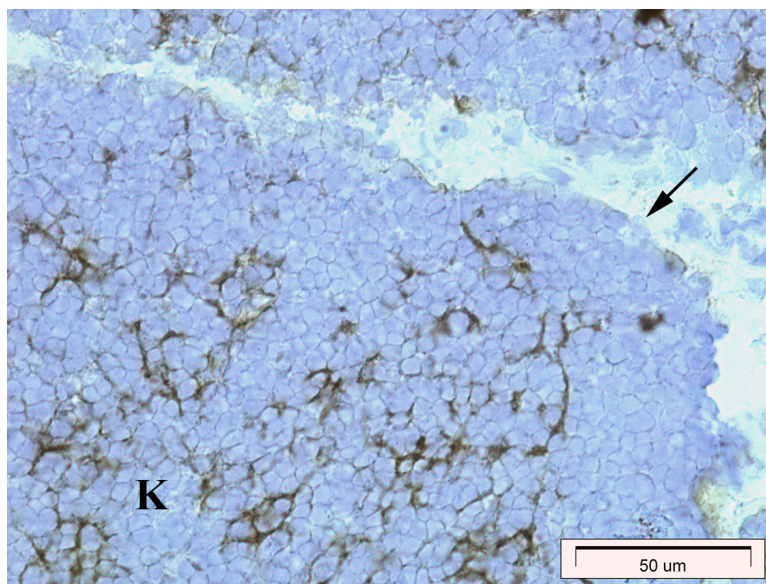
Slika 16. **Imunoperoxidazno bojenje timusa pacova HD83 mAb.** Uočavaju se pojedinačne pozitivne DC-slične ćelije u meduli timusa. Uvećanje objektiva x 40.

Intezitet bojenja u korteksu je bio jači nego u meduli, posebno na granici bezepitelnih zona (koje su jasno negativne) i kortikomedularne zone (slika 17). Subkapsularne EC, perivaskularne EC u korteksu i medularne EC su bile HD83 negativne (slika 17 i slika 18).



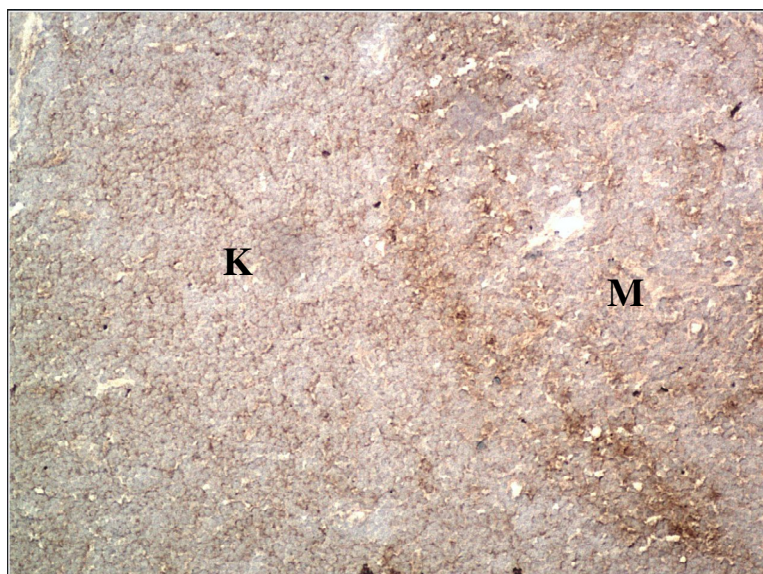
Slika 17. **Imunoperoksidazno bojenje timusa pacova HD83 mAb.** Uočava se pozitivnost EC na granici korteksa (K) i bezepitelne zone (BEZ ). BEZ i perivaskularne EC (strelica) su HD83<sup>+</sup>. Uvećanje objektivna x 40.



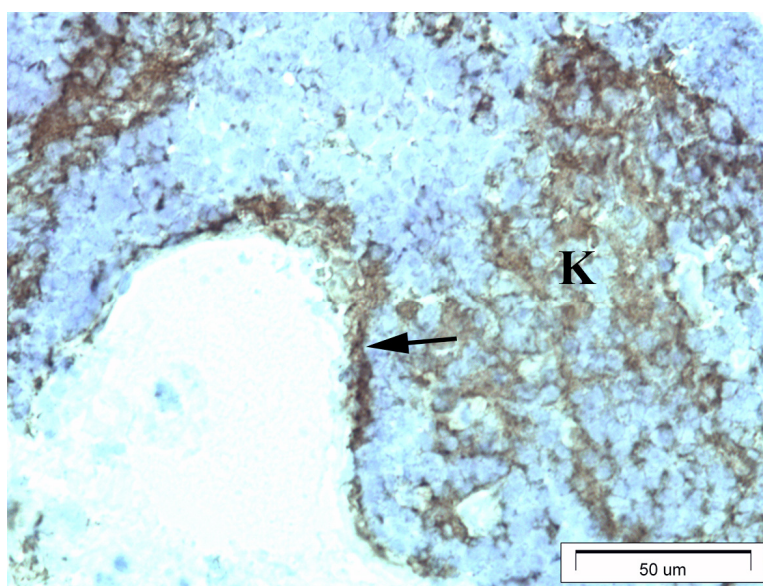


Slika 18. **Imunoperoksidazno bojenje timusa pacova HD83 mAt.** Uočava se pozitivnost EC korteksa (K). Subkapsularne EC (strelica) su HD83<sup>+</sup>. Uvećanje objektiva x 40.

Kada smo uporedili ovaj nalaz i bojenje timusa mAt OX-6, zapazili smo da su i kortikalne i medularne TEC (slika 19), uključujući subkapsularne/perivaskularne TEC (slika 20) MHC II pozitivne.

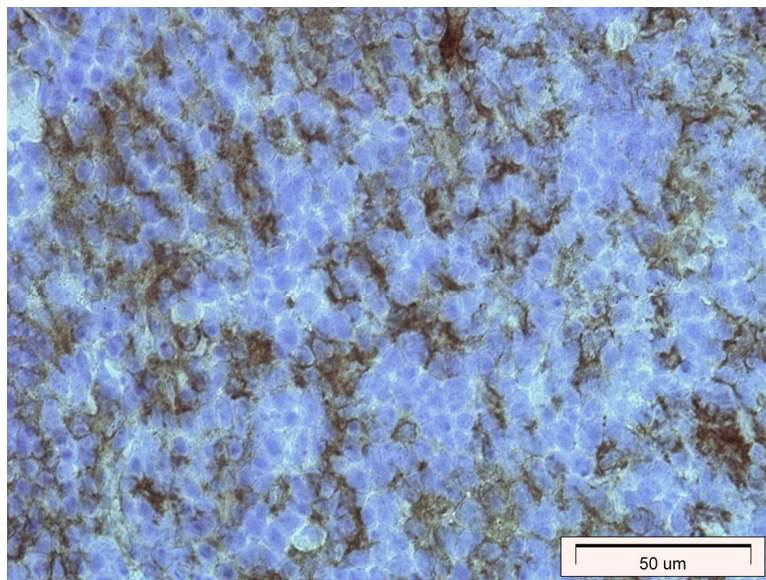


Slika 19. **Imunoperoksidazno bojenje timusa pacova OX-6 mAt.** Uočava se pozitivnost EC korteksa (K) i medule (M) koje ispoljavaju molekule MHC II klase. Uvećanje objektiva x 20.

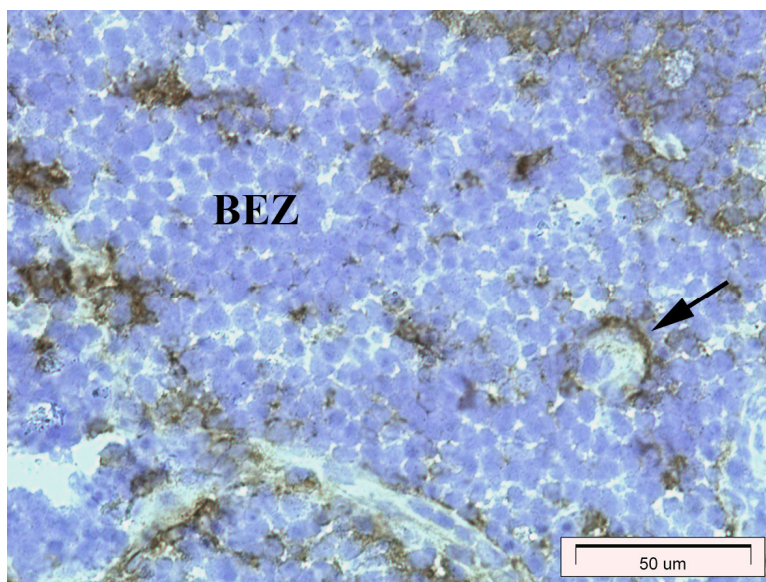


Slika 20. **Imunoperoksidazno bojenje timusa pacova OX-6 mAt.** Uočava se pozitivnost subkapsularnih EC (strelica) i EC korteksa (K) koje su MHCII<sup>+</sup>. Uvećanje objektiva x 40.

Takođe, TDC u meduli (slika 21) i makrofagama slične ćelije prisutne u svim zonama (uključujući makrofage u bezepitelnim zonama) ispoljavale su molekule II klase MHC (slika 22).



Slika 21. **Imunoperoxidazno bojenje timusa pacova OX-6 mAt.** Uočava se pozitivnost EC i TDC medule. Uvećanje objektiva x 40.



Slika 22. **Imunoperoxidazno bojenje timusa pacova OX-6 mAt.** Uočava se pozitivnost pojedinačnih makrofaga i perivaskularnih TEC (strelica) u bezepitelnim zonama (BEZ). Uvećanje objektiva x 40.

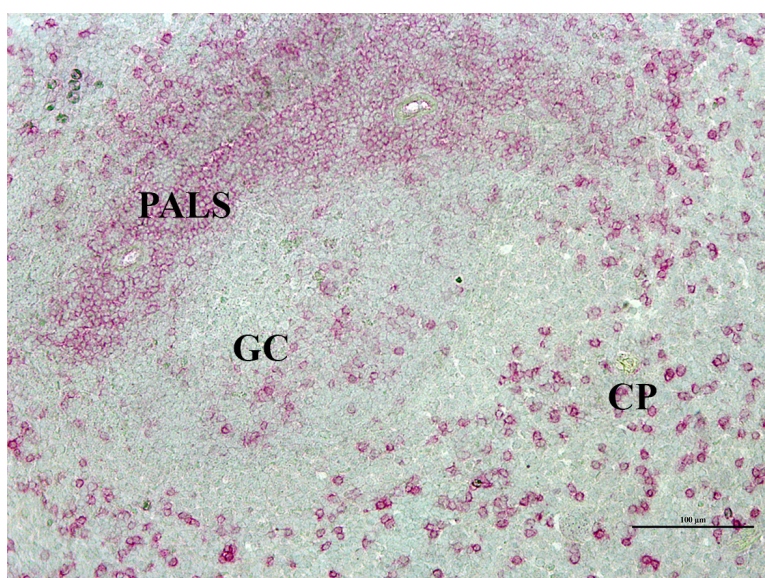
Na osnovu svih ovih detaljnih komparativnih ispitivanja moglo se sa velikom verovatnoćom pretpostaviti da R-MC 17 mAt i HD83 mAt imaju isti obrazac bojenja. Na osnovu imunohistohemijske analize timusa i biohemijske karakterizacije, zaključeno je da R-MC 17 mAt prepoznaje pacovski DEC-205 molekul, koji je ispoljen na kortikalnom TEC i TDC u kortikomedularnoj zoni i meduli timusa adultnih pacova.

**Tabela 5. Uporedna analiza obrasca bojenja preseka timusa pacova R-MC 17 mAt i HD83 mAt**

STRUKTURE	REAKTIVNOST		INTENZITET REAKCIJE	
	R-MC 17	HD83	R-MC 17	HD83
<b>Kortikalne TEC</b>	pozitivne	pozitivne	umeren	jak
<b>Subkortikalne TEC</b>	negativne	negativne	-	-
<b>Kortiko- medularne TEC</b>	pozitivne	pozitivne	umeren	jak
<b>Medularne TEC</b>	negativne	negativne	-	-
<b>Bezepitelne zone</b>	negativne	negativne	-	-
<b>TDC</b>	pozitivne	pozitivne	umeren	jak

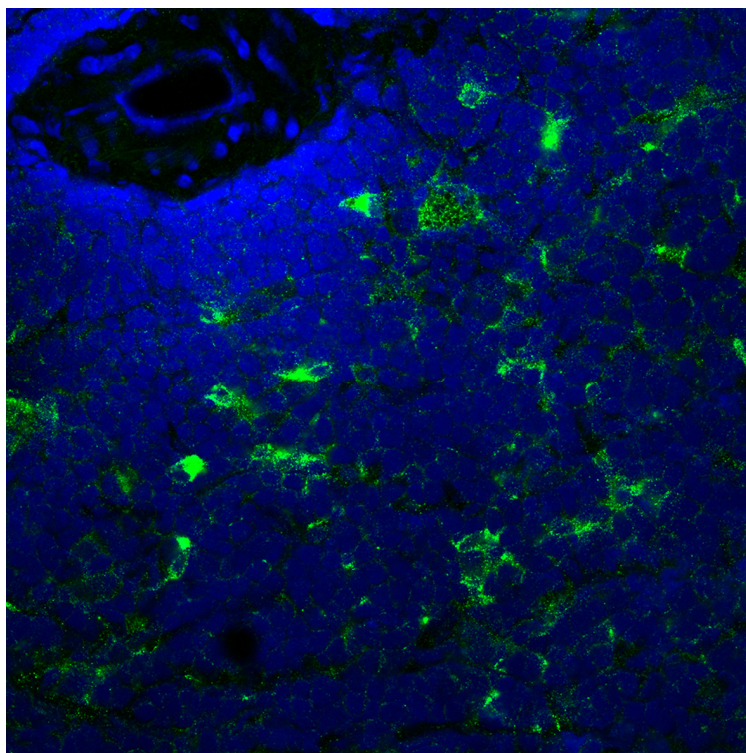
### Ekspresija R-MC 17 antigena u slezini

U daljoj analizi smo ispitali reaktivnost mAt R-MC 17 u tkivu slezine adultnih AO pacova. Koristili smo imunoenzimsku metodu bojenja APAAP i imunofluorescentno obeležavanje. Analizom preparata uočeno je da su ćelije koje prepoznaje R-MC 17 mAt prisutne i u crvenoj i u beloj pulpi. U crvenoj pulpi (CP) uočavaju se pojedinačne pozitivne ćelije koje bi po morfologiji mogle da odgovaraju makrofagama. U beloj pulpi je pokazana pozitivnost u periarteriolarom limfnom omotaču (PALS-u) i pojedinim ćelijama u germinativnim centrima folikula (GC) (slika 23).



Slika 23. **Imunohistochemijsko bojenje timusa pacova pomoću R-MC 17 mAt (APAAP).** Uočavaju se R-MC 17<sup>+</sup> ćelije u beloj pulpi (PALS i pojedinačne ćelije u GC) i crvenoj pulpi (makrofage). PALS- periarteriolarni limfni omotač; GC – germinativni centar; CP – crvena pulpa. Uvećanje objektiva x 20.

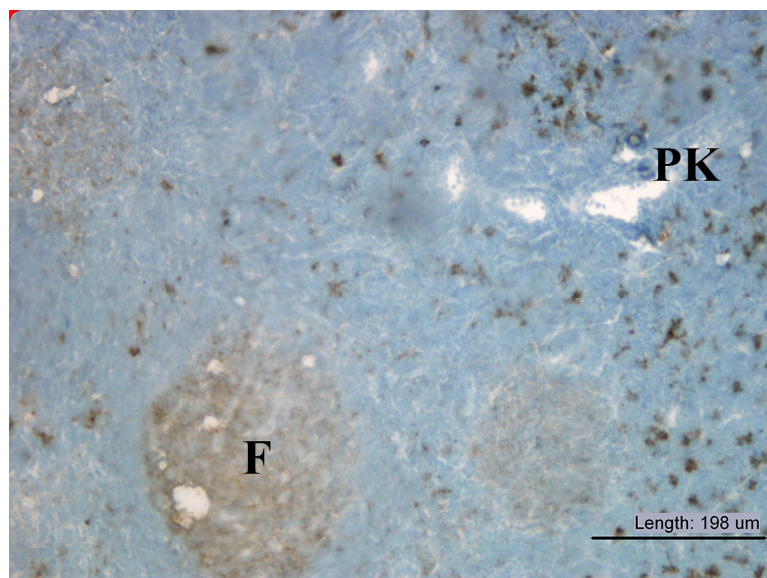
Imajući u vidu da su DC dominantno lokalizovane u PALS-u, u narednim eksperimentima smo preparate analizirali konfokalnom mikroskopijom (slika 24). Pokazano je da R-MC 17<sup>+</sup> ćelije imaju tipičnu morfologiju DC.



Slika 24. **Imunohistohemijsko bojenje slezine pacova pomoću R-MC 17 mAt.** Tkivo slezine je obeleženo R-MC 17 mAt i R-MC 17<sup>+</sup> ćelije su vizuelizovane pomoću sekundarnog kozjeg anti-mišjeg Ig konjugovanog sa Alexa Fluor 488. Dodavanjem boje SYTO 59 vizelizovana su ćelijska jedra. Uočavaju se pozitivne ćelije u zoni PALS-a koje po svojoj morfologiji odgovaraju DC. Preparat je analiziran na konfokalnom mikroskopu.

#### **Ekspresija R-MC 17 antigena u limfnom čvoru**

Rezultati analize reaktivnosti R-MC 17 mAt na kriostatskim presecima limfnog čvora su prikazani na slici 25. Ekspresija R-MC 17 antigena u limfnom čvoru detektovana je u parakorteksu (PK) i interfolikularnim zonama, na pojedinačnim ćelijama koje po morfološkim karakteristikama najviše odgovaraju DC. Slabija pozitivnost je takođe uočena u folikulima (F).



Slika 25. **Imunoperoxidazno bojenje timusa pacova R-MC 17 mAb.** Uočava se slabija pozitivnost u folikulima (F) i jača pozitivnost pojedinačnih ćelija (DC) u parakorteksu (PK) i interfolikularnim zonama. Uvećanje objektiva x 10.

### **EKSPRESIJA R-MC 17 ANTIGENA *IN VITRO***

#### **Reaktivnost R-MC 17 mAb sa nelimfoidnim ćelijama timusa pacova u kulturi**

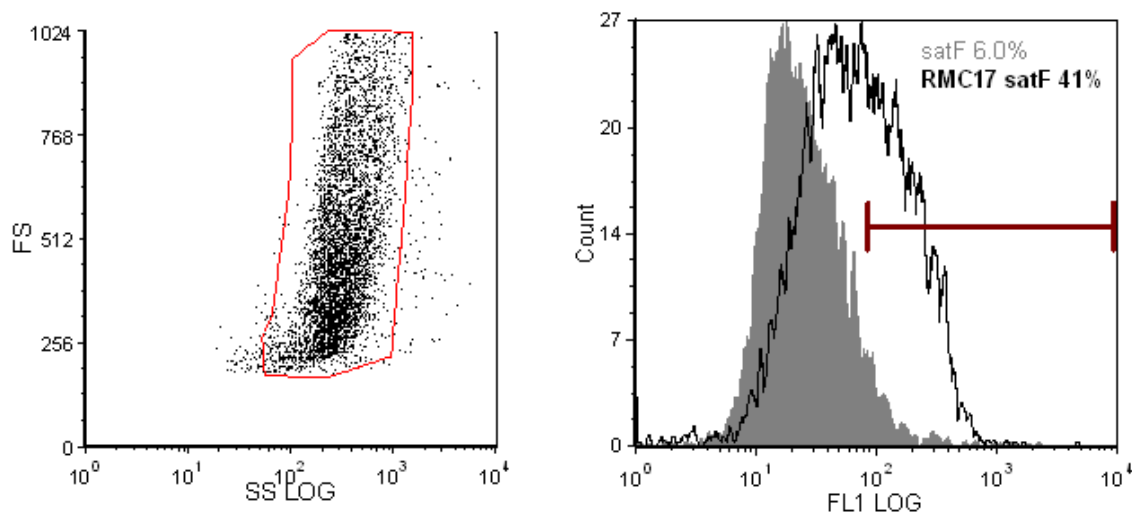
Prateći obrazac ekspresije R-MC 17 antigena u tkivu timusa i detektovanu pozitivnost ćelija koje su po svojim morfološkim i fenotipskim osobinama pripadale populaciji EC i DC timusa, naredni eksperimenti su urađeni *in vitro*, na dugotrajnim ćelijskim linijama epitelnog porekla i sveže izolovanim TDC. Najpre smo ispitali ekspresiju, a potom i uticaj na funkcionalne karakteristike navedenih populacija TSC.

#### **Ekspresija R-MC 17 antigena na R-TNC.1 liniji timusa pacova**

U prvom koraku je ispitana reaktivnost R-MC 17 mAb sa timusnom EC linijom R-TNC.1 koja je ranije produkovana na IMI VMA (Čolić i sar. 1994.).

R-TNC.1 dugotrajna EC linija je izolovana iz timusa AO pacova. Prema fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama ćelije ove linije su svrstane u podgrupu TNC.

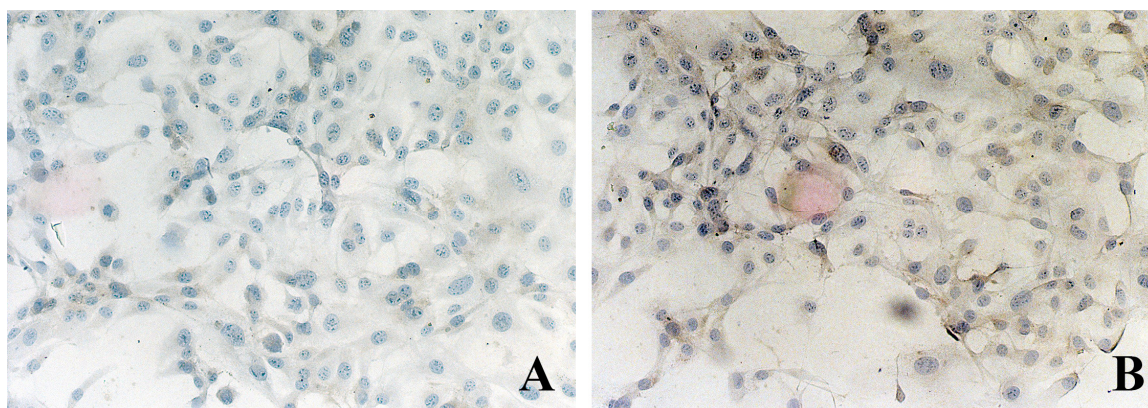
Primenom citofluorimetrijske karakterizacije je pokazano da se R-MC 17 mAt vezuje za 41 % R-TNC.1 ćelija, MFI: 143 (grafikon 1)



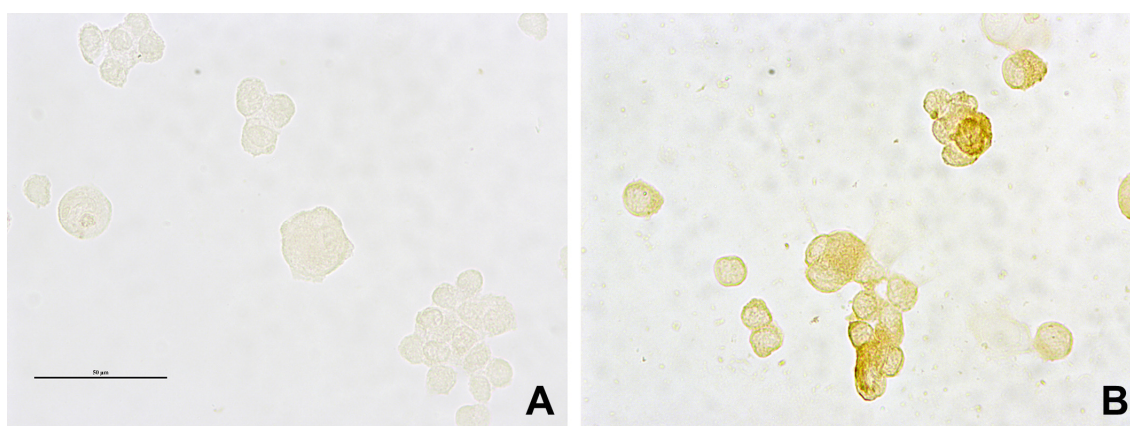
**Grafikon 1. Ekspresija R-MC 17 antigena na R-TNC.1 epitelnoj ćelijskoj liniji.** Fenotipska karakterizacija je urađena primenom protočne citofluorometrije. A) Morfološke karakteristike, veličina (FS) i granuliranost (SS) R-TNC.1 ćelija. B) Profil fluorescence R-TNC.1 ćelija obeleženih R-MC 17 mAt i sekundarnim anti-mišjim Ig FITC (beli histogram). Kontrolne ćelije (sivi histogram) su obeležene samo sekundarnim antitelom. Prikazan je rezultat jednog reprezentativnog eksperimenta.

Kada su ćelije analizirane primenom imunoperoksidazne metode bojenja uočeno je da je većina R-TNC.1 ćelija slabo pozitivna. Istovremeno, pojedine R-TNC.1 ćelije su ispoljavale veći intezitet ekspresije R-MC 17 antigena. Ekspresija R-MC 17 antigena je ispitivana na R-TNC.1 ćelijama koje su kultivisane na pločicama za kulturu ćelija (slika 26) kao i ćelijama na citospin preparatima (slika 27).





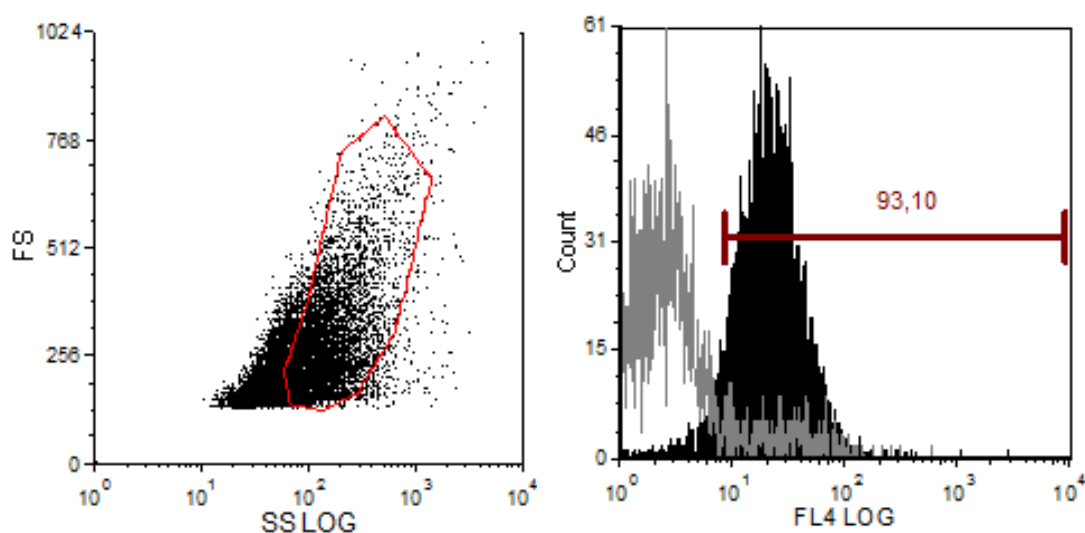
Slika 26. **Jednoslojna kultura R-TNC.1 ćelija nakon 24 h kultivacije.** Ćelije su obeležene primenom R-MC 17 mAt i vizualizovane tehnikom streptavidin-biotin imunoperoksidaznog bojenja. A) Negativna kontrola (izostavljeno R-MC 17 mAt). B) R-MC 17<sup>+</sup> ćelije. Uvećanje x 25.



Slika 27. **Citospin preparati R-TNC.1 ćelija.** Epitelne ćelije su obojene streptavidin-biotin imunoperoksidaznom tehnikom. A) Negativna kontrola (izostavljeno R-MC 17 mAt). B) R-MC 17<sup>+</sup> ćelije. Uvećanje x 60.

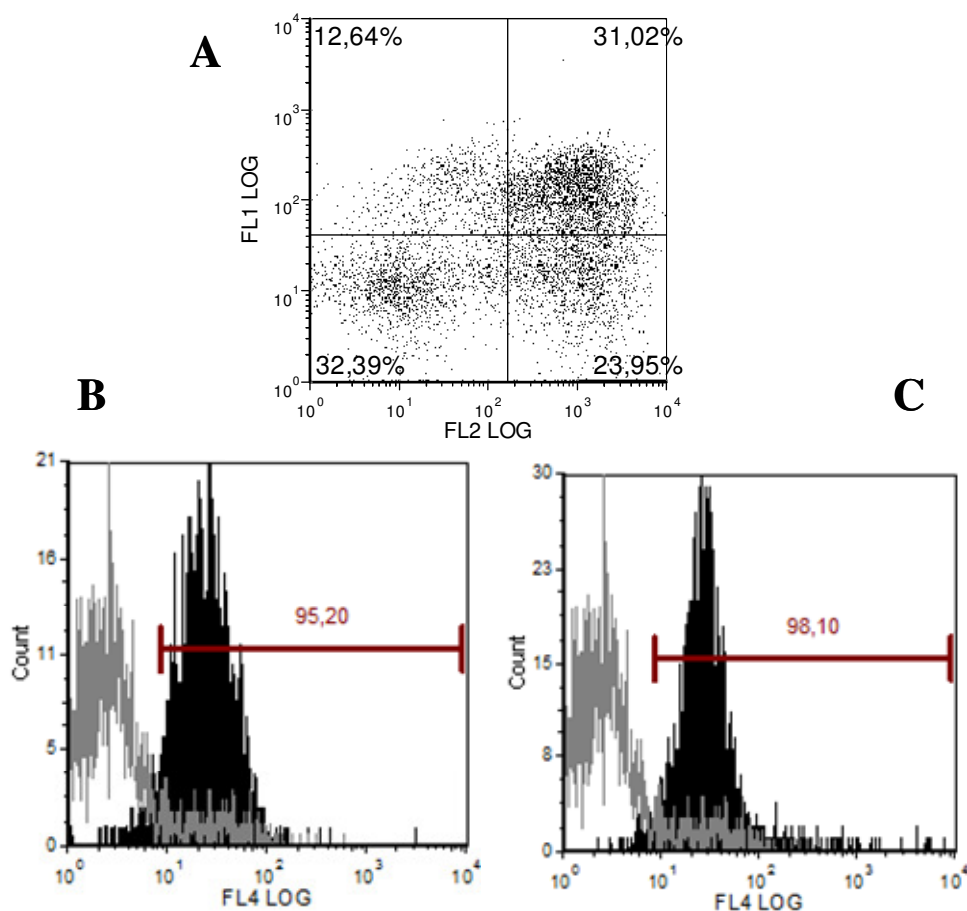
### Ekspresija R-MC 17 antigena na sveže izolovanim TDC

Kao što je ranije istaknuto, TDC su bile u posebnom fokusu naših istraživanja s obzirom na obrazac ekspresije R-MC 17 antigena u timusu *in vivo*. Zbog toga smo u narednom nizu eksperimenata ispitali ekspresiju antigena koga detektuje R-MC 17 mAt na TDC *in vitro*. U tom cilju smo najpre izolovali ukupnu populaciju TDC, primenom gustinskog gradijenta. Rezultati prikazani na grafikonu 2 su pokazali da je R-MC 17 antigen prisutan na skoro svim sveže izolovanim TDC (93,10%, MFI: 20,8).



Grafikon 2. **Ekspresija R-MC 17 antigena na sveže izolovanim TDC.** Fenotipska karakterizacija je urađena primenom protočne citofluorometrije. TDC su izolovane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. A) Morfološke karakteristike, veličina (FS) i granuliranost (SS) sveže izolovanih TDC. B) Profil fluorescence sveže izolovanih TDC obeleženih R-MC 17 mAt i sekundarnim anti-mišjim Ig PECy5 (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt direktno konjugovanim PECy5. Prikazan je rezultat jednog reprezentativnog eksperimenta.

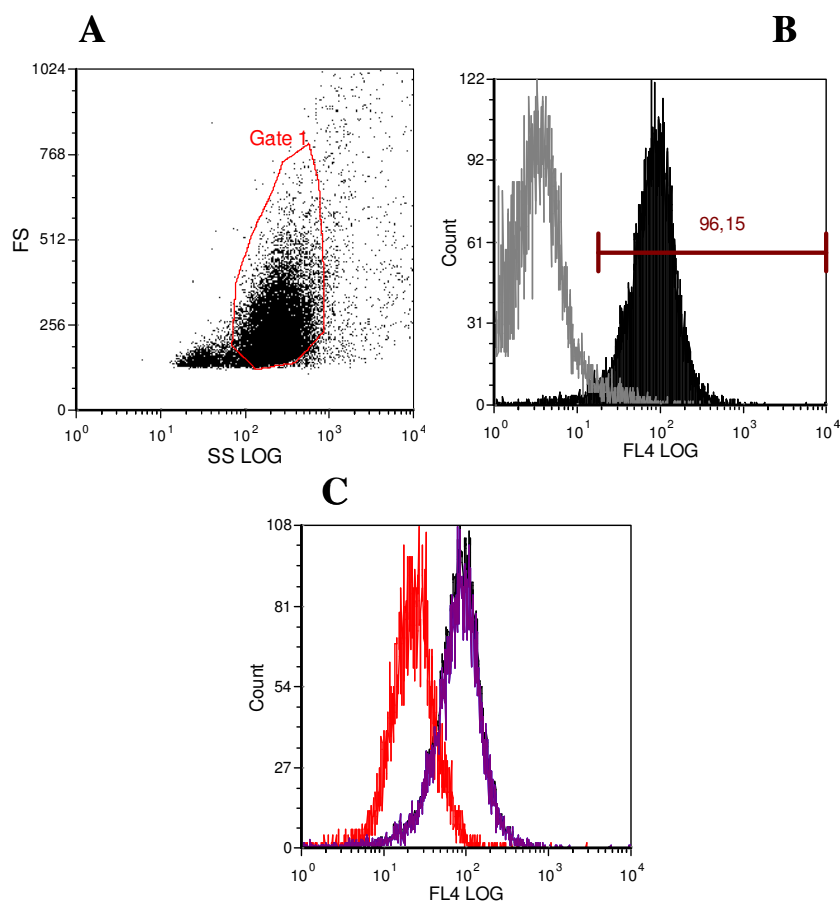
Polazeći od činjenice da TDC predstavljaju ontogenetski heterogenu populaciju ćelija (mijeloidnog i limfoidnog porekla) i da CD11b molekul predstavlja referentni marker u fenotipskom razgraničavanju različitih subpopulacija DC, u narednim eksperimentima smo analizirali ekspresiju R-MC 17 antigena na CD11b<sup>+</sup> i CD11b<sup>-</sup> subpopulacijama TDC. Subpopulacije TDC su izdvojene primenom softverske identifikacije CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> i CD11b<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> ćelija. Analiza prisustva R-MC 17 antigena na subpopulacijama MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> i MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> TDC je pokazala da 95.2% CD11b<sup>+</sup> TDC i 98.1% CD11b<sup>-</sup> TDC ispoljava ovaj antigen (grafikon 3). Drugim rečima, nije detektovana značajna razlika u ekspresiji R-MC 17 antigena među subpopulacijama sveže izolovanih TDC.



Grafikon 3. Ekspresija R-MC 17 antigena na CD11b<sup>-</sup> i CD11b<sup>+</sup> subpopulacijama TDC. Fenotipska karakterizacija je urađena primenom protočne citofluorometrije. A) Dvostruka imunofenotipska analiza sveže izolovanih TDC primenom anti-CD11b i anti-MHC II mAt. Subpopulacije TDC su izdvojene na osnovu softverske identifikacije CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> i CD11b<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> ćelija. B) Analiza ekspresije R-MC 17 antigena u subpopulaciji CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> TDC (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt. C) Analiza ekspresije R-MC 17 antigena u subpopulaciji CD11b<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> TDC (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt. Prikazan je rezultat jednog reprezentativnog eksperimenta.

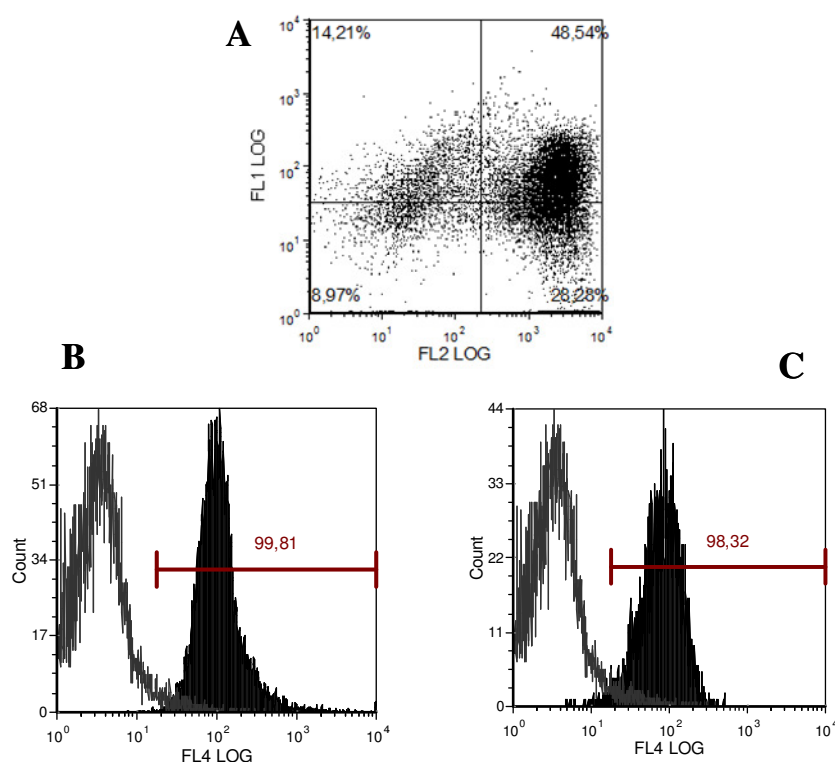
### Ekspresija R-MC 17 antigena na TDC iz kulture

U cilju ispitivanja stabilnosti ekspresije R-MC 17 antigena u kulturi, TDC su kultivisane dva dana u RPMI medijumu. Ispitivanjima ekspresije R-MC 17 antigena na TDC iz kulture je pokazano da se sazrevanjem u kulturi povećava ekspresija ovog molekula (MFI: 84 vs. MFI: 20,8). Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 4.



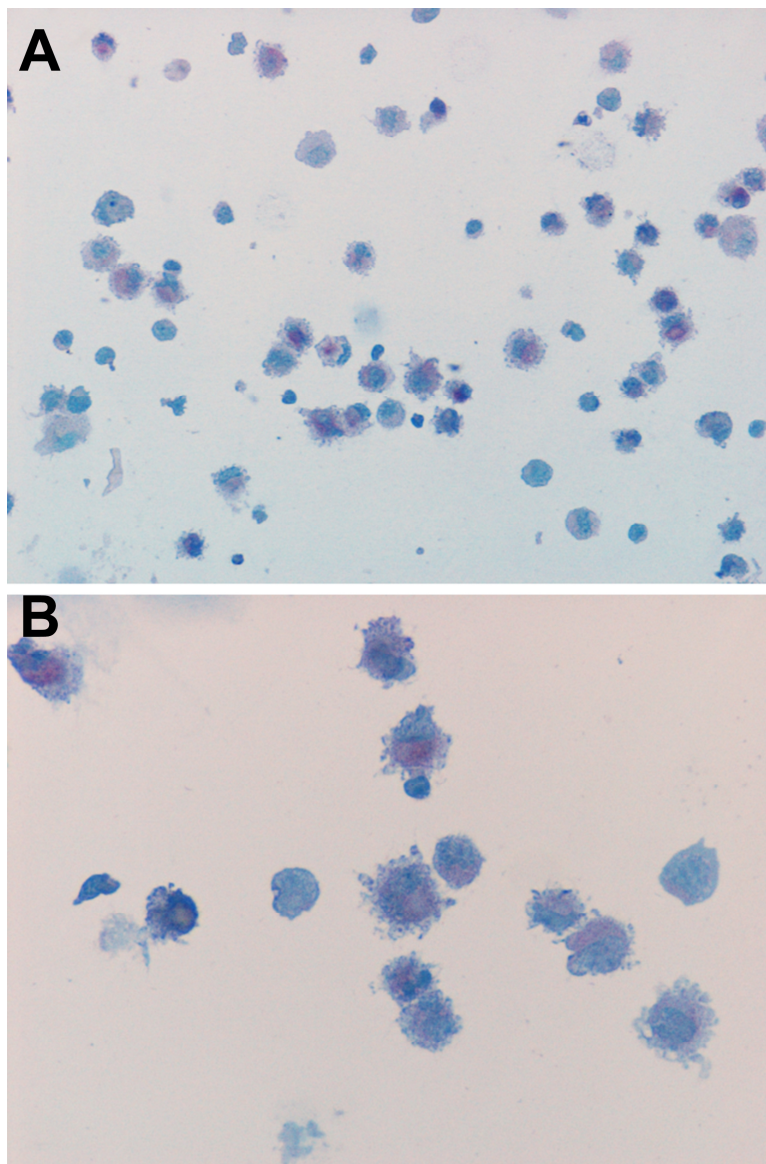
Grafikon 4. **Ekspresija R-MC 17 antigena na TDC.** TDC su kultivisane 36 h kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Fenotipska karakterizacija je urađena primenom protočne citofluorometrije. A) Morfološke karakteristike, veličina (FS) i granuliranost (SS) TDC nakon 36 h kultivacije. B) Profil fluorescence kultivisanih TDC obeleženih R-MC 17 mAt i sekundarnim anti-mišjim Ig PECy5 (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt direktno konjugovanim PECy5. C) Profil fluorescence sveže izolovanih TDC (crvena linija) i kultivisanih TDC (ljubičasta linija) obeleženih R-MC 17 mAt i sekundarnim anti-mišjim Ig PECy5. Prikazan je rezultat jednog reprezentativnog eksperimenta.

Takođe, ispitali smo i ekspresiju R-MC 17 antigena na subpopulacijama TDC u kulturi. Rezultati su pokazali da nakon 36 h kultivacije 99.8% CD11b<sup>+</sup> TDC (MFI 110) i 98.3% CD11b<sup>-</sup>TDC (MFI 102) ispoljavaju R-MC 17 antigen. Nije detektovana značajna razlika u ekspresiji R-MC 17 antigena između ove dve subpopulacije TDC tokom kultivacije (grafikon 5, slika 28).



**Grafikon 5. Ekspresija R-MC 17 antigena na CD11b<sup>-</sup> i CD11b<sup>+</sup> subpopulacijama TDC.** TDC su kultivisane 36 h kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Fenotipska karakterizacija je urađena primenom protočne citofluorometrije. A) Dvostruka imunofenotipska analiza kultivisanih TDC primenom anti-CD11b i anti-MHC II mAt. Subpopulacije TDC su izdvojene na osnovu softverske identifikacije CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> i CD11b<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> ćelija. B) Analiza ekspresije R-MC 17 antigena u subpopulaciji CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> TDC (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt. C) Analiza ekspresije R-MC 17 antigena u subpopulaciji CD11b<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> TDC (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt. Prikazan je rezultat jednog reprezentativnog eksperimenta.

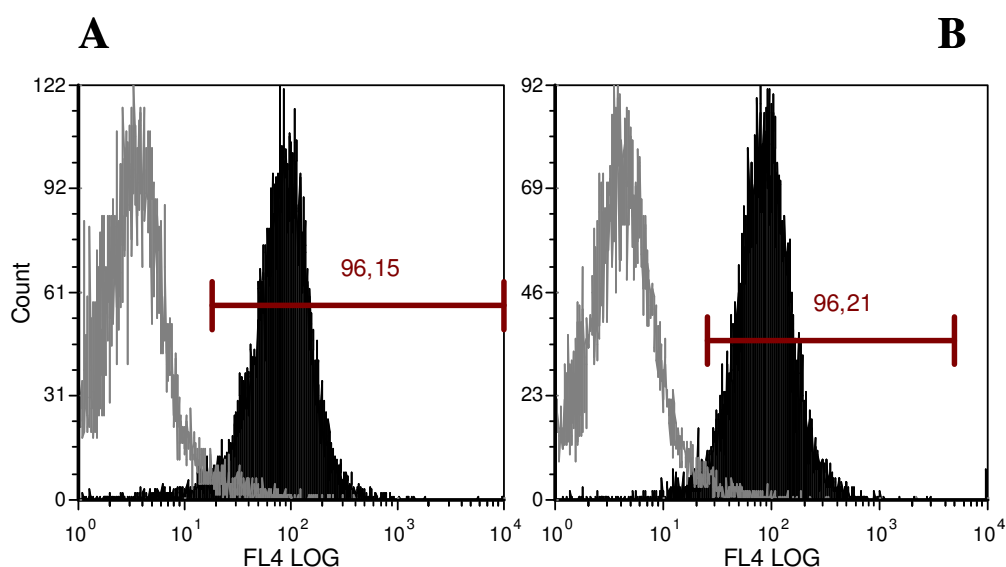
Primenom APAAP metode bojenja pokazana je snažna pozitivnost ukupnih TDC nakon 36 h kultivacije *in vitro*. Prikazani su citospin preparati R-MC 17<sup>+</sup> TDC (slika 28).



Slika 28. **Citospin preparati kultivisanih TDC.** Ukupna populacija TDC je nakon 36 h kultivacije obeležena R-MC 17 mAt primenom APAAP bojenja kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Zapažaju se ćelije sa tipičnom morfologijom DC. A) Uvećanje x 20. B) Uvećanje x 40.

### Efekat GM-CSF na ekspresiju R-MC 17 antigena na TDC *in vitro*

Polazeći od saznanja da GM-CSF ispoljava modulatoreni efekat na TDC u kulturi, uključujući i uticaj na njihovo preživljavanje, u sledećem nizu eksperimenata smo želeli da odredimo uticaj ovog faktora rasta na ekspresiju R-MC 17 antigena na TDC *in vitro*. Sveže izolovane TDC su kultivisane u prisustvu GM-CSF (5 ng/ml) u dvodnevnoj kulturi nakon čega je određen procenat R-MC 17 pozitivnih TDC. Pokazano je da GM-CSF ne utiče ni na procenat R-MC 17<sup>+</sup> ćelija ni na intezitet ekspresije (MFI 84 vs. MFI 89) u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 6.



Grafikon 6. **Efekat GM-CSF na ekspresiju R-MC 17 antigena na TDC.** TDC su kultivisane 36 h u odsustvu i prisustvu GM-CSF kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Fenotipska karakterizacija je urađena primenom protočne citofluorometrije. A) Profil fluorescence TDC, kultivisanih u odsustvu GM-CSF, obeleženih R-MC 17 mAt i sekundarnim anti-mišjim Ig PECy5 (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt direktno konjugovanim sa PECy5. B) Profil fluorescence TDC, kultivisanih u prisustvu GM-CSF (5ng/ml), obeleženih R-MC 17 mAt i sekundarnim anti-mišjim Ig PECy5 (crni histogram). Kontrolne ćelije (siva linija) su obeležene IrAt direktno konjugovanim sa PECy5. Prikazan je rezultat jednog reprezentativnog eksperimenta.

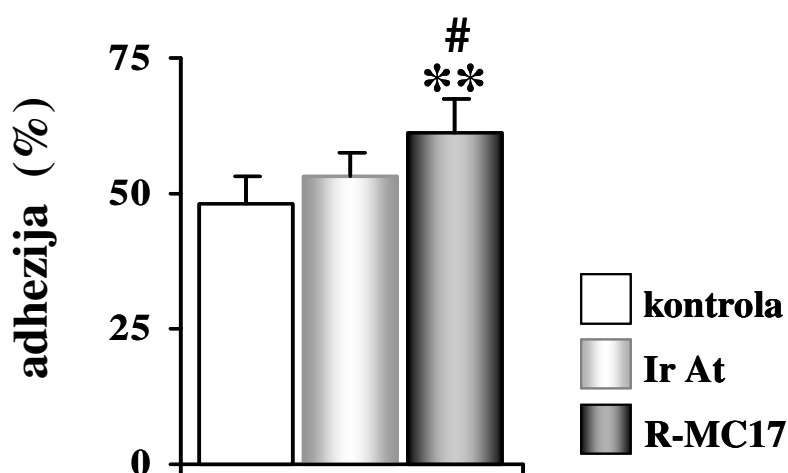


## **FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA R-MC 17 MONOKLONSKOG ANTITELA NA *IN VITRO* MODELIMA**

### **Efekat R-MC 17 mAt na adhezivne karakteristke R-TNC.1 ćelijske linije *in vitro***

Adhezivne karakteristike EC linije su ispitivane u esejima u kojima su na konfluentne slojeve R-TNC.1 ćelija dodavani timociti AO pacova. Nakon inkubacije na 37 °C tokom 30 min neadherentne ćelije su odstranjene. Adhezija je izražavana kao procenat adherentnih timocita (broj vezanih timocita/ukupan broj timocita x 100). Epitelne ćelije su preinkubirane sa R-MC 17 mAt na 4 °C 30 min. Kao IrAt je korišćeno cBH11. Monoklonska antitela su bila prisutna tokom 30 min adhezije timocita za EC. Ispitivani su mehanizmi adhezije u ranom terminu (30 min) kada je detektovana maksimalna adhezija timocita za ovu epitelnu liniju.

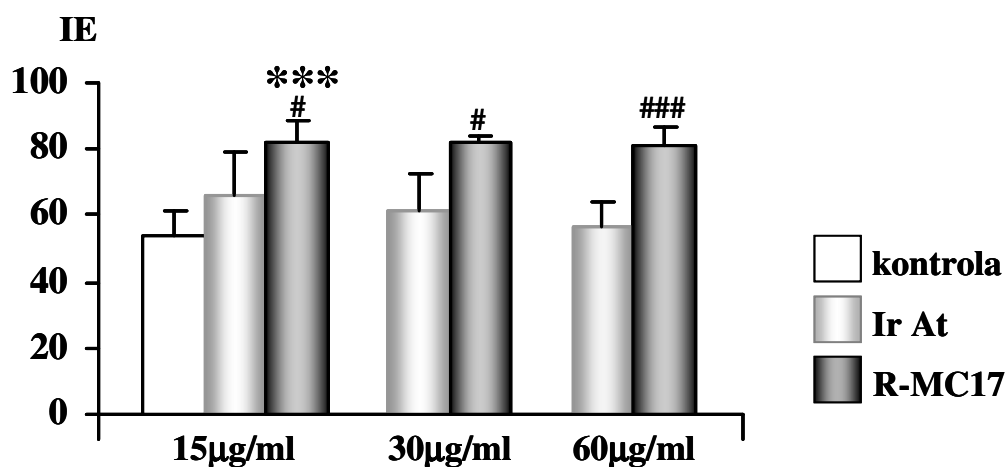
Na grafikonu 7 je prikazan efekat R-MC 17 mAt na ranu fazu vezivanja mirujućih timocita za R-TNC.1 ćelijsku liniju. Pokazalo se da dodatak ovog mAt dovodi do statistički značajne stimulacije adhezije u poređenju sa kontrolnim mAt.



Grafikon 7. Efekat R-MC 17 mAt na vezivanje timocita za R-TNC.1 ćelijsku liniju u ranoj fazi adhezije. Vezivanje timocita je određivano posle 30 min inkubacije timocita i EC na 37 °C, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Rezultati ( $X \pm SD$  iz tri različita eksperimenta) su prikazani kao procenat adhezije.  $**p < 0.01$  u poređenju sa kontrolom (adhezija bez mAt);  $\#p < 0.05$  u poređenju sa IrAt.

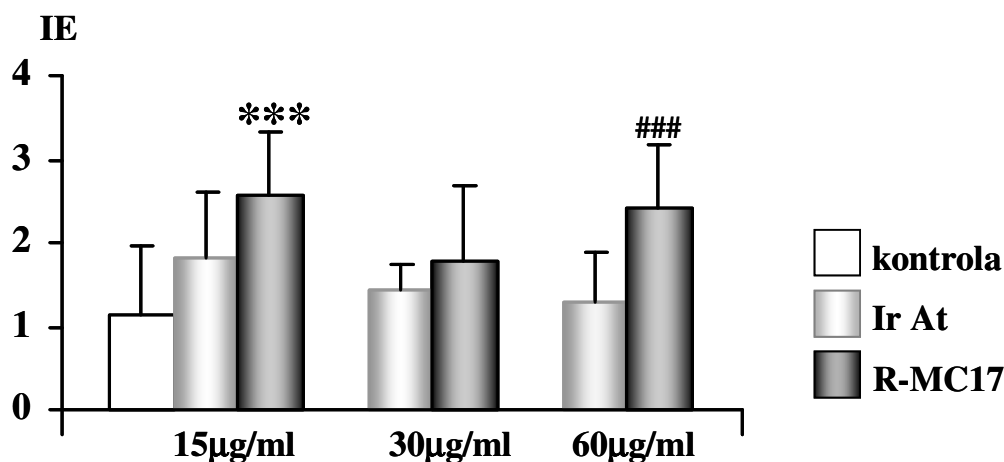
#### Efekat R-MC 17 mAt na emperipoeznu aktivnost R-TNC.1 ćelijske linije *in vitro*

R-TNC.1 linija ispoljava funkcionalnu sposobnost emperipoeze timocita, svojstvo karakteristično za TNC. U narednom nizu eksperimenata smo želeli da ispitamo da li je R-MC 17 antigen uključen u ovu aktivnost EC. Emperipoezna aktivnost je određivana esejima u kojima je merena sposobnost R-TNC.1 linije da internalizuje timocite sa kojima je kultivisana. Timociti su inkubirani sa EC na 37 °C tokom 8 h. Broj internalizovanih timocita je meren posle uklanjanja neadherentnih i adherentnih timocita. Emperipoeza je izražavana kao broj internalizovanih timocita na 100 R-TNC.1 ćelija (IE=indeks emperipoeze). Prisustvo R-MC 17 mAt sttistički značajno stimuliše emperipoezu u poređenju sa kontrolnim IrAt u svim testiranim koncentracijama R-MC 17 mAt (grafikon 8).



Grafikon 8. **Efekat R-MC 17 mAt na emperipoeznu aktivnost R-TNC.1 ćelijske linije.** Emperipoeza timocita je određivana posle 8 h inkubacije timocita i R-TNC.1 EC na 37 °C, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. ( $X \pm SD$  iz tri različita eksperimenta) su prikazani kao indeks emperipoeze (IE). \*\*\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom (adhezija bez mAt); # $p < 0.05$ , ### $p < 0.005$  u poređenju sa IrAt.

Imajući na umu poseban značaj interakcije TNC sa ostalim stromalnim ćelijama timusa, posebno TDC, u procesima intratimusne selekcije T limfocita, dodatno smo analizirali emperipoezu TDC-like ćelija u prisustvu R-MC 17 mAt. Rezultati prikazani na grafikonu 9 su pokazali da R-MC 17 mAt u najvećoj testiranoj koncentraciji (60 µg/ml) statistički značajno stimuliše internalizaciju TDC-like ćelija od strane R-TNC.1 linije u poređenju sa Ir mAt. Dobijeni rezultati su ukazali da R-MC 17 molekul učestvuje i u adheziji selektivnih populacija timocita i TDC za ovu TNC liniju i u njihovoj sledstvenoj emperipoezi.

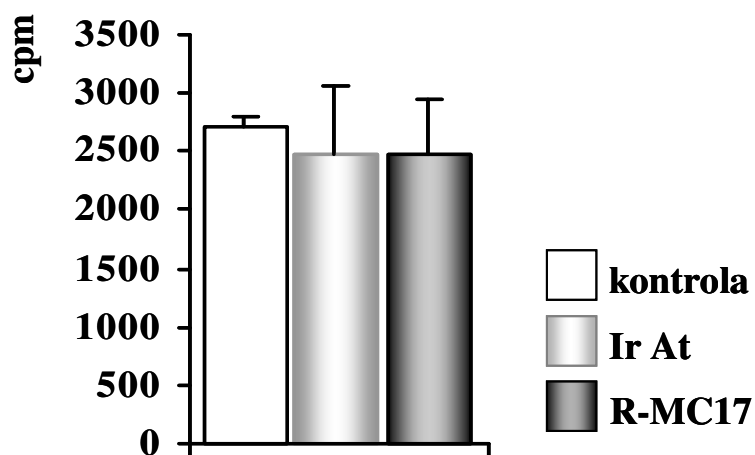


Grafikon 9. Efekat R-MC 17 mAt na emperipoeznu aktivnost R-TNC.1 ćelijske linije. Emperipoeza timocita je određivana posle 8 h inkubacije timocita i R-TNC.1 ćelija na 37 °C, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. ( $X \pm SD$  iz tri različita eksperimenta) su prikazani kao indeks emperipoeze (IE). \*\*\* $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (adhezija bez mAt); ### $p < 0.005$  u poređenju sa IrAt.

#### Uticaj R-MC 17 mAt na proliferaciju timocita u kokulturi sa TDC *in vitro*

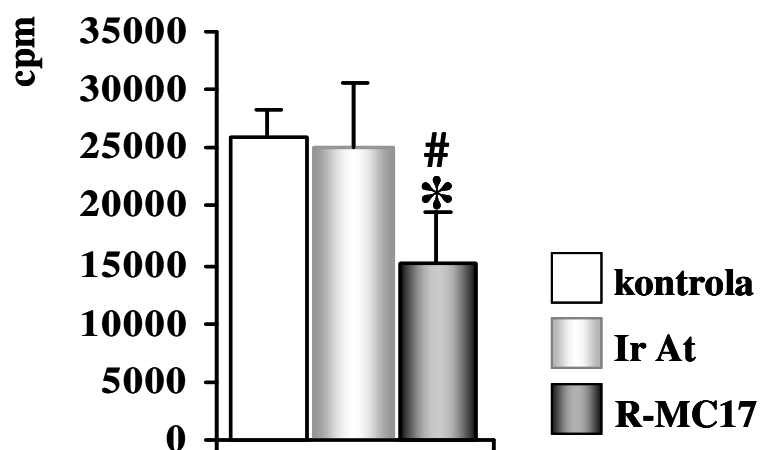
Kao što je ranije istaknuto, TDC imaju ključnu ulogu u procesu negativne selekcije autoreaktivnih timocita u čijoj osnovi se nalazi indukcija apoptoze. Međutim, interakcija TDC i antigen-specifičnih timocita može dovesti i do proliferacije selekcionisanih timocita (Landry i sar., 1990.). Polazeći od saznanja da se akcesorni kapacitet TDC može procenjivati i na osnovu uticaja TDC na proliferaciju timocita, u narednim eksperimentima smo ispitivali uticaj R-MC 17 antigena na sposobnost TDC da stimuliše proliferaciju timocita. TDC su izolovane metodom kolagenazne digestije i dodatno prečišćene od kontaminirajućih timocita i makrofaga primenom imunomagnetnog sortiranja ćelija.

Najpre je ispitan uticaj R-MC 17 mAt (40  $\mu\text{g/ml}$ ) na potencijal sveže izolovanih TDC da stimulišu proliferaciju singenih timocita *in vitro*. U pojedinim eksperimentima je indukovana dodatna stimulacija timocita delovanjem solubilnog mAt, specifičnog za TCR (R7.3). Dobijeni rezultati su pokazali da R-MC 17 mAt nije značajno uticalo na akcesorni potencijal TDC u nestimulisanim kulturama u poređenju sa IrAt (grafikon 10).



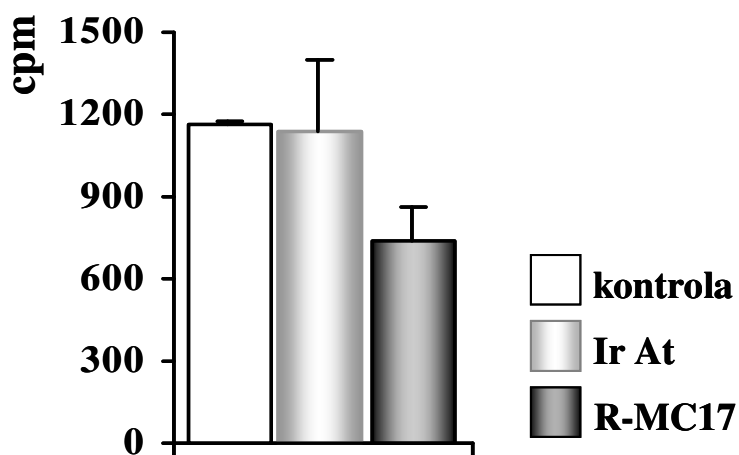
**Grafikon 10. Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju singenih timocita indukovanu delovanjem sveže izolovanih TDC.** TDC su izolovane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. TDC ( $3 \times 10^4$ ) su kultivisane sa singenim timocitima ( $1 \times 10^6$ ) u trodnevnoj kulturi u prisustvu R-MC 17 mAt, Ir At ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije). Proliferativni odgovor timocita, određivan ugradnjom  $^3\text{H}$  timidina, je izražen brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

Očekivano, proliferacija timocita je bila značajno veća u R7.3-stimulisanim kulturama. Uočena je statistički značajna inhibicija proliferacije u prisustvu R-MC 17 mAt u poređenju sa IrAt i kontrolnim ćelijama (bez dodatka mAt) (grafikon 11).



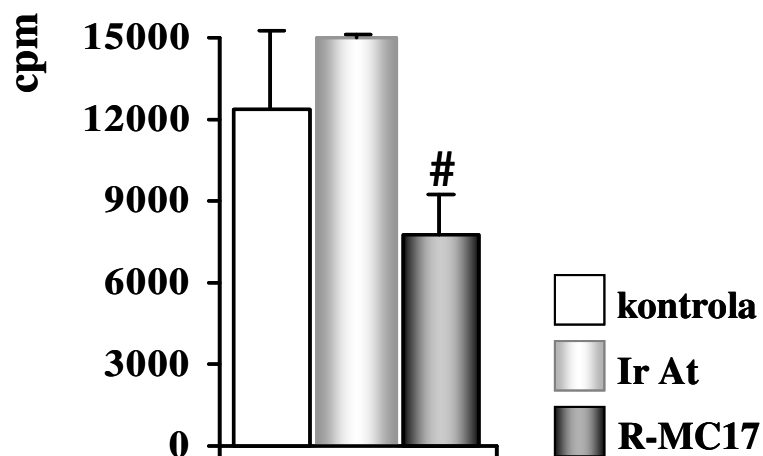
Grafikon 11. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju R7.3-stimuliranih singenih timocita indukovanu delovanjem sveže izolovanih TDC.** TDC su izolovane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. TDC ( $1,5 \times 10^4$ ) su kultivisane sa singenim timocitima ( $1 \times 10^6$ ) u trodnevnoj kulturi u prisustvu R-MC 17 mAt, sa dodatkom solubilnog R7.3 mAt ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Kontrolne ćelije su kultivisane u odsustvu R-MC 17 mAt ili u prisustvu Ir At. Proliferativni odgovor timocita, određivan ugradnjom  $^3\text{H}$  timidina, je izražen brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. \* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom (bez mAt); # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt.

Uticao mAt R-MC 17 na potencijal kultiviranih TDC da stimulišu proliferaciju timocita ispitan je u testovima proliferacije singenih timocita i alogeničkih  $\text{CD4}^+$  T limfocita (izolovanih iz limfnog čvora DA pacova). Rezultati prikazani na grafikonu 12 ukazuju da prisustvo R-MC 17 mAt ne utiče na proliferaciju singenih timocita indukovanu delovanjem kultiviranih TDC.



Grafikon 12. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju singenih timocita indukovanu delovanjem kultivisanih TDC.** TDC su kultivisane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivisane sa singenim timocitima ( $1 \times 10^6$ ) u trodnevnoj kulturi u prisustvu R-MC 17 mAt, Ir At ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije). Proliferativni odgovor timocita, određivan ugradnjom  $^3\text{H}$  timidina, je izražen brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

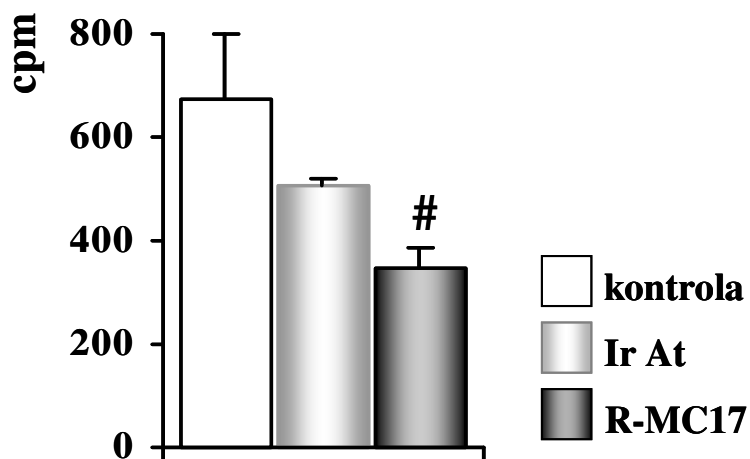
Proliferacija timocita je bila značajno veća u prisustvu R7.3 mAt. U uslovima ove dodatne stimulacije timocita, R-MC 17 mAt je statistički značajno inhibiralo proliferaciju timocita indukovanu delovanjem kultivisanih TDC u poređenju sa IrAt (grafikon 13).



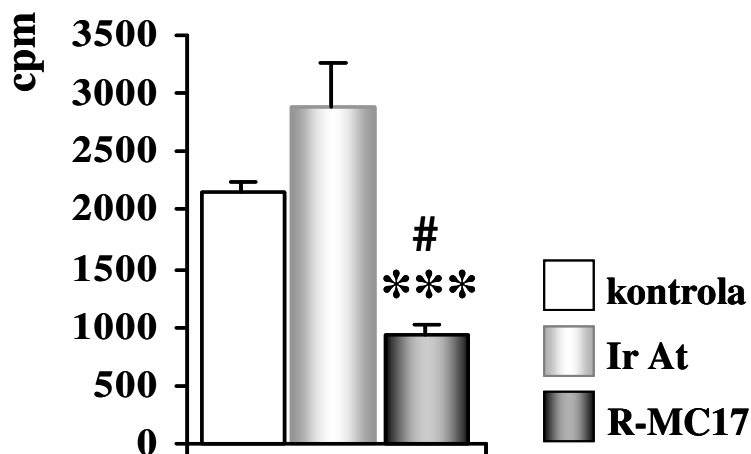
Grafikon 13. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju R7.3-stimuliranih singenih timocita indukovanu delovanjem kultiviranih TDC.** TDC su kultivirane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivirane sa singenim timocitima ( $1 \times 10^6$ ) u trodnevnoj kulturi u prisustvu R-MC 17 mAt, sa dodatkom solubilnog R7.3 mAt ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Kontrolne ćelije su kultivirane u odsustvu R-MC 17 mAt ili u prisustvu Ir At. Proliferativni odgovor timocita, određivan ugradnjom  $^3\text{H}$  timidina, je izražen brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt.

Inhibitorni uticaj R-MC 17 mAt na TDC-indukovanu proliferaciju potvrđen je i u testovima proliferacije alogeničkih  $\text{CD4}^+$  T limfocita limfnih čvorova, kako u nestimuliranim kulturama (grafikon 14), tako i u kulturama u kojima su T limfociti dodatno stimulirani delovanjem R7.3 mAt (grafikon 15).





Grafikon 14. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju alogenih CD4<sup>+</sup> T timocita indukovanu delovanjem kultivisanih TDC.** TDC su kultivisane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivisane sa alogenim CD4<sup>+</sup> T limfocitima ( $2 \times 10^5$ ) izolovanim iz limfnih čvorova, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon petodnevne kultivacije u prisustvu R-MC 17 mAt, Ir At ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije) određivan je proliferativni odgovor T limfocita, merenjem ugradnje <sup>3</sup>H timidina. Proliferacija je izražena brojem otkućaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt.

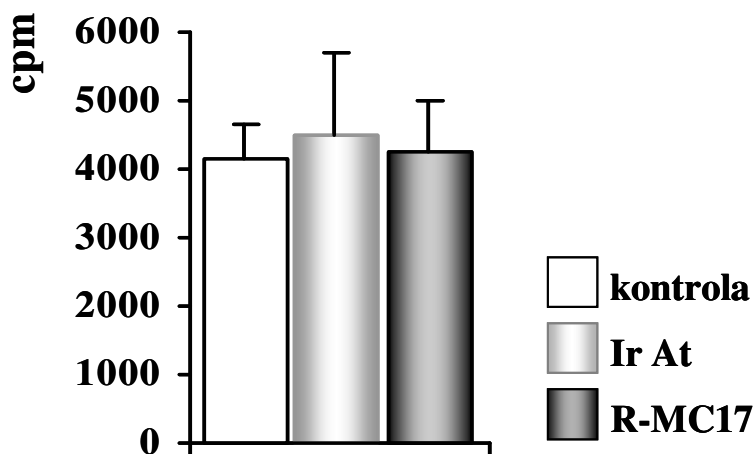


Grafikon 15. Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju R7.3-stimuliranih alogenih CD4<sup>+</sup> T limfocita indukovanu delovanjem kultiviranih TDC. TDC su kultivirane kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC (2x10<sup>4</sup>) su kultivirane sa alogenim CD4<sup>+</sup> T limfocitima (2x10<sup>5</sup>) izolovanim iz limfnih čvorova sa dodatkom solubilnog R7.3 mAt (1 μg/ml), kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon petodnevne kultivacije u prisustvu R-MC 17 mAt, Ir At ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije) određivan je proliferativni odgovor T limfocita, merenjem ugradnje <sup>3</sup>H timidina. Proliferacija je izražena brojem otkucanja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. \*\*\*p<0.005 u poređenju sa kontrolom (bez mAt); #p<0.05 u poređenju sa IrAt.

### Uticaj R-MC 17 mAt na proliferaciju timocita u kokulturi sa GM-CSF-tretiranim TDC *in vitro*

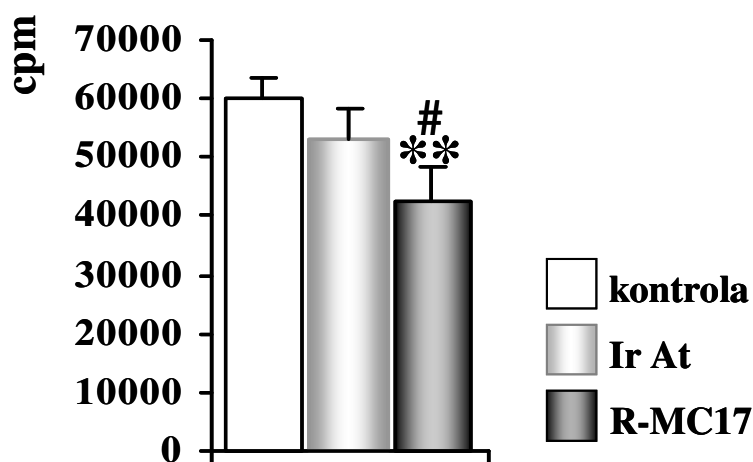
Paralelno je ispitivan uticaj R-MC 17 mAt na akcesorni potencijal TDC koje su prethodno tretirane GM-CSF (5 ng/ml) tokom 48 h.

Modulatorni efekat GM-CSF je takođe analiziran u testu proliferacije singenih timocita i alogenih T limfocita limfnog čvora. Dobijeni rezultati su pokazali da R-MC 17 mAt ne utiče na stimulatorni kapacitet TDC prethodno kultivisanih u prisustvu GM-CSF u testu proliferacije singenih timocita (grafikon 16).



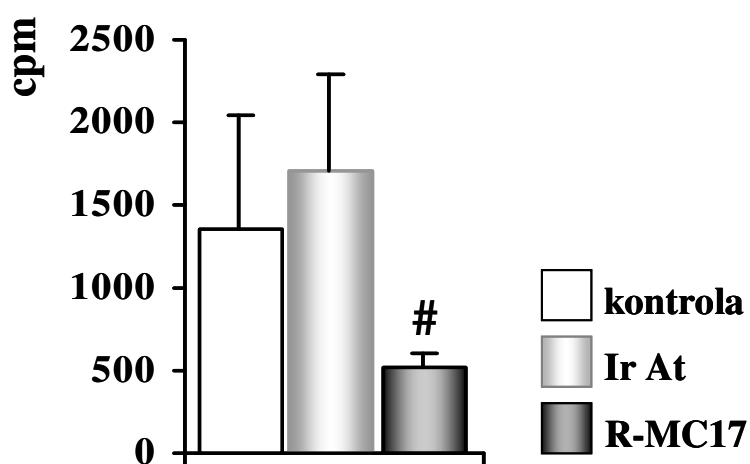
Grafikon 16. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju singenih timocita indukovanu delovanjem GM-CSF-tretiranih TDC.** GM-CSF-tretirane TDC su pripremljene kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivisane sa singenim timocitima ( $1 \times 10^6$ ) u trodnevnoj kulturi u prisustvu R-MC 17 mAt, Ir At ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije). Proliferativni odgovor timocita, određivan ugradnjom  $^3\text{H}$  timidina, je izražen brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

Međutim, u uslovima dodatne stimulacije timocita delovanjem R7.3 mAt, R-MC 17 mAt je značajno inhibiralo stimulatorni kapacitet GM-CSF-tretiranih TDC na proliferaciju singenih timocita (grafikon 17).

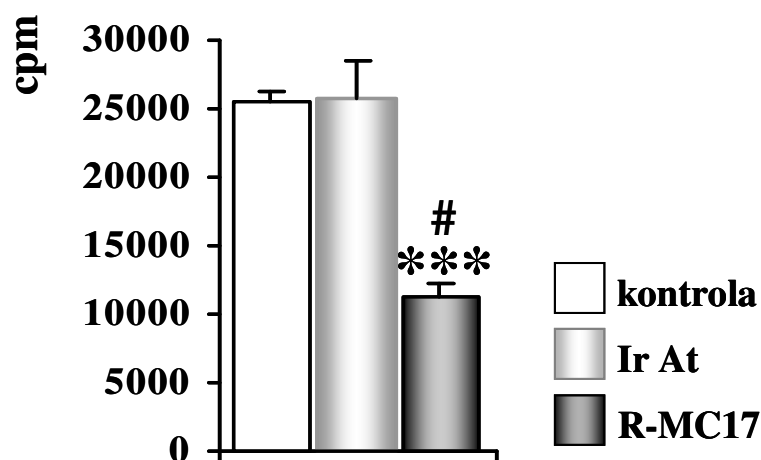


Grafikon 17. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju R7.3-stimuliranih singenih timocita indukovanu delovanjem GM-CSF-tretiranih TDC.** GM-CSF-tretirane TDC su pripremljene kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivisane sa singenim timocitima ( $1 \times 10^6$ ) u trodnevnoj kulturi u prisustvu R-MC 17 mAt, sa dodatkom solubilnog R7.3 mAt ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Kontrolne ćelije su kultivisane u odsustvu R-MC 17 mAt ili u prisustvu Ir At. Proliferativni odgovor timocita, određivan ugradnjom  $^3\text{H}$  timidina, je izražen brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt. \*\* $p < 0.01$  u poređenju sa kontrolom (bez mAt).

Kada je analizirana proliferacija alogених CD4<sup>+</sup> T limfocita u kulturama sa TDC koje su prethodno tretirane GM-CSF dobijeni su rezultati komparabilni prethodnim (sa kultivisanim TDC). Naime, R-MC 17 mAt je ispoljilo statistički značajan inhibitory uticaj na TDC-indukovanu proliferaciju i nestimuliranih (grafikon 18) i R7.3-stimuliranih (grafikon 19) T limfocita u poređenju sa IrAt.



Grafikon 18. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju alogених CD4<sup>+</sup> T timocita indukovanu delovanjem GM-CSF-tretiranih TDC.** GM-CSF-tretirane TDC su pripremljene kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivisane sa alogеним CD4<sup>+</sup> T limfocitima ( $2 \times 10^5$ ) izolovanim iz limfnih čvorova, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon petodnevne kultivacije u prisustvu R-MC 17 mAt, Ir At ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije) određivan je proliferativni odgovor T limfocita, merenjem ugradnje <sup>3</sup>H timidina. Proliferacija je izražena brojem otkucaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. #p<0.05 u poređenju sa IrAt.



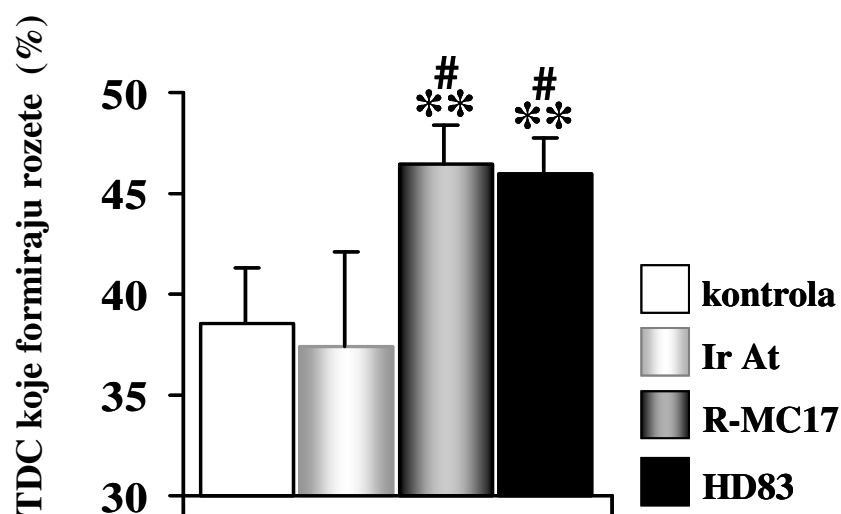
Grafikon 19. **Efekat R-MC 17 mAt na proliferaciju R7.3-stimuliranih alogenih CD4<sup>+</sup> T timocita indukovanu delovanjem GM-CSF-tretiranih TDC.** GM-CSF-tretirane TDC su pripremljene kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 48 h kultivacije prečišćene TDC ( $2 \times 10^4$ ) su kultivisane sa alogenim CD4<sup>+</sup> T limfocitima ( $2 \times 10^5$ ) izolovanim iz limfnih čvorova sa dodatkom solubilnog R7.3 mAt (1  $\mu\text{g/ml}$ ), kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon petodnevne kultivacije u prisustvu R-MC 17 mAt, IrAt ili u odsustvu mAt (kontrolne ćelije) određivan je proliferativni odgovor T limfocita, merenjem ugradnje <sup>3</sup>H timidina. Proliferacija je izražena brojem otkućaja u minuti (cpm). Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. \*\*\* $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (bez mAt); # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt.

#### **Uticao R-MC 17 mAt i HD83 mAt na adheziju i apoptozu timocita u kokulturi sa TDC**

U uvodnom delu rezultata istaknuto je zapažanje da bi R-MC 17 antigen prema nalazima biohemijske i imunohistohemijske karakterizacije mogao biti homolog DEC-205 antigena. Zbog toga smo u finalnoj fazi istraživanja uradili niz eksperimenata u cilju poređenja funkcionalne aktivnosti R-MC 17 mAt i anti-DEC205 mAt (HD83) u timusu, sa posebnim osvrtom na ulogu R-MC 17 antigena i DEC-205 antigena u

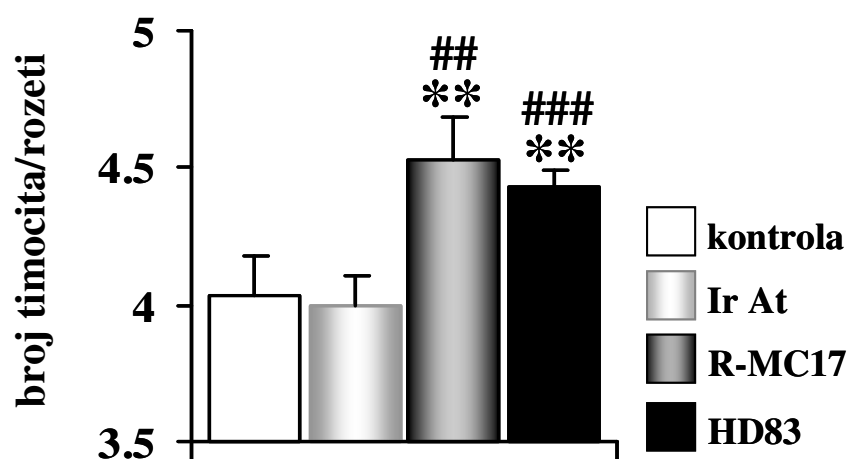
interakciji TDC sa timocitima. Važno je napomenuti da značaj DEC-205 antigena u timusu pacova do sada nije ispitivan.

Najpre je ispitan uticaj R-MC 17 mAt i anti-DEC-205 mAt (HD83) na formiranje rozeta između timocita i TDC nakon 30 min kultivacije *in vitro*. Pokazano je da oba mAt statistički značajno stimulišu formiranje rozeta kako u poređenju sa kontrolom (sami timociti i TDC) tako i u poređenju sa IrAt. Zapaža se da je u prisustvu oba antitela povećan procenat TDC koje formiraju rozete (grafikon 20).



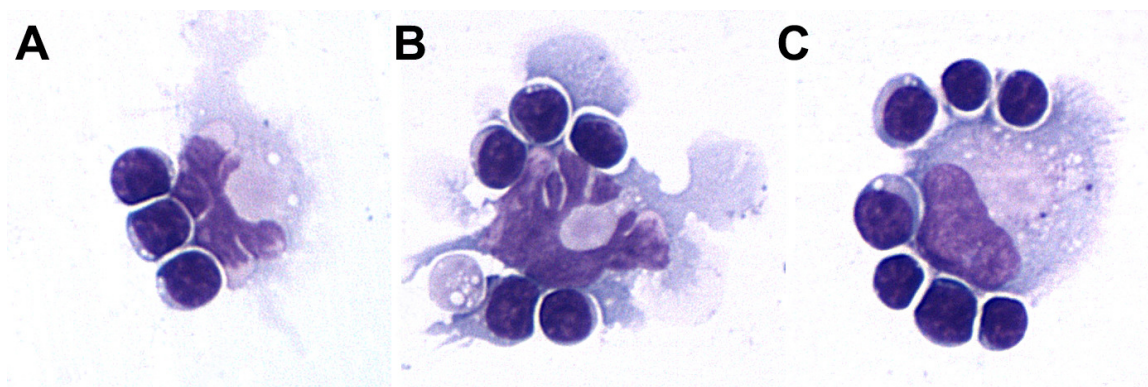
Grafikon 20. **Efekat mAt R-MC 17 i mAt HD83 na formiranje TDC/timocitnih rozeta.** U TDC ( $5 \times 10^4$ ) koje su preinkubirane sa mAt R-MC 17, mAt HD83, IrAt ili medijumom (bez antitela) dodati su sveže izolovani timociti ( $2.5 \times 10^5$ ) i ćelije su kultivisane u kulturi „viseće kapi“ kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 30 min inkubacije napravljeni su citospin preparati koji su obojeni MGG metodom i analizirani pod svetlosnim mikroskopom. Brojane su TDC koje su vezale 3 ili više timocita. Prikazana je  $X \pm SD$  procenta TDC koje formiraju rozete iz 3 različita ekperimenta. \*\* $p < 0.01$  u poređenju sa kontrolom (bez mAt); # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt.

Istovremeno je ispitivan i efekat R-MC 17 mAt i HD83 mAt na prosečan broj timocita/rozeti u istim eksperimentalnim uslovima (nakon 30 min interakcije timocita i TDC *in vitro*). Ovi rezultati su prikazani na grafikonu 21. Pokazano je da oba mAt statistički značajno povećavaju i broj timocita/rozeti i u poređenju sa kontrolom (sami timociti i TDC) i u poređenju sa IrAt.



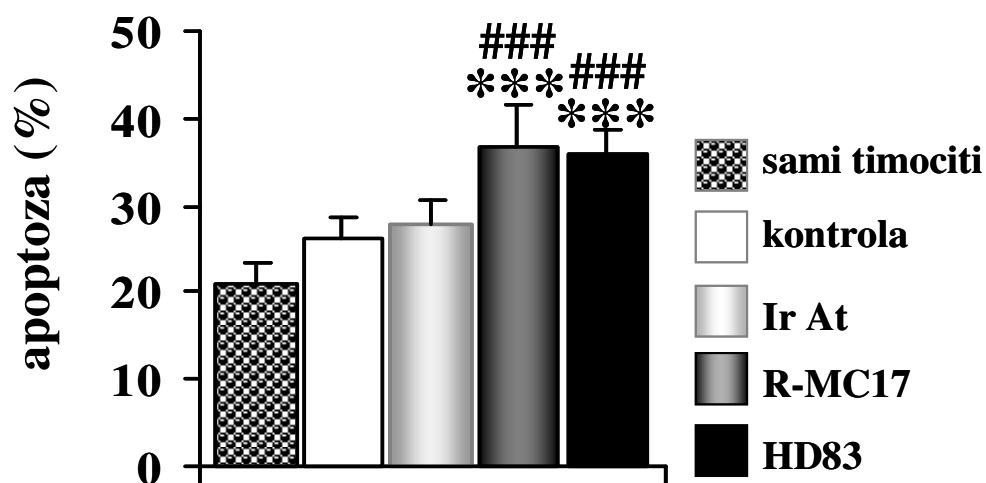
Grafikon 21. **Efekat mAt R-MC 17 i mAt HD83 na broj timocita u TDC/timocitnim rozetama.** U TDC ( $5 \times 10^4$ ) koje su preinkubirane sa mAt R-MC 17, mAt HD83, IrAt ili medijumom (bez antitela) dodati su sveže izolovani timociti ( $2.5 \times 10^5$ ) i ćelije su kultivisane u kulturi „viseće kapi“ kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 30 min inkubacije napravljeni su citospin preparati koji su obojeni MGG metodom i analizirani pod svetlosnim mikroskopom. Analiziran je broj timocita u pojedinačnim rozetama. Prikazana je  $X \pm SD$  broja timocita/rozeti iz 3 različita ekperimenta. \*\* $p < 0.01$  u poređenju sa kontrolom (bez mAt); ## $p < 0.01$  u poređenju sa IrAt; ) ; ### $p < 0.005$  u poređenju sa IrAt.



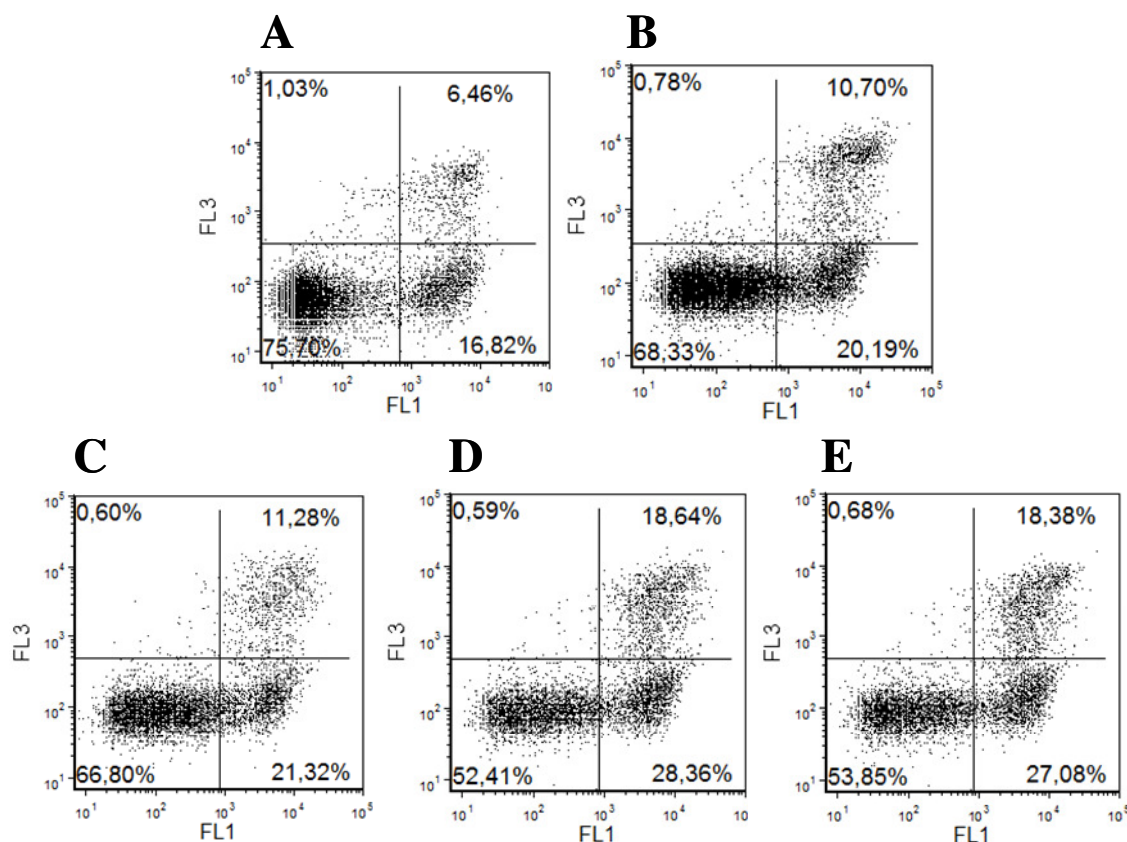


Slika 29. Mikroskopska analiza TDC/timocitnih rozeta nakon 30 min inkubacije timocita i TDC u prisustvu mAt A) IrAt; B) R-MC 17; C) HD83. Preparati su obojeni MGG bojenjem. Uvećanje x40.

Poznato je da timociti u kulturi rapidno podležu procesu apoptoze. Ovaj proces je bio dodatno ubrzan u kokulturi timocita sa TDC. Dodatak R-MC 17 mAt i HD83 mAt u kokulturu timocita i TDC je statistički značajno stimulisao apoptozu kako u poređenju sa kontrolom (sami timociti i TDC) tako i u poređenju sa IrAt. Apoptotične ćelije su analizirane nakon 6 h *in vitro* kultivacije primenom morfoloških kriterijuma (grafikon 22) i aneksinV-FITC/PI metode obeležavanja (grafikon 23).



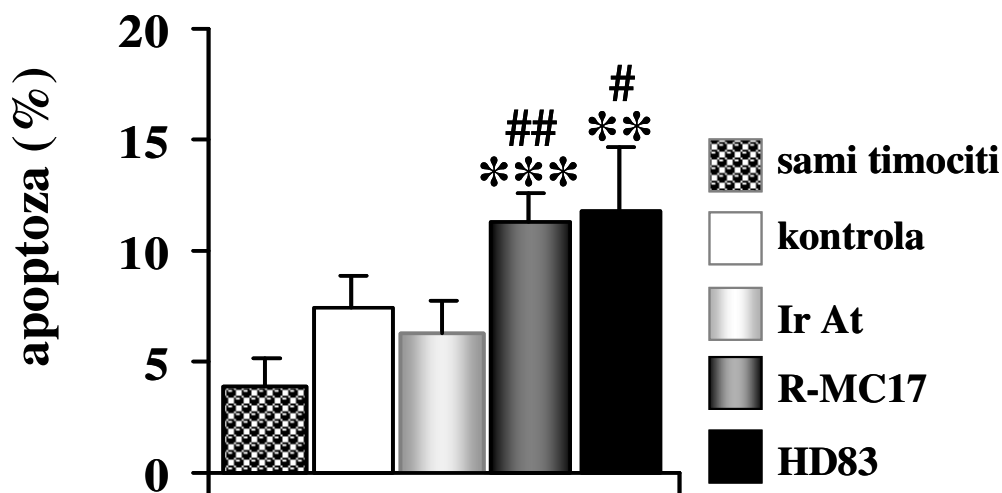
Grafikon 22. Efekat **mAt R-MC 17** i **mAt HD83** na apoptozu timocita u kulturi sa **TDC**. Apoptoza ukupnih timocita u kulturi sa TDC je određivana nakon 6 h kultivacije primenom morfoloških kriterijuma kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih timocita u odnosu na ukupan broj timocita. Prikazane su  $X \pm SD$  iz 3 različita eksperimenta. \*\*\* $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (timociti kultivisani sa TDC bez mAt); ### $p < 0.005$  u poređenju sa IrAt.



Grafikon 23. **Efekat mAt R-MC 17 i mAt HD83 na apoptozu timocita u kulturi sa TDC.** Apoptoza ukupnih timocita u kulturi sa TDC je određivana nakon 6 h kultivacije, obeležavanjem ćelija Aneksin V-FITC/PI, primenom protočne citofluorometrije, kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Prikazani su histogrami jednog od 3 urađena eksperimenta. A) sami timociti; B) timociti/TDC; C) timociti/TDC/IrAt; D) timociti/TDC/R-MC 17; E) timociti/TDC/HD83.

U cilju provere mogućnosti da je stimulacija apoptoze u prisustvu testiranih mAt povezana sa povećanom adhezivnošću apoptotičnih timocita za TDC, u daljim istraživanjima ispitana je apoptoza timocita u rozetama. Dobijeni rezultati, prikazani na grafikonu 24, pokazali su da je procenat apoptotičnih timocita u rozetama veći u poređenju sa apoptozom u populaciji ukupnih timocita. Takođe, procenat apoptotičnih timocita u rozetama (u prisustvu R-MC 17 mAt i HD83 mAt) je bio statistički značajno

veći u poređenju sa procentom apoptotičnih timocita u rozetama u kontrolnim kulturama (bez dodatka primarnih mAt ili u prisustvu Ir mAt).



Grafikon 24. **Efekat mAt R-MC 17 i mAt HD83 na apoptozu timocita u rozetama TDC/timociti.** Apoptoza timocita u TDC/timocitnim rozetama je određivana nakon 30 min kultivacije primenom morfoloških kriterijuma kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Određivan je procenat apoptotičnih timocita u rozetama u odnosu na ukupan broj apoptotičnih timocita. Prikazane su  $X \pm SD$  iz 3 različita eksperimenta. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  u poređenju sa kontrolom (timociti kultivisani sa TDC bez mAt); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  u poređenju sa IrAt.

#### **FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA R-MC 17 MONOKLONSKOG ANTITELA NA *IN VIVO* MODELU**

Uloga R-MC 17 antigena u intratimunsom diferentovanju T limfocita procenjivana je na modelu intratimusnog ubrizgavanja mAt. R-MC 17 mAt je ubrizgavano direktno u timus analizirane grupe životinja u koncentraciji 1 mg/kg životinje. Kontrolnim grupama životinja su ubrizgavani IrAt cBH11 (u istoj koncentraciji) odnosno PBS (u zapremini u kojoj je dodato mAt, 100  $\mu$ l/životinji). Nakon 5 dana određivana je celularnost timusa, apoptoza timocita i zastupljenost

osnovnih subpopulacija timocita, definisanih ispoljavanjem T ćelijskog receptora (TCR) i koreceptorskih molekula CD4 i CD8.

### Efekat R-MC 17 mAt na celularnost timusa

Određivanjem ukupne celularnosti timusa nakon tretmana pokazano je da R-MC 17 mAt statistički značajno smanjuje broj ćelija u timusu u poređenju sa IrAt (CBH11) i PBS (tabela 6). Broj ćelija u timusu životinja kojima je aplikovano R-MC 17 mAt je bio skoro dvostruko manji u poređenju sa IrAt ( $641 \pm 206$  vs.  $1128 \pm 156$ ).

Tabela 6. **Celularnost timusa**

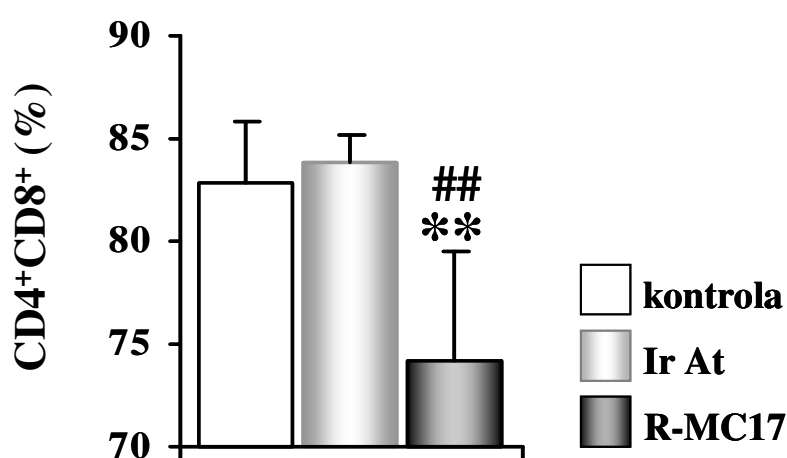
Tretman	Apsolutni broj timocita ( $X \pm SD$ ) x $10^6$
PBS	$1048 \pm 104$
CBH11	$1128 \pm 156$
R-MC 17	$641 \pm 206^{**} \#\#$

Tabela 6. **Uticaj R-MC 17 mAt na celularnost timusa.** R-MC 17 mAt ( $100\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ), IrAt CBH11 ( $100\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) ili PBS ( $100\mu\text{l}$ ) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana napravljena je suspenzija ćelija i određen je apsolutni broj timocita, brojanjem pod svetlosnim mikroskopom.  $**p < 0.01$ , u poređenju sa kontrolom (PBS);  $\#\#p < 0.01$  u poređenju sa IrAt (CBH11).

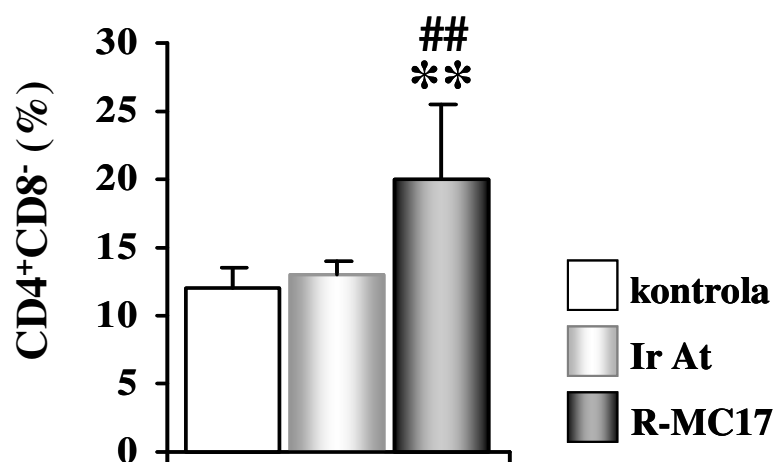
### Efekat R-MC 17 mAt na diferentovanje subpopulacija timocita

Analiza relativnih i apsolutnih vrednosti 4 subpopulacije timocita DN ( $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ), DP ( $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ ), SP ( $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$  i  $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ ) procenjivana je na osnovu ekspresije CD4 i CD8 molekula. Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonima 25-32.

Poređenjem relativnih vrednosti ispitivanih subpopulacija timocita između eksperimentalne i kontrolnih grupa životinja zapaženo je da je u timusu u koji je ubrizgano R-MC 17 mAt procenat DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (grafikon 25) timocita bio statistički značajno niži, a procenat SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (grafikon 26) timocita statistički značajno viši u poređenju sa kontrolama.

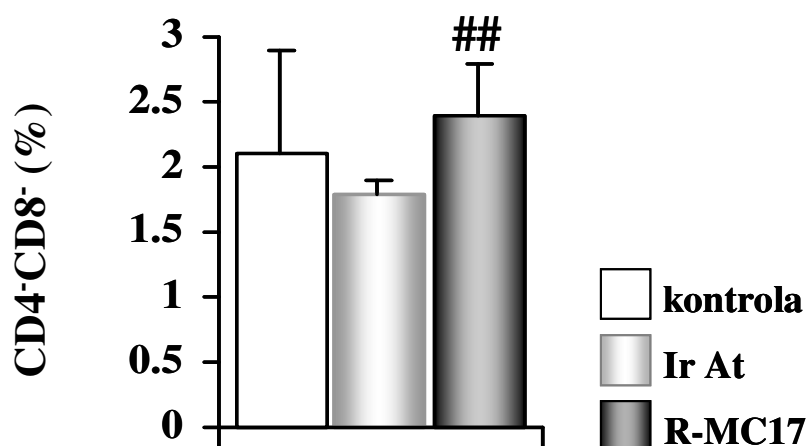


Grafikon 25. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (relativne vrednosti DP subpopulacije). R-MC 17 mAt (100µg/100µl), IrAt-CBH11 (100µg/100µl) ili PBS (100µl) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je X±SD relativnog broja DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita iz 3 eksperimenta. \*\*p<0.01, u poređenju sa kontrolom (PBS); ##p<0.01 u poređenju sa IrAt (CBH11).



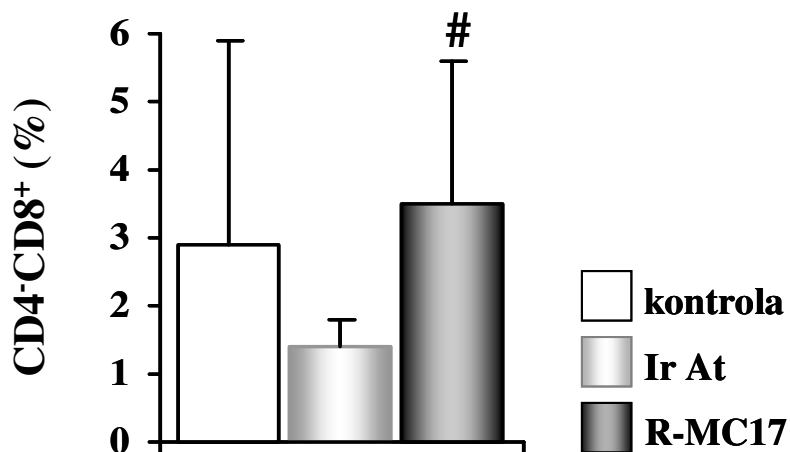
Grafikon 26. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (relativne vrednosti CD4 SP subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt CBH11 (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) ili PBS (100  $\mu$ l) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  relativnog broja SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita iz 3 eksperimenta. \*\*p<0.01, u poređenju sa kontrolom (PBS); ##p<0.01 u poređenju sa IrAt (CBH11).

Takođe, procenti DN CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (grafikon 27) i SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (grafikon 28) timocita su bili viši u odnosu na kontrole ali statistički značajno viši samo u poređenju sa kontrolnim IrAt ali ne i sa PBS.



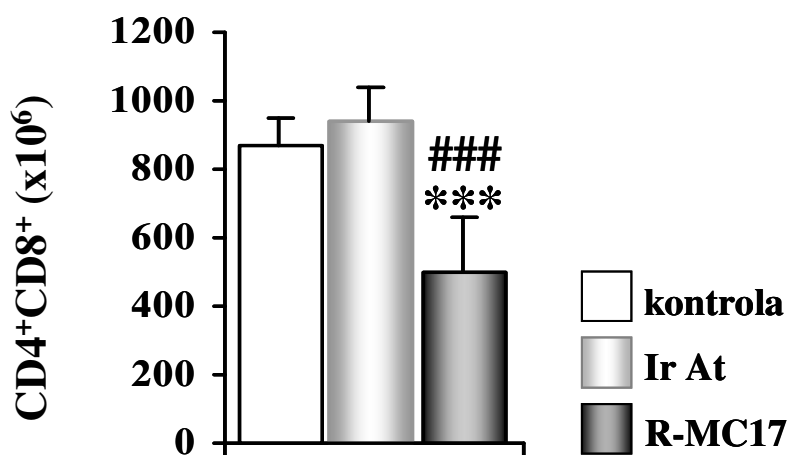
Grafikon 27. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (relative vrednosti DN subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt CBH11 (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) ili PBS (100  $\mu$ l) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  relativnog broja DN CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita iz 3 eksperimenta. ## $p < 0.01$  u poređenju sa IrAt (CBH11).





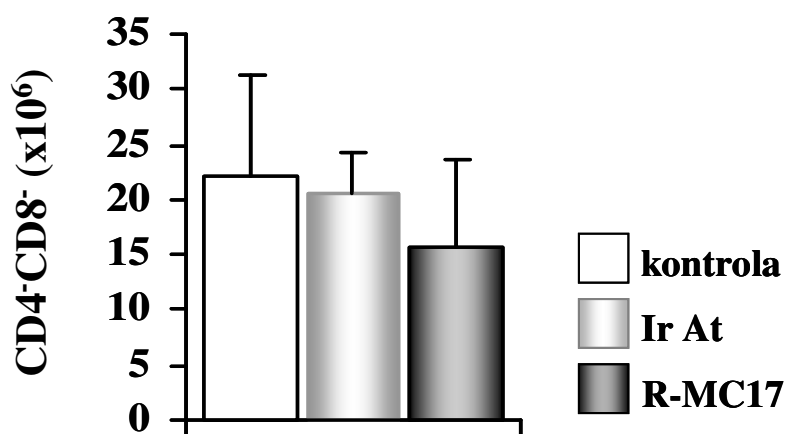
Grafikon 28. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (relativne vrednosti CD8 SP subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt CBH11 (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) ili PBS (100  $\mu$ l) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  relativnog broja SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita iz 3 eksperimenta. (PBS); #p<0.05 u poređenju sa IrAt (CBH11).

Analizom apsolutnih vrednosti subpopulacija timocita zabeleženi su nešto drugačiji rezultati u odnosu na relativne vrednosti. U grupi životinja kojima je intratimusno aplikovano R-MC 17 mAt detektovan je statistički značajno niži apsolutni broj DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita, skoro dva puta manji u poređenju sa kontrolama (grafikon 29). Ovaj nalaz je bio u saglasnosti sa smanjenjem relativnog broja DP populacije timocita.

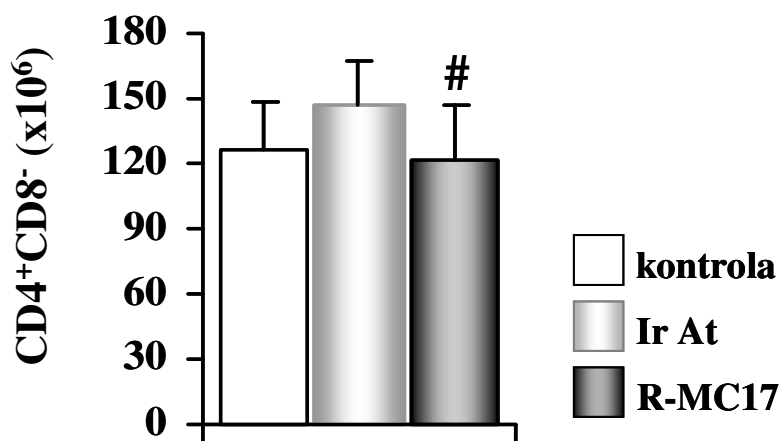


Grafikon 29. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (apsolutne vrednosti DP subpopulacije). R-MC 17 mAt (100µg/100µl), IrAt CBH11 (100µg/100µl) ili PBS (100 µl) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  apsolutnog broja DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita iz 3 eksperimenta. \*\*\* $p < 0.005$ , u poređenju sa kontrolom (PBS); ### $p < 0.005$  u poređenju sa IrAt (CBH11).

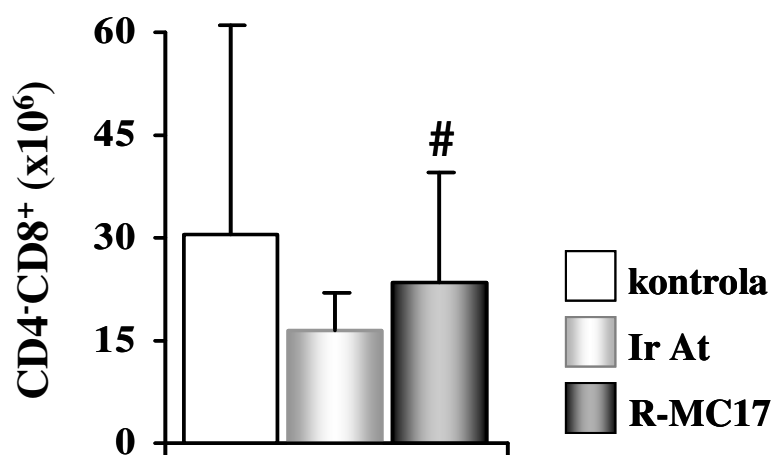
Ukupan broj ostalih populacija timocita (DN i SP) je pokazivao trend smanjenja (bez dostizanja statističke značajnosti) u poređenju sa kontrolnom grupom koja je tretirana PBS-om. Međutim, u poređenju sa kontrolnom grupom kojoj je aplikovano IrAt cBH11 detektovan je statistički značajno manji broj SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> i statistički značajno veći broj SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> timocita (grafikoni 30, 31, 32).



Grafikon 30. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (apsolutne vrednosti DN subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt CBH11 (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) ili PBS (100 $\mu$ l) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  apsolutnog broja DN CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita iz 3 eksperimenta.



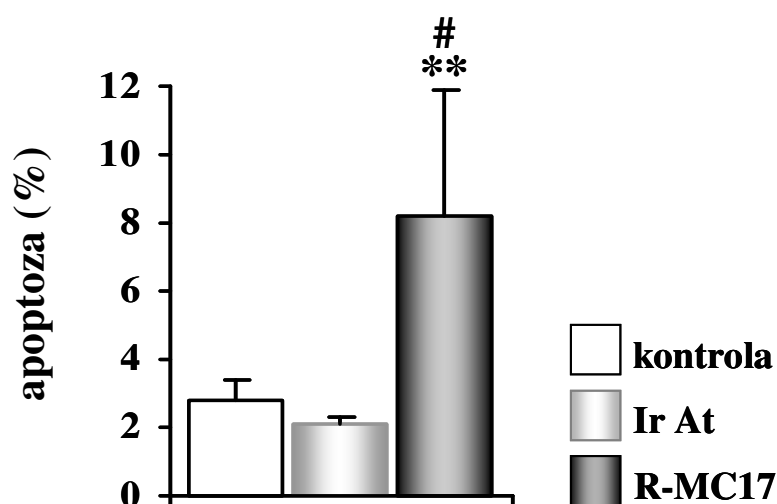
Grafikon 31. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (apsolutne vrednosti CD4 SP subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 µg/100 µl), IrAt CBH11 (100 µg/100µl) ili PBS (100 µl) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  apsolutnog broja SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita iz 3 eksperimenta. # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt (CBH11).



Grafikon 32. Uticaj R-MC 17 mAt na diferentovanje timocita *in vivo* (apsolutne vrednosti CD8 SP subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 µg/100µl), IrAt CBH11 (100 µg/100µl) ili PBS (100 µl) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD4 mAt i anti-CD8 mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  apsolutnog broja SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> timocita iz 3 eksperimenta. # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt (CBH11).

#### Efekat R-MC 17 mAt na intratimusnu apoptozu timocita

U cilju provere da li su dobijeni rezultati posledica pro-apoptotskog delovanja R-MC 17 mAt analizirana je apoptoza timocita sve tri grupe tretiranih životinja. Dobijeni rezultati, prikazani na grafikonu 33, su pokazali da R-MC 17 mAt statistički značajno povećava apoptozu timocita u poređenju sa IrAt i kontrolom (PBS).

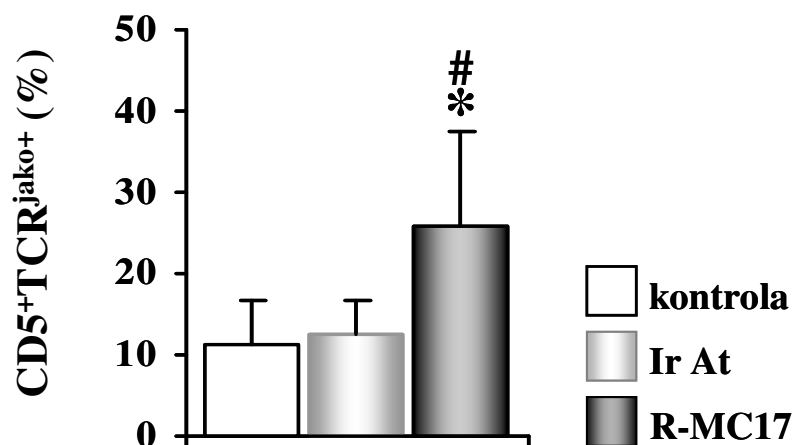


Grafikon 33. Uticaj R-MC 17 mAt na apoptozu timocita *in vivo*. R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt BH11 (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) ili PBS (100  $\mu$ l) aplikovani su intratimusun pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane i određivana je njihova apoptoza primenom morfoloških kriterijuma, pod svetlosnim mikroskopom. Prikazana je  $X \pm SD$  procenta apoptotičnih timocita. \*\* $p < 0.01$ , u poređenju sa kontrolom (PBS); # $p < 0.05$  u poređenju sa IrAt (CBH11).

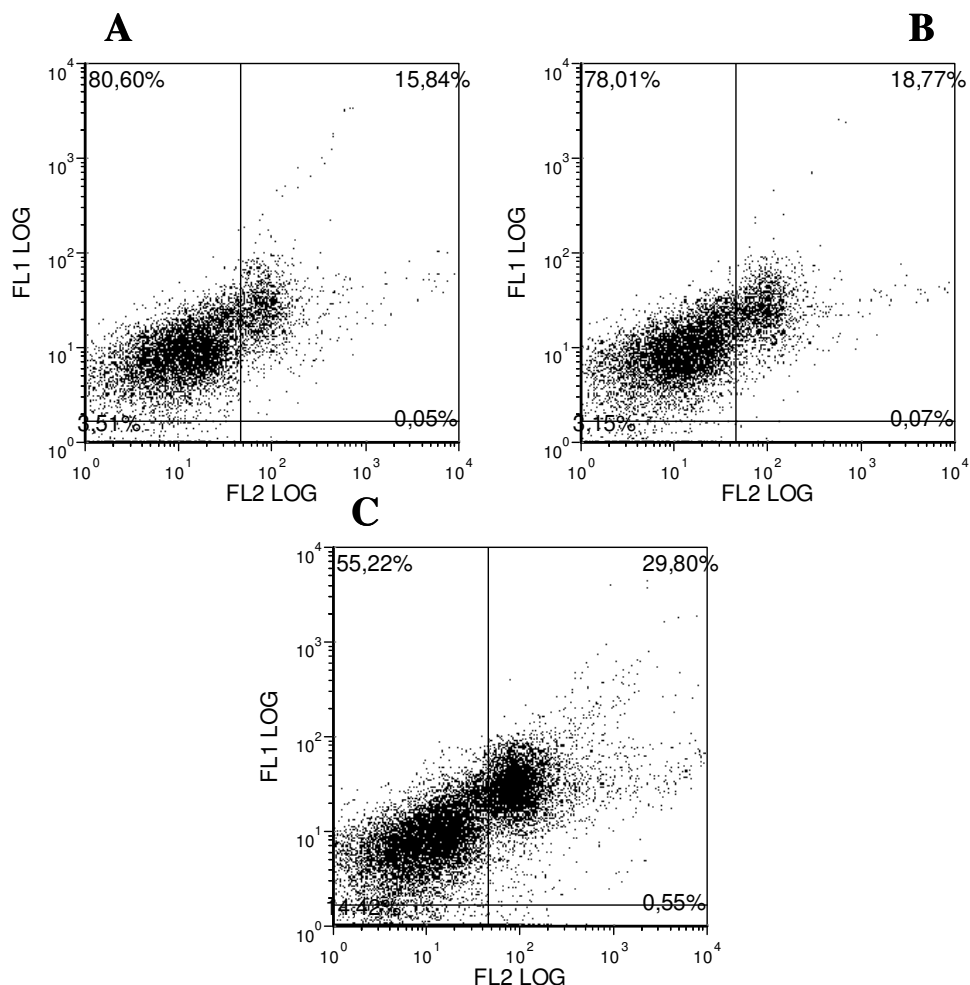
#### Uloga R-MC 17 antigena u intratimusnoj selekciji T limfocita *in vivo*

Osim uticaja R-MC 17 mAt na procese diferentovanja timocita, analiziran je i njegov uticaj na procese intratimusnog sazrevanja T limfocita. Analizirana je ekspresija CD5 i TCR molekula za koje je pokazano da im se intezitet ispoljavanja povećava tokom sazrevanja i selekcije. U tom cilju, određivan je apsolutni i relativni broj CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> ćelija. Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonima 34-36.

Postojala je statistički značajna razlika (veći procenat), u relativnom broju CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> ćelija u grupi životinja kojoj je aplikovano R-MC 17 mAt u poređenju sa kontrolnim grupama životinja (koje su tretirane PBS-om i IrAt) (grafikon 34).



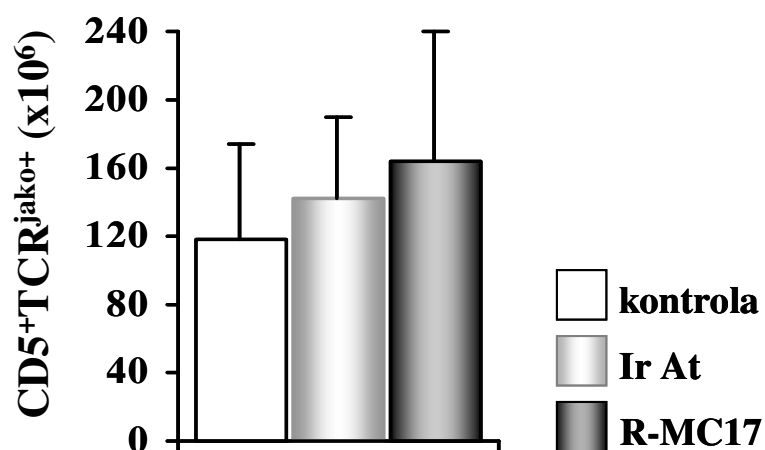
Grafikon 34. Uticaj R-MC 17 mAt na sazrevanje timocita *in vivo* (relativne vrednosti CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jako+</sup> subpopulacije). R-MC 17 mAt (100µg/100µl), IrAt CBH11 (100µg/100µl) ili PBS (100 µl) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD5 mAt i anti-TCR mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je X±SD relativnog broja CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jako+</sup> timocita iz 3 eksperimenta. #p<0.05 u poređenju sa Ir At (CBH11); \*p<0.05 u poređenju sa kontrolom (PBS).



Grafikon 35. Uticaj R-MC 17 mAt na sazrevanje timocita *in vivo* (relativne vrednosti  $CD5^+TCR^{jako+}$  subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt CBH11 (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) ili PBS (100  $\mu$ l) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD5 mAt (FL1) i anti-TCR mAt (FL2) metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazani su histogrami fluorescence jednog reprezentativnog eksperimenta.



Međutim, analizom ukupnog broja  $CD5^+TCR^{jako+}$  ćelija (grafikon 36) nije nađena statistički značajna razlika između eksperimentalne grupe (životinje kojima je ubrizgano R-MC 17 mAt) i kontrolnih grupa životinja.



Grafikon 36. Uticaj R-MC 17 mAt na sazrevanje timocita *in vivo* (apsolutne vrednosti  $CD5^+TCR^{jako+}$  subpopulacije). R-MC 17 mAt (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l), IrAt CBH11 (100  $\mu$ g / 100  $\mu$ l) ili PBS (100  $\mu$ l) aplikovani su intratimusno pacovima AO kao što je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Nakon 5 dana ćelije su izolovane, obeležene anti-CD5 mAt i anti-TCR mAt metodom dvostruke fluorescence i analizirane na protočnom citofluorometru. Prikazana je  $X \pm SD$  apsolutnog broja  $CD5^+TCR^{jako+}$  timocita iz 3 eksperimenta.

## DISKUSIJA

Timus je centralni limfni organ koji ima ključnu ulogu u razvoju T limfocita. Razvoj T limfocita u timusu je rezultat niza dvosmernih komunikacija kako između samih timocita, tako i između timocita i ćelija mikrosredine. Ove interakcije su posredovane direktnim ćelijskim kontaktima, pretežno preko adhezivnih molekula i solubilnim faktorima (timusni hormoni, citokini, neuropeptidi, hemotaktički faktori i drugi molekuli) (Ritter i Boyd, 1993).

Epitelne ćelije predstavljaju najznačajniju komponentu mikrosredine timusa bez čijeg funkcionisanja nema ni razvoja T limfocita. One izgrađuju trodimenzionalnu retikularnu potku u kojoj su smešteni timociti i druge mobilne ćelije. Međusobno su povezane dezmozomima. U njihovoj citoplazmi su prisutni tonofilamenti, koji su izgrađeni od različitih citokeratinskih polipeptida (Nabarra i Andrianarison, 1987).

Epitelne ćelije timusa su morfološki veoma heterogene. Prema jednoj podeli koju je dao van de Wijngaert i sar. (1984) EC humanog timusa su klasifikovane u šest različitih tipova na osnovu ultrastrukturnih osobina.

Morfološka heterogenost EC, koja je zapažena proučavanjem timusa klasičnim histološkim i elektronsko-mikroskopskim metodama, ukazuje da pojedine EC, zavisno od topografske lokalizacije u timusu, imaju specifičnu ulogu u razvoju T limfocita. Međutim, sve do 1975. god. kada su Kohler i Milstein (1975) uveli tehnologiju za proizvodnju mAt nije bilo moguće definisati svojstva ovih ćelija, odnosno strukturu i funkciju brojnih receptorskih molekula koji su ispoljeni na njihovoj membrani ili u citoplazmi. Uvođenjem tehnologije hibridoma napravljena je prava revolucija u otkrivanju antigenskih struktura imunokompetentnih ćelija, i to najpre limfocita, što je omogućilo stvaranje tzv. CD nomenklature (engl. *cluster of differentiation*). Ubrzo je započeto otkrivanje antigenskih determinanti i drugih ćelija, uključujući i EC timusa (Brekelmans i van Ewijk, 1990).

U strategiji proizvodnje mAt reaktivnih sa antigenima EC timusa za imunizaciju eksperimentalnih životinja najčešće se koristi ukupan homogenat timusa ili, u novije

vreme, ćelijske linije uspostavljene gajenjem timusnog epitela *in vitro*. Pogodnim testovima za odabiranje pozitivnih hibridoma vrši se identifikacija i selekcija specifičnih antiepitelnih antitela. Ona se zatim mogu iskoristiti u različite svrhe počev od biohemijske karakterizacije antigena, kloniranje gena, izučavanje regulacije ekspresije odnosno modulacije funkcije datog molekula (Brekelmans i van Ewijk, 1990, Kampinga i sar., 1989, Kampinga i sar., 1987).

Panel mAt specifičnih za EC timusa nije velik. Ona su, osim u našoj laboratoriji, proizvedena u još 6 svetskih centara. Tokom 1987. godine obavljeno je međulaboratorijsko testiranje ovih reagenasa radi njihovog grupisanja i dalje funkcionalne karakterizacije. Tim eksperata za ovu oblast istraživanja, u kome su učestvovali i naši istraživači, izvršio je neophodna testiranja 25 antitela od kojih su 8 (R-MC serije) proizvedena u našoj ustanovi. Na simpozijumu o timusu održanom 1989. godine u Holandiji (Kampinga i sar., 1989) napravljena je prva tzv. CTES klasifikacija. Antitela su grupisana u 5 osnovnih CTES grupa (Brekelmans i van Ewijk, 1990, Kampinga i sar., 1989). U prvu grupu su svrstana antitela koja se vežu za sve EC timusa. Antitela druge grupe prepoznaju antigenske determinante na EC supkapsulne zone i medule. Treća grupa antitela je specifična za kortikalni epitel, dok su antitela četvrte i pete grupe reaktivna sa EC medule. Pri tome četvrta grupa prepoznaje antigene pojedinih podtipova EC medule i HT, dok se antitela pete grupe specifično vezuju za HT. Unutar pojedinih grupa uočena je razlika u imunohistohemijskoj reaktivnosti, što ukazuje na dalju fenotipsku heterogenost epitela timusa. To su pokazala i naša kasnija istraživanja zahvaljujući novim antitelima koja su proizvedena, a koja nisu bila uključena u prethodnu analizu.

Koristeći sličnu strategiju u IMI VMA je napravljen i panel antitela (R-MC serije) prema EC timusa pacova. Među njima je i R-MC 17 mAt. Ovo mAt je dobijeno fuzijom splenocita BALB/c miša imunizovanog susupenzijom timusa AO pacova obogaćenom nelimfoidnim ćelijama i P-3-X63-Ag 8.653 mijelomske ćelijske linije. Izotip ovog mAt je IgG<sub>1</sub>. Nakon fuzije i serije "screening" testova pokazano je da se antitelo selektivno vezuje za korteks timusa i pojedine ćelije u meduli (Colic i sar., 1988). Zbog interesantnog obrasca bojenja ovo antitelo je odabrano za dalju biohemijsku, imunohistohemijsku i funkcionalnu karakterizaciju. Ono što je interesantno, tip imunoreaktivnosti u timusu R-MC 17 mAt se razlikuje od reaktivnosti drugih antitela

koja se dominantno vezuju za kortikalne EC (Čolić, 1997). Zbog toga je i prvi cilj ovog rada bio da se odredi biohemijska priroda molekula koga R-MC 17 mAt detektuje.

Najpre je izvršeno liziranje i solubilizacija (nejonskim deterdžentom NP-40) antigena prisutnih u suspenziji ćelija timusa pacova obogaćenoj nelimfoidnom frakcijom (stromalne ćelije). Reaktivnost R-MC 17 mAt je ispitana Western-blotom, posle elektroforeze i prenosa na nitroceluloznu membranu. Pokazano je da R-MC 17 mAt pod neredukujućim uslovima jasno detektuje jedan molekul čija je molekulska masa iznosila oko 205 kDa.

Pod neredukujućim uslovima, postojanje slobodnih sulfhidrilnih grupa, ali i intramolekulskih disulfidnih mostova, daje mogućnost formiranja nasumičnih disulfidnih veza kako intra- tako i intermolekulskih, što može biti osnova za formiranje proteinskih agregata. Vezivanje detektujućeg antitela (R-MC 17) za ove agregate bi moglo da navede na pogrešan zaključak o molekulskoj masi ispitivanog molekula. Imajući na umu ovu mogućnost, u sledećem koraku smo ponovili proceduru pod redukujućim uslovima, i pokazali da R-MC 17 mAt gubi reaktivnost.

Polazeći od dobijenih rezultata o molekulskoj masi antigena koga detektuje R-MC 17 mAt i distribucije R-MC 17 antigena u timusu pretpostavili smo da bi R-MC 17 antigen mogao biti molekul DEC-205 (CD205). U cilju potvrde ove pretpostavke u narednom nizu eksperimenata smo koristili mAt HD83 koje prepoznaje DEC-205 molekul kod pacova (Park i sar., 2012). Korišćenjem metoda *Western-blot*a, imunoprecipitacije i sekvencijalne imunoprecipitacije (precipitacije lizata timusa pomoću HD83 mAt, a zatim detekcije antigena pomoću R-MC 17 mAt i obrnuto) pokazano je da oba antitela detektuju isti DEC-205 molekul.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je CD205 endocitozni molekul sličan C-tip lektinu tipa I koji se sastoji od jednog polipeptidnog lanca. Vanćelijski deo molekula sadrži N-terminalni domen bogat cisteinom (CyR), fibronektin tip II domen (FnII) i deset domena koji strukturno (ali ne obavezno i funkcionalno) nalikuju domenima C-tip lektina (engl. *C-type lectin-like domains* - CTLD) (East i Isacke, 2002, Jiang i sar., 1995, McKay i sar., 1998). Na osnovu navedene strukture, CD205 molekul je svrstan u familiju manoznih receptora (East i Isacke, 2002). Sam manozni receptor je dobro okarakterisan i sadrži dva različita mesta za vezivanje liganda. CTLD4 je pravi (tipični)

C- tip lektin koji vezuje terminalnu manozu, fukozu, N-acetil glukozamin i glukozu (Taylor i sar., 1992), dok CyR je lektin koji vezuje terminalnu sulfonovanu Gal-Nac-4-SO<sub>4</sub> (Fiete i sar., 1998). Iako strukturno srodan, CD205 ne sadrži konzervisane ostatke koji su neophodni za lektinsko i C-tip lektinsko vezivanje. Ligandi za koje se vezuje CD205 su za sada nepoznati (East i Isacke, 2002).

Sledeći niz eksperimenata je imao za cilj da se detaljno analizira ekspresija i funkcija ovog molekula, s obzirom da su za pacovski DEC-205 molekul ovi podaci skoro potpuno nepoznati, a takođe, funkcija humanog i mišjeg DEC-205 molekula nije dovoljno ispitivana u timusu.

U okviru imunohistohemijske karakterizacije R-MC 17 mAt pošli smo od prvih publikovanih podataka da se ovo antitelo vezuje za keratin-pozitivne ćelije u korteksu timusa i pojedine keratin-negativne ćelije u meduli timusa (Colic i sar., 1988). Zbog toga je prvi cilj ovog dela istraživanja bio da se pokaže povezanost obrasca vezivanja R-MC 17 antitela u timusu sa ekspresijom MHC molekula II klase. Pokazano je da se R-MC 17 mAt vezuje za kortikalne TEC i pojedine ćelije u meduli koje po morfološkim karakteristikama liče na DC. Obrazac bojenja sa HD83 mAt je bio identičan na osnovu čega se moglo sa velikom verovatnoćom zaključiti da je DEC-205 u timusu pacova ispoljen na kortikalnom epitelu i TDC koje su lokalizovane u kortikomedularnoj zoni i meduli.

Analizom ekspresije DEC-205 molekula u slezini i limfnom čvoru pacova pomoću R-MC 17 mAt pokazana je dominantna imunoreaktivnost na DC u PALS-u slezine odnosno parakorteksu i interfolikularnim zonama limfnog čvora. U oba ova limfna organa zapažena je slabija imunoreaktivnost u folikulima, odnosno na makrofagama crvene pulpe slezine, što je u saglasnosti sa publikovanim podacima kod miša (Witmer-Pack i sar., 1995) da je DEC-205 primarno marker antigen-prezentujućih ćelija. Njegova ekspresija na DC je veća u odnosu na B limfocite. Međutim, ekspresija DEC-205 molekula na makrofagama u limfnim organima miša nije pokazana. Razlika koju smo mi uočili u slezini može biti posledica različitog afiniteta vezivanja R-MC 17 antitela i mišjeg NLDC-145 antitela ili različite ekspresije ovih molekula na mišjim i pacovskim makrofagama.

Međutim, specifična ekspresija DEC-205 na kortikalnim TEC nas je motivisala da se ekspresija ovog molekula detaljno ispita na ćelijskim kulturama timusa *in vitro*.

U prvom koraku je ispitana reaktivnost R-MC 17 mAt sa timusnom EC linijom R-TNC.1 koja je ranije produkovana na IMI VMA (Colic i sar., 1994).

R-TNC.1 dugotrajna epitelna linija je izolovana iz timusa AO pacova. Prema fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama ćelije ove linije su svrstane u podgrupu TNC. Primenom citofluorimetrijske karakterizacije je pokazano da se R-MC 17 mAt vezuje za oko 40 % R-TNC.1 ćelija. Nalazi na R-TNC.1 ćelijskoj liniji ukazuju da se ekspresija DEC-205 molekula u kulturi na ovim ćelijama menja što ostavlja prostora za buduća istraživanja mehanizma ekspresije DEC-205 molekula na kortikalnim TEC.

Kada je određena ekspresija DEC-205 na ukupnim TDC, pokazana je pozitivnost na skoro svim sveže izolovanim TDC (oko 95%). Polazeći od činjenice da TDC predstavljaju ontogenetski heterogenu populaciju ćelija (mijeloidnog i limfoidnog porekla) i da CD11b molekul predstavlja referentni marker u fenotipskom razgraničavanju različitih subpopulacija DC (Mildner i Jung, 2014, Robbins i sar., 2008, Vandenabeele i sar., 2001), u narednim eksperimentima smo analizirali ekspresiju R-MC 17 antigena na CD11b<sup>+</sup> i CD11b<sup>-</sup> subpopulacijama TDC. Subpopulacije TDC su izdvojene primenom softverske identifikacije CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> i CD11b<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> ćelija. Analiza prisustva R-MC 17 antigena na subpopulacijama MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> i MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> TDC je pokazala da 95.2% CD11b<sup>+</sup> TDC i 98.1% CD11b<sup>-</sup> TDC ispoljava ovaj antigen. Drugim rečima, nije detektovana značajna razlika u ekspresiji R-MC 17 antigena među subpopulacijama sveže izolovanih TDC.

Opisani rezultati se razlikuju od rezultata koji su publikovani za populaciju TDC kod miša (Vremec i Shortman, 1997). Mišje DC, za razliku od pacovskih, karakteriše ekspresija CD8 $\alpha$  molekula. Na osnovu ekspresije ovog molekula i DEC-205 opisane su tri subpopulacije mišjih DC (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DEC-205<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>DEC-205<sup>-</sup> i CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>DEC-205<sup>+</sup>). TDC miša su predominantno CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DEC-205<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>. Očito da TDC pacova imaju drugačija fenotipska svojstva jer oko 50% ćelija ispoljava CD11b molekul. Ako pretpostavimo da su pacovske CD11b<sup>-</sup> TDC populacija plazmocitoidnih DC na kojima je u visokom procentu ispoljen DEC-205 ovaj nalaz je u suprotnosti sa podacima kod čoveka o niskoj ili odsutnoj ekspresiji DEC-205 na plazmocitoidnim DC (Kato i sar.,

2006). Očito da su dodatna istraživanja neophodna kako na TDC tako i na DC u perifernim limfnim organima pacova u cilju bliže fenotipske karakterizacije konvencionalnih i plazmocitoidnih DC.

Naši podaci takođe pokazuju da GM-CSF, snažan promotor razvoja konvencionalnih DC i faktor njihovog preživljavanja (Fleetwood i sar., 2005, Greter i sar., 2012, Shiomi i Usui, 2015, van de Laar i sar., 2012) ne menja bitnije ekspresiju DEC-205 molekula kako na CD11b<sup>+</sup> tako i na CD11b<sup>-</sup> TDC pacova. Za sada nema literaturnih podataka koji se odnose na ovaj fenomen ni u jednom od najčešće ispitivanih specijesa kada su u pitanju DC generalno.

Sledeći set eksperimenata se odnosio na ispitivanje funkcije DEC-205 molekula u *in vitro* modelima. Prvi model je bio adhezija timocita za R-TNC.1 kortikalnu TEC liniju i sledstveno proučavanje procesa emperipoeze. Pokazano je da R-MC 17 mAt dovodi do statistički značajne stimulacije adhezije i emperipoeze timocita u poređenju sa kontrolnim mAt. U cilju objašnjenja ovog mehanizma neophodan je detaljniji osvrt na brojne receptor/ligand interakcije koje se odvijaju između TEC (posebno TNC) i timocita.

Pretpostavlja se da migracija timocita u i van TNC zahteva niz ponovljenih postupaka adhezije i deadhezije, te ukoliko se bilo koji od ovih koraka u hodu spreči, blokira se migracija u celini (Savino i sar., 2000, Villa-Verde i sar., 1999). Oskudni rezultati dosadašnjih istraživanja na mišjim TNC linijama su pokazali da CD4, CD8, CD3, TCR, MHC molekuli I i II klase, CD44, CD25, CD2, CD58, CD5 i CD90 molekuli ne učestvuju u vezivanju i internalizaciji timocita *in vitro* (Guyden i Pezzano, 2003, Li i sar., 1992). Dobijeni rezultati su naveli autore da pretpostave da u inicijalnom vezivanju timocita za TNC važniju ulogu imaju adhezivni molekuli, kao što su LFA-1 (CD11a/CD18) i ICAM-1 (CD54) (Li i sar., 1992). Značaj LFA-1/ICAM-1 adhezivnog puta u interakciji timocita i TEC potvrdili su mnogi autori (Lepesant i sar., 1990, Nonoyama i sar., 1989, Singer i sar., 1990). Većina mišjih sveže izolovanih TNC ispoljava ICAM-1 molekul na spoljašnjoj membrani, kao i na membrani unutarćelijskih vakuola (Cordes i sar., 1997). Istraživanja Vučević i saradnika u *in vitro* uslovima su pokazala da se vezivanje timocita za R-TNC.1 liniju odvija uz učešće CD11a/CD18-CD54 zavisnog, kao i CD11a/CD18 zavisnog CD54 nezavisnog mehanizma adhezije,

dok u emperipoeznoj aktivnosti oba molekula (CD11a/CD18 i CD54) imaju značajnu ulogu (Colic i sar., 1994, Vučević i sar., 2002). Međutim, rezultati istraživanja na mišjim TNC linijama su pokazali da anti-LFA-1 i anti-ICAM-1 mAb ne ometaju formiranje TNC kompleksa (Guyden i Pezzano, 2003). Osim ovog, i rezultati nekih drugih istraživanja govore protiv specifične uloge LFA-1 molekula u vezivanju timocita za TNC. Timociti unutar sveže izolovanih TNC su LFA-1<sup>-</sup> (Cordes i sar., 1997, Ezaki i Uehara, 1997, Oliveira-dos-Santos i sar., 1997). S obzirom na ubikvitarnu ekspresiju LFA-1 molekula na timocitima sa jedne strane, i nalaza da TNC prevashodno vezuju i internalizuju DP subpopulaciju timocita sa druge strane, logično je pretpostaviti da ovaj molekul nema važnu ulogu u interakciji timocita i TNC (Guyden i Pezzano, 2003, Kyewski, 1986). Međutim, nikako se ne mogu isključiti mogućnosti da *in vivo* u interakciji sa TNC, LFA-1<sup>+</sup> timociti ne koriste ICAM-1 kao jedini ligand ili da na internalizovanim timocitima dolazi do smanjenja ekspresije LFA-1 molekula. Imajući na umu sve navedene činjenice dalja istraživanja uloge LFA-1/ICAM-1 interakcije u mikrosredini TNC čine se opravdanim. Istraživanja učesća TCR, koreceptorskih molekula i najvažnijih adhezivnih molekula T limfocita, kao i molekula klase I i II MHC, koje su analizirali Vučević i saradnici su prva istraživanja te vrste rađena na pacovima (Colic i sar., 1994, Vučević i sar., 2002). Prema podacima iz dostupne literature to su i najopsežnija do sada sprovedena ispitivanja molekula uključenih u formiranje kompleksa timocita i ćelija TNC linija *in vitro*. Ta istraživanja su se odnosila na adheziju i emperipoezu mirujućih timocita i timocita aktivisanih pomoću ConA i IL-2 i R-TNC.1 ćelija nestimuliranih ili stimuliranih pomoću IFN- $\gamma$  *in vitro*. Autori su pokazali da se adhezija mirujućih timocita za R-TNC.1 ćelije odvija uz učesće CD2, CD4, CD8, CD18 i CD90 molekula CD11a/CD18 zavisnim CD54 nezavisnim mehanizmima i CD11a/CD18 -CD54 zavisnim mehanizmima. U adheziji aktivisanih timocita za R-TNC.1 ćelije, osim navedenih molekula, učestvuju i  $\alpha\beta$ TCR i molekuli I klase MHC, a vezivanje se odvija kako CD11a/CD18 zavisnim CD54 nezavisnim mehanizmima tako i CD11a/CD18 - CD54 nezavisnim mehanizmima adhezije. U emperipoezu i mirujućih i aktivisanih timocita uključeni su CD2, CD4, CD8, CD90 i molekuli klase I MHC. Molekuli klase II MHC učestvuju u emperipoezi aktivisanih timocita. Emperipoeza se odvija CD11a/CD18 - CD54 zavisnim mehanizmima (Vučević i sar., 2002). Dobijeni rezultati su pokazali da su adhezivni molekuli i njihovi



ligandi neophodni za optimalan kontakt timocita i R-TNC.1 ćelija brojni i da formiraju vrlo složenu mrežu. Na osnovu dobijenih nalaza sa velikom izvesnošću autori su pretpostavili da adhezivni molekuli uključeni u adheziju ne moraju biti uključeni u emperipoezu i obrnuto. Drugim rečima, niz adhezijskih molekula koji učestvuju u interakciji timocita i R-TNC.1 linije je određen i prirodom procesa koji se odvija (adhezija/emperipoeza) (Colic i sar., 1994, Vučević i sar., 2002). Ovu pretpostavku potvrđuju i nalazi drugih autora da samo vezivanje timocita za mišiju TNC liniju nije dovoljno za internalizaciju timocita (Philp i sar., 1993). Vučević i saradnici su pokazali značajnije učešće CD11a/CD18, CD54, CD2 i CD4 molekula u emperipoezi nego u adheziji timocita za R-TNC.1 ćelije. Takođe, isti autori su našli da stepen uključenosti pojedinih molekula u oba procesa (adhezija/emperipoeza) zavisi od faze kontakta (rana/kasna), fenotipskog profila i stanja aktivacije obe populacije ćelija (timocita/R-TNC.1). Konačno, svi dobijeni rezultati ukazuju da se u različitim stadijumima aktivacije jedne ćelije njeni adhezivni molekuli mogu vezivati za različite ligande, od kojih su neki verovatno ispoljeni isključivo na TNC i za sada su nepoznati (Vučević i sar., 2002).

Među molekulima čiji je značaj u unutartimusnom razvoju T-limfocita nedvosmisleno potvrđen, posebno se izdvajaju TCR i MHC molekuli. Zbog toga rezultati učešća TCR i MHC molekula u kontaktu timocita i TNC zaslužuju dodatnu diskusiju. U početnim istraživanjima TNC, za imunologe je bio najinteresantniji nalaz da dolazi do ispoljavanja obe klase molekula MHC na spoljašnjoj membrani TNC i membranama njenih vakuola (Kyewski, 1986), imajući u vidu činjenicu da se ispoljavanje klase II MHC molekula povezuje prevashodno sa ćelijama imunskog sistema. Ovaj nalaz je ukazivao na TNC kao ćelije koje imaju mogućnost da učestvuju u prezentaciji antigena, a koje uz to formiraju i jedinstvenu mikrookolinu koja bi mogla imati važnu ulogu u regulaciji procesa unutartimusne selekcije timocita. Međutim, rezultati prvobitnih *in vitro* istraživanja nisu potvrdili učešće MHC molekula u kontaktu timocita i TNC. Naime, Li i saradnici su pokazali da molekuli klase I i II MHC ne učestvuju u vezivanju timocita za TNC liniju (Li i sar., 1992), a Villa-Verde i saradnici su našli da anti-MHC I mAb ne utiču na formiranje kompleksa sveže izolovanih mišijih TNC i timocita u kulturi (Villa-Verde i sar., 1999). Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima Vučević i saradnika i da molekuli klase I i II MHC bitnije ne učestvuju u

vezivanju mirujućih timocita za R-TNC.1 liniju. Međutim, molekuli klase I MHC učestvuju u vezivanju aktivisanih timocita za R-TNC.1 ćelije i internalizaciji mirujućih timocita. Istovremeno, MHC molekuli obe klase su uključeni u internalizaciju aktivisanih timocita (Vučević i sar., 2002). Dakle, jedan molekul može imati važnu ulogu u izvršenju jedne funkcije TNC, a da pri tome ne učestvuje u ostvarenju druge funkcije TNC. U saglasnosti sa ovim nalazima su rezultati istraživanja Pezzano-a i saradnika koji su pokazali da molekuli klase I i II MHC nisu neophodni za emperipoeznu aktivnost mišije TNC linije, ali su neophodni za prenos signala koji omogućava subpopulaciji internalizovanih timocita da nastavi dalje sazrevanje (Pezzano i sar., 1995, Pezzano i sar., 1996).

Funkcija pojedinih molekula koji učestvuju u međucelijskim komunikacijama između TNC i timocita se najčešće pokazuje primenom blokirajućih mAt. Međutim, kako objasniti da R-MC 17 mAt stimuliše adhezivne procese u timusu? Jedno od objašnjenja bi moglo biti da ligand-vezujuće mesto na DEC-205 molekulu, koje prepoznaje za sada neidentifikovane ligande na timocitima, se razlikuje u odnosu na epitop za koga se vezuje R-MC 17 mAt. Vezivanjem ovog mAt za odgovarajući epitop može doći do konformacionih promena na ligandu koji se vezuje za odgovarajuće receptore na timocitima, a time i do povećanog vezivanja. Druga mogućnost je da se nakon vezivanja R-MC 17 mAt prenosi signal preko DEC-205 u unutrašnjost R-TNC.1 ćelija, što može dovesti do povećane ekspresije i/ili afiniteta vezivanja poznatih adhezivnih liganada na TEC. Za ove pretpostavke još nema eksperimentalnih potvrda.

Dominantna funkcija DEC-205 je da usmeri antigen internalizovan iz vanćelijskog prostora u odeljak ćelije specijalizovan za preradu antigena (Mahnke i sar., 2000). Na osnovu rezultata istraživanja pretpostavljeno je da DEC-205 ima ulogu u endocitozi i sledstvenoj preradi sopstvenih antigena u timusu. Ovi mehanizmi imaju poseban značaj u procesima selekcije u timusu (Klein i sar., 2009). Small i Kraal su pokazali da DEC-205 učestvuje u eliminaciji apoptotičnih timocita od strane mišje kortikalne TEC linije *in vitro* (Small i Kraal, 2003). Takođe, rezultati istraživanja Iyoda i saradnika su ukazali da sličnu ulogu može imati i subpopulacija mišjih CD8<sup>+</sup> DC za koju je pokazano da selektivno endocituje umiruće ćelije u kulturi i *in vivo* (Iyoda i sar., 2002). Ovaj nalaz je bio jako važan jer CD8<sup>+</sup> DC, nasuprot CD8<sup>-</sup> DC su specijalizovane za „hvatanje“ umirućih ćelija i unakrsnu prezentaciju ćelijskih antigena i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>

T ćelijama. Pretpostavlja se da u ovim procesima DEC-205 može imati vrlo važnu ulogu. Ligandi DEC-205 u tkivu do danas nisu identifikovani. Među malobrojnim istraživanjima u ovom području je rad Lahoud i saradnika koji su pokazali da se CpG oligonukleotidi, dobro poznati molekularni obrasci patogena i selektivni agonisti TLR-9, vezuju za mišje i humane DEC-205 molekule (Lahoud i sar., 2012). Nedavno je, upotrebom DEC-205- Ig fuzionog proteina, potvrđeno da apoptotični timociti ispoljavaju ligande za mišji DEC-205 molekul (Shrimpton i sar., 2009).

Svi ovi nalazi su nas motivisali da istražimo moguću ulogu pacovskog DEC-205 molekula u interakciji timocita i TDC i procesima apoptoze timocita. Naši prvobitni rezultati su pokazali da pacovske TDC u kulturi stimulišu apoptozu timocita. Ovaj proces je povezan sa vezivanjem timocita za TDC i delimično je blokiran primenom anti-LFA-1 mAt (Tadic i sar., 1997). Ove rezultate su kasnije potvrdili i drugi autori (Aiello i sar., 2000) koji su pokazali da je NO koji proizvode TDC i timusne makrofage važan efektorski mehanizam u indukciji apoptoze pacovskih timocita.

Najpre je ispitan uticaj R-MC 17 mAt i anti-DEC-205 mAt (HD83) na formiranje rozeta nakon 30 min kultivacije timocita i TDC *in vitro*. Pokazano je da oba mAt statistički značajno stimulišu formiranje rozeta kako u poređenju sa kontrolom (sami timociti i TDC) tako i u poređenju sa IrAt. Takođe, zapažen je povećan procenat TDC koje formiraju rozete u prisustvu oba antitela.

Istovremeno je ispitan i efekat R-MC 17 mAt i HD83 mAt na prosečan broj timocita/rozeta u istim eksperimentalnim uslovima (nakon 30 min interakcije timocita i TDC *in vitro*). Pokazano je da oba mAt statistički značajno povećavaju i broj timocita/rozeta i u poređenju sa kontrolom (sami timociti i TDC) i u poređenju sa IrAt.

Poznato je da timociti u kulturi rapidno podležu procesu apoptoze. Ovaj proces je bio dodatno ubrzan u kokulturi timocita sa TDC. Dodatak R-MC 17 mAt i HD83 mAt u kokulturu timocita i TDC je statistički značajno stimulisao apoptozu kako u poređenju sa kontrolom (sami timociti i TDC) tako i u poređenju sa IrAt.

U cilju provere mogućnosti da je stimulacija apoptoze u prisustvu testiranih mAt povezana sa povećanom adhezivnošću apoptotičnih timocita za TDC, u daljim istraživanjima ispitana je apoptoza timocita u rozetama. Dobijeni rezultati su pokazali da je procenat apoptotičnih timocita u rozetama veći u poređenju sa apoptozom u

populaciji ukupnih timocita. Takođe, procenat apoptotičnih timocita u rozetama (u prisustvu R-MC 17 i HD83 mAt) je bio statistički značajno veći u poređenju sa procentom apoptotičnih timocita u rozetama u kontrolnim kulturama (bez dodatka primarnih mAt ili u prisustvu Ir mAt).

Ovi rezultati ukazuju na aktivnu ulogu TDC u indukciji apoptoze timocita, kao jednom od mehanizma koji se nalazi u osnovi negativne selekcije (Klein i sar., 2009). Međutim, povećanje u procentu apoptotičnih timocita u rozetama TDC/timociti može takođe da ukaže na ulogu TDC u preferencijalnom vezivanju apoptotičnih timocita. Ukoliko je hipoteza da DEC-205 na TDC vezuje apoptotične timocite tačna, na osnovu ranije publikovanih rezultata istraživanja interakcija kortikalnih TEC i timocita ili CD8<sup>+</sup> DC i timocita (Iyoda i sar., 2002, Small i Kraal, 2003), moglo bi se očekivati da anti-DEC-205 mAb inhibira ove procese. Naši rezultati, suprotno očekivanjima ukazuju da HD83 može da poveća adheziju timocita za TDC, uključujući apoptotične ćelije, nespecifično, modulacijom vezujućih domena molekula DEC-205. Poznato je da mišji i humani DEC-205 molekuli, pokazuju oko 80% homologije (Witmer-Pack i sar., 1995). Kao što je ranije istaknuto, ovi molekuli u vanćelijskom segmentu sadrže N-terminalni citsteinima bogat domen, fibronektin tip II domen i 10 domena koji su strukturno nalik CTLD (East i Isacke, 2002, Jiang i sar., 1995), takođe poznati kao domeni koji prepoznaju ugljene hidrate (CRD). U ovom momentu se ne zna da li su slični domeni prisutni u pacovskom DEC-205 i koji molekuli ili molekularni ostaci na pacovskim timocitima, posebno na apoptotičnim ćelijama, se vezuju za ove domene. Park i saradnici su pokazali da se HD83 mAt vezuje za epitop na CRD1 i CRD2 na DEC-205 molekulu (Park i sar., 2012). Takođe je moguće da HD83, nakon vezivanja za DEC-205 na TDC, modulira druge adhezivne molekule na ovim ćelijama. Naši prethodni rezultati u pacovskom sistemu su pokazali da brojna mAt, uključujući ona koja specifično prepoznaju molekule I i II klase MHC i CD45 molekul, stimulišu formiranje rozeta između TDC i timocita, LFA-1-zavisnim i LFA-1-nezavisanim mehanizmima (Colic i sar., 1996).

U zaključku ovog dela naših rezultata može se ukazati na moguću ulogu pacovskog DEC-205 u apoptozu timocita i stimulaciji interakcije TDC i timocita, što su procesi koji do sada nisu ispitivani u pacovskom sistemu. Takođe, iako preliminarni, ovi rezultati ukazuju na učešće DEC-205 u procesima selekcije timocita u timusu.

Šta su pokazala dosadašnja istraživanja funkcije DEC-205 molekula? Uloge CD205 u preuzimanju antigena, njegovoj **preradi i prezentaciji** su dobro okarakterisane. Kortikalne TEC, medularne TDC (CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) i subpopulacija perifernih DC (CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> slezinske DC/DC limfnog čvora, DC u koži/intersticijalne DC i Langerhansove ćelije) ispoljavaju visok nivo CD205 molekula (Heath i sar., 2004, Jiang i sar., 1995). Ispitivanje funkcije CD205 se u najvećoj meri oslanjalo na upotrebu mAt kao surogat liganada. Pokazano je da DC endocituju, prerađuju i prezentuju antigen sa velikom efikasnošću, kako u sklopu molekula II klase MHC, tako i u sklopu molekula I klase MHC (unakrsna prezentacija), kada antigen „vide“ kao konjugat sa anti-CD205 mAt (Bonifaz i sar., 2002, Mahnke i sar., 2000). Ovaj efekat je posledica sposobnosti CD205 molekula da učestvuje u recikliranju ćelijskog sadržaja, zahvaljujući prisustvu specifičnih motiva u unutarćelijskom delu CD205 molekula. Jedan od navedenih motiva (FSSVRY) koji sadrži tirozin je odgovoran za inicijalnu endocitozu koja se odvija obrazovanjem klatrinom-obloženih prostora. Istovremeno, kiseli EDE trijadni motivi omogućavaju usmeravanje CD205 prema kasnim endozomima/ranim lizozomima uvodeći na taj način endocitovani antigen u put prerade preko MHC II klase (Mahnke i sar., 2000).

Sposobnost CD205 da „isporuči“ antigen DC za prezentaciju u sklopu MHC II molekula i unakrsnu prezentaciju, u sklopu MHC I molekula, je privukla mnogo pažnje jer je ova sposobnost otvorila mogućnost korišćenja konjugata anti-CD205 mAt/antigen u terapijske svrhe. Međutim, kada je antigen *in vivo* „isporučen“ DC preko CD205, u odsustvu inflamacijskog stimulusa, indukovana je tolerancija prema antigenu (Bonifaz i sar., 2002, Hawiger i sar., 2001). Tolerancija je bila posledica indukcije delecije i anergije antigen-specifičnih T limfocita (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>) i indukcije subpopulacija regulatornih T limfocita (Mahnke, 2003). Zbog ovoga je CD205 postao zanimljiv kao mogući induktor tolerancije prema autoantigenima i ovo njegovo svojstvo je ispitivano na mišjim modelima u cilju sprečavanja razvoja dijabetesa (Bruder i sar., 2005). Nasuprot ovome, kada je istovremeno sa konjugatom anti-CD205/antigen dodavan i maturacioni stimulus, dolazilo je do razvoja dugotrajne imunosti kao posledica indukcije antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita (Bonifaz i sar., 2002, Bonifaz i sar., 2004, Hawiger i sar., 2001). Ova osobina je iskorišćena za uspešno vakcinisanje

protiv *gag* antigena HIV virusa i antigena tumora na animalnim modelima bolesti (Bozzacco i sar., 2007, Mahnke i sar., 2005, Trumpfheller i sar., 2006).

Svi ovi rezultati ukazali su da CD205 ima značajnu ulogu u preuzimanju antigena i njegovoj prezentaciji T limfocitima, kako u sklopu egzogenog tako i u sklopu endogenog puta prezentacije, sa posebno bitnom ulogom u unakrsnoj prezentaciji. Nalaz da CD205 u fiziološkim uslovima, u stanju mirovanja organizma, indukuje toleranciju ukazao je na njegovu značajnu ulogu u indukciji tolerancije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita prema sopstvenim antigenima kako na periferiji tako i u timusu (Jiang i sar., 1995). Polazeći od nalaza da CD205 može da „preusmeri“ antigene na put unakrsne prezentacije, svojstvo koje ispoljavaju DC (CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>) specijalizovane za unakrsnu prezentaciju antigena apoptotičnih ćelija, pretpostavilo se da CD205 može da deluje kao receptor za prepoznavanje i preuzimanje „sopstvenog“ u formi apoptotičnih ćelija (Heath i sar., 2004, Iyoda i sar., 2002, Liu i sar., 2002, Steinman i sar., 2000). Shrimpton i saradnici su konstruisali panel CD205-IgG fuzionih proteina koji su korišćeni za ispitivanje pretpostavke da CD205 vezuje apoptotične ćelije. Dobijeni rezultati su pokazali da CD205 molekul zaista prepoznaje ćelije koje podležu apoptozi i nekrozi. Takođe, ovi rezultati su pokazali da DEC205 prepoznaje i ligande na živim ćelijama, konkretno na kloniranoj liniji DC ćelija nazvanoj DC2.4 (Shrimpton i sar., 2009). Svi ovi rezultati zajedno su snažno ukazali na CD205 kao na molekul koji bi mogao da ima značajnu ulogu u preuzimanju i prezentaciji sopstvenih antigena u procesima indukcije centralne i periferne tolerancije T limfocita.

Svi ovi nalazi mogu biti od značaja za objašnjenje interesantnog fenomena da R-MC 17 mAt inhibira proliferaciju timocita stimulisanih sa R7.3 mAt koje je agonističko mAt za TCR pacova. Uticaj mAt R-MC 17 na potencijal kultivisanih TDC da stimulišu proliferaciju timocita ispitivan je u testovima proliferacije singenih timocita i alogenih CD4<sup>+</sup> T limfocita (izolovanih iz limfnog čvora DA pacova), pri čemu je pokazano da prisustvo R-MC 17 mAt ne utiče na proliferaciju singenih timocita indukovanu delovanjem kultivisanih TDC. Međutim, u ovom model sistemu R-MC 17 mAt je značajno inhibiralo proliferaciju timocita u prisustvu R7.3 u poređenju sa IrAt. Inhibitorski uticaj R-MC 17 mAt na TDC-indukovanu proliferaciju potvrđen je i u testovima proliferacije alogenih CD4<sup>+</sup> T limfocita limfnih čvorova, kako u nestimulisanim kulturama, tako i u kulturama u kojima su T limfociti dodatno

stimulisani delovanjem R7.3 mAt. Modulacija TDC sa GM-CSF-om nije bitnije menjala sposobnost R-MC 17 mAt da inhibira proliferaciju timocita u prisustvu R7.3 mAt.

Model proliferacije timocita u kulturi u prisustvu TDC i R7.3 mAt imitira fiziološke procese koji se dešavaju u timusu tokom selekcije timocita pri čemu TDC mogu amplifikovati proliferativni odgovor timocita u procesima selekcije ili onih koji su prošli negativnu selekciju. Na koji način DEC-205 amplifikuje ove procese nije poznato ali se funkcija ovog molekula uklapa u koncept multiplih receptor/ligand interakcija u timusu tokom procesa proliferacije, diferencijacije i selekcije.

Uloga R-MC 17 antigena u intratimusnom diferentovanju T limfocita procenjivana je na modelu intratimusnog ubrizgavanja mAt. Određivanjem ukupne celularnosti timusa pet dana nakon tretmana pokazano je da R-MC 17 mAt statistički značajno smanjuje broj ćelija u timusu u poređenju sa IrAt.

Poređenjem relativnih vrednosti DP, DN i SP subpopulacija timocita između eksperimentalne i kontrolnih grupa životinja zapaženo je da je u timusu u koji je ubrizgano R-MC 17 mAt procenat DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita bio statistički značajno niži, a procenat SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita statistički značajno viši u poređenju sa kontrolama. Takođe, procenti DN CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> i SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> timocita su bili viši u odnosu na kontrole ali statistički značajno viši u poređenju sa kontrolnim IrAt.

Analizom apsolutnih vrednosti subpopulacija timocita zabeleženi su nešto drugačiji rezultati. U grupi životinja kojima je intratimusno aplikovano R-MC 17 mAt detektovan je statistički značajno niži apsolutni broj DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita, skoro dva puta manji u poređenju sa kontrolama. Ovaj nalaz je bio u saglasnosti sa smanjenjem relativnog broja DP populacije timocita. Ukupan broj DN se statistički značajno nije menjao, ukupan broj SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> je bio statistički značajno manji a, ukupan broj SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> timocita statistički značajno veći u odnosu na IrAt.

Ovi nalazi ukazuju da R-MC 17 mAt značajno modulira procese diferencijacije timocita dovodeći do inhibicije razvoja DP i SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> timocita i/ili do indukcije njihove apoptoze. Ostaje otvoreno pitanje da li ovo antitelo stimuliše diferencijaciju SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> timocita ili se radi o smanjenoj migraciji ove subpopulacije ćelija iz timusa.

U cilju provere da li su dobijeni rezultati posledica pro-apoptotskog delovanja R-MC 17 mAt analizirana je apoptoza timocita sve tri grupe tretiranih životinja. Dobijeni

rezultati, su pokazali da R-MC 17 mAt statistički značajno povećava apoptozu timocita u poređenju sa kontrolama, što je u saglasnosti sa eksperimentima koji su dobijeni *in vitro*, a potencijalni mehanizmi ovog fenomena su već ranije komentarisani.

Osim uticaja R-MC 17 mAt na procese diferentovanja timocita analiziran je i njegov uticaj na procese intratimusnog sazrevanja T limfocita. Analizirana je ekspresija CD5 i TCR molekula za koje je pokazano da im se intezitet ispoljavanja povećava tokom sazrevanja i selekcije. Dobijeni rezultati su pokazali postojanje statistički značajne razlike (veći procenat), u relativnom broju CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> ćelija u grupi životinja kojoj je aplikovano R-MC 17 mAt u poređenju sa kontrolnim grupama životinja (koje su tretirane PBS i IrAt). Međutim, analizom ukupnog broja CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> ćelija nije nađena statistički značajna razlika između eksperimentalne grupe (životinje kojima je ubrizgano R-MC 17 mAt) i kontrolnih grupa životinja. Ovi nalazi su u saglasnosti sa promenama u ukupnom broju SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> i SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (koji predstavljaju ukupne CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> ćelije). Naime, povećanje broja SP CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, a smanjenje broja SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> bitnije ne menja broj CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> timocita. Sa druge strane, povećanje relativnog broja CD5<sup>+</sup>TCR<sup>jak<sup>o</sup>+</sup> timocita se može tumačiti značajnijim smanjenjem procenta DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocita, a što je u saglasnosti sa većom rezistencijom zrelih timocita na pro-apoptotske stimuluse R-MC 17 mAt u poređenju sa nezrelim, kortikalnim timocitima.

U zaključku, naši rezultati po prvi put opisuju potencijalnu funkciju R-MC 17 mAt u timusu koji je bitan za interakcije sa kortikalnim TEC i TDC. Dominantan efekat je povezan sa indukcijom apoptoze nezrelih timocita i modulacije proliferativne aktivnosti zrelih timocita. Opisani mehanizmi mogu biti povezani sa procesima intratimusne diferencijacije timocita i prezentacije autoantigena u timusu od strane kortikalnih TEC i medularnih TDC, a što u krajnjem ishodu ima uticaj na procese selekcije (delecije autoreaktivnih klonova timocita). Nedostatak ovog modela je u tome što R-MC 17 mAt (slično kao i jedino anti-DEC 205 mAt u pacova, HD83) ima agonističko delovanje. Buduća antitela sa antagonističkim (blokirajućim) delovanjem mogu pomoći u boljem razumevanju opisanih procesa.



## ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći osnovni **zaključci**:

1. R-MC 17 mAt detektuje antigen od oko 205 kDa u timusu pacova. Na osnovu poređenja biohemijskih karakteristika anti-DEC 205 mAt (HD83) i unakrsne imunoprecipitacije antigena iz lizata timusa pacova pomoću ova dva mAt zaključeno je da R-MC 17 mAt detektuje pacovski DEC-205 molekul.
2. R-MC 17 antigen je jako ispoljen na kortikalnim TEC, medularnim TDC, DC u parakorteksu i interfolikularnim zonama limfnog čvora i DC u periarteriolarnom limfnom omotaču slezine. Slaba imunoreaktivnost je detektovana na limfocitima u folikulima limfnog čvora i slezine i makrofagama u crvenoj pulpi slezine.
3. Ekspresija DEC-205 molekula je detektovana na oko 40% ćelija R-TNC.1 linije, sa karakteristikama ćelija „dadilja“. R-MC 17 mAt podstiče vezivanje i emperipoezu timocita od strane R-TNC.1 ćelija.
4. Ekspresija DEC-205 molekula, koga prepoznanje R-MC 17 mAt, je podjednaka na obe subpopulacije TDC pacova ( $CD11b^+$  i  $CD11b^-$ ), i ne menja se bitnije pod uticajem GM-CSF-a.
5. Oba anti-DEC 205 mAt (R-MC 17 mAt i HD83 mAt) stimulišu apoptozu timocita u kokulturi sa TDC i ovaj proces je povezan sa povećanim vezivanjem timocita za TDC.
6. R-MC 17 mAt inhibira proliferaciju singenih timocita i alogenih T limfocita pacova u kokulturi sa TDC u prisustvu anti-TCR (R7.3) mAt.
7. Intratimusna aplikacija R-MC 17 mAt dovodi do smanjenja celularnosti timusa pacova što je povezano sa indukcijom apoptoze timocita.
8. Fenotipska analiza subpopulacija timocita nakon intratimusne aplikacije R-MC 17 mAt pokazuje smanjenje ukupnog broja  $CD4^+CD8^+$  i  $CD4^+CD8^-$ , a povećanje ukupnog broja  $CD4^-CD8^+$  timocita, dok je ukupan broj zrelih  $CD5^+TCR^{jako+}$  timocita nepromenjen.

9. Sveukupno, dobijeni rezultati pokazuju da R-MC 17 mAt modifikuje interakcije timocita i timusnih DEC-205<sup>+</sup> ćelijskih komponenti, što može biti povezano sa ulogom ovog molekula u procesima intratimusne diferencijacije i selekcije T limfocita.

## LITERATURA

Abramson J, Giraud M, Benoist C, Mathis D. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 2010; 140:123-135.

Aiello S, Noris M, Piccinini G, Tomasoni S, Casiraghi F, Bonazzola S, Mister M, Sayegh MH, Remuzzi G. Thymic dendritic cells express inducible nitric oxide synthase and generate nitric oxide in response to self- and alloantigens. *Journal of immunology* 2000; 164:4649-4658.

Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL. Lymphoid precursors. *Current opinion in immunology* 2000; 12:144-150.

Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279:15396-15401.

Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, Chieco-Bianchi L. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature Medicine* 1995; 1:1279-1283.

Anderson G, Hare KJ, Platt N, Jenkinson EJ. Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection. *European journal of immunology* 1997; 27:1838-1842.

Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annual review of immunology* 1996; 14:73-99.

Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends in immunology* 2012; 33:256-263.

Antic Stankovic J, Vucevic D, Majstorovic I, Vasilijic S, Colic M. The role of rat Crry, a complement regulatory protein, in proliferation of thymocytes. *Life sciences* 2004; 75:3053-3062.

Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunology today* 1997; 18:350-361.

Arsenovic-Ranin N, Vucevic D, Okada N, Dimitrijevic M, Colic M. A monoclonal antibody to the rat Crry/p65 antigen, a complement regulatory membrane protein, stimulates adhesion and proliferation of thymocytes. *Immunology* 2000; 100:334-344.

Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N. Crucial Contribution of Thymic Sirp + Conventional Dendritic Cells to Central Tolerance against Blood-Borne Antigens in a CCR2-Dependent Manner. *The Journal of Immunology* 2009; 183:3053-3063.

Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, Seilhamer JJ. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *The Journal of experimental medicine* 1995; 181:877-887.

Benoist C, Mathis D. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 1989; 58:1027-1033.

- Benoist C, Mathis D. T lymphocyte differentiation and biology. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999, 367-409.
- Bevan MJ. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunology today* 1984; 5:128-130.
- Bluestone JA, Khattry R, Van Severter GA. Accessory molecules. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999, 449-478.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196:1627-1638.
- Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine* 2004; 199:815-824.
- Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U, Et Al. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *The Journal of experimental medicine* 1995; 181:2213-2220.
- Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AG, Ladyman HM, Ritter MA, Hugo P. The thymic microenvironment. *Immunology today* 1993; 14:445-459.
- Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, Nussenzweig MC, Piperno AG, Steinman RM. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104:1289-1294.
- Brandle D, Muller C, Rulicke T, Hengartner H, Pircher H. Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89:9529-9533.
- Brekelmans P, Van Ewijk W. Phenotypic characterization of murine thymic microenvironments. *Seminars in immunology* 1990; 2:13-24.
- Bruder D, Westendorf AM, Hansen W, Prettin S, Gruber AD, Qian Y, Von Boehmer H, Mahnke K, Buer J. On the edge of autoimmunity: T-cell stimulation by steady-state dendritic cells prevents autoimmune diabetes. *Diabetes* 2005; 54:3395-3401.
- Brunet JF, Hirsch MR, Naquet P, Uberla K, Diamantstein T, Lipinski M, Goridis C. Developmentally regulated expression of the neural cell adhesion molecule (NCAM) by mouse thymocytes. *European journal of immunology* 1989; 19:837-841.
- Chidgey AP, Boyd RL. Thymic stromal cells and positive selection. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2001; 109:481-492.
- Čolić M. Monoklonska antitela u izučavanju interakcija između timocita i epitelnih ćelija timusa. *Vojnosanitetski pregled* 1997; 54:45-55.

- Colic M, Gasic S, Stojanovic N, Popovic L, Dujic A. Phenotypic and ultrastructural characterization of an epithelial cell line established from rat thymic cultures. *Immunology* 1992; 77:201-207.
- Colic M, Gasic S, Vucevic D, Pavicic L, Popovic P, Jandric D, Medic-Mijacevic L, Rakic L. Modulatory effect of 7-thia-8-oxoguanosine on proliferation of rat thymocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *International journal of immunopharmacology* 2000; 22:203-212.
- Colic M, Ilic V, Pavlovic MD, Tamatani T, Miyasaka M. Mechanisms involved in the binding of thymocytes to rat thymic dendritic cells. *Dev Immunol* 1996; 5:37-51.
- Colic M, Jovanovic S, Mitrovic S, Dujic A. Immunohistochemical identification of six cytokeratin-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. *Thymus* 1989; 13:175-185.
- Colic M, Jovanovic S, Vasiljevski M, Dujic A. Ontogeny of rat thymic epithelium defined by monoclonal anticytokeratin antibodies. *Dev Immunol* 1990; 1:67-75.
- Colic M, Matanovic D, Hegedis L, Dujic A. Immunohistochemical characterization of rat thymic non-lymphoid cells. I. Epithelial and mesenchymal components defined by monoclonal antibodies. *Immunology* 1988; 65:277-284.
- Colic M, Vucevic D, Miyasaka M, Tamatani T, Pavlovic MD, Dujic A. Adhesion molecules involved in the binding and subsequent engulfment of thymocytes by a rat thymic epithelial cell line. *Immunology* 1994; 83:449-456.
- Cordes U, Pedersen M, Bastholm L, Nielsen M, Werdelin O. Murine thymic nurse cells express ICAM-1 on caveolar and vacuolar membranes. *Scandinavian journal of immunology* 1997; 46:344-348.
- Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *The American journal of anatomy* 1980; 157:227-263.
- Couture C, Patel PC, Potworowski EF. A novel thymic epithelial adhesion molecule. *European journal of immunology* 1990; 20:2769-2773.
- Daley SR, Hu DY, Goodnow CC. Helios marks strongly autoreactive CD4+ T cells in two major waves of thymic deletion distinguished by induction of PD-1 or NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* 2013; 210:269-285.
- Dalloul AH, Fourcade C, Debre P, Mossalayi MD. Thymic epithelial cell-derived supernatants sustain the maturation of human prothymocytes: involvement of interleukin 1 and CD23. *European journal of immunology* 1991; 21:2633-2636.
- Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood* 1999; 93:974-990.
- Dautigny N, Le Champion A, Lucas B. Timing and casting for actors of thymic negative selection. *Journal of immunology* 1999; 162:1294-1302.
- De Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *The Journal of experimental medicine* 1991; 174:253-267.

- De Souza LRM, Savino W. Modulation of Cytokeratin Expression in The Hamster Thymus: Evidence For a Plasticity of The Thymic Epithelium. *Developmental Immunology* 1993; 3:137-146.
- De Waal EJ, Rademakers LH. Heterogeneity of epithelial cells in the rat thymus. *Microscopy research and technique* 1997; 38:227-236.
- Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *The Journal of experimental medicine* 2005; 202:33-45.
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology* 2001; 2:1032-1039.
- Di Santo JP, Radtke F, Rodewald HR. To be or not to be a pro-T? *Current opinion in immunology* 2000; 12:159-165.
- Dzhagalov I, Phee H. How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012; 69:663-682.
- East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochimica et biophysica acta* 2002; 1572:364-386.
- Egerton M, Scollay R, Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87:2579-2582.
- Ehrlich LI, Oh DY, Weissman IL, Lewis RS. Differential contribution of chemotaxis and substrate restriction to segregation of immature and mature thymocytes. *Immunity* 2009; 31:986-998.
- Ezaki T, Uehara Y. Thymic Nurse Cells Forming a Dynamic Microenvironment in Spontaneous Thymoma BUF/Mna Rats. *Archives of Histology and Cytology* 1997; 60:39-51.
- Fehling HJ, Von Boehmer H. Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Current opinion in immunology* 1997; 9:263-275.
- Fiete DJ, Beranek MC, Baenziger JU. A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO<sub>4</sub> binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95:2089-2093.
- Fine JS, Kruisbeek AM. The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *Journal of immunology* 1991; 147:2852-2859.
- Finkel TH, Kubo RT, Cambier JC. T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunology today* 1991; 12:79-85.
- Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Critical reviews in immunology* 2005; 25:405-428.
- Galy AH, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *Journal of immunology* 1992; 149:775-782.

- Giunta M. A novel integrin involved in thymocyte-thymic epithelial cell interactions. *Journal of Experimental Medicine* 1991; 173:1537-1548.
- Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999; 402:255-262.
- Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, Bogunovic M, Gautier EL, Miller J, Leboeuf M, Lu G, Aloman C, Brown BD, Pollard JW, Xiong H, Randolph GJ, Chipuk JE, Frenette PS, Merad M. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 2012; 36:1031-1046.
- Guyden JC, Pezzano M. Thymic nurse cells: a microenvironment for thymocyte development and selection. *International review of cytology* 2003; 223:1-37.
- Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, Nguyen L, Ghodsi A, Adler S, Butcher EC. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 2012; 36:438-450.
- Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nature immunology* 2008; 9:1253-1260.
- Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. Specialisation of thymic epithelial cells for positive selection of CD4+8+ thymocytes. *Cellular and molecular biology* 2001; 47:119-127.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2001; 194:769-779.
- Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological reviews* 2004; 199:9-26.
- Imami N, Ladyman HM, Spanopoulou E, Ritter MA. A novel adhesion molecule in the murine thymic microenvironment: functional and biochemical analysis. *Dev Immunol* 1992; 2:161-173.
- Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman RM, Inaba K. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2002; 195:1289-1302.
- Jameson SC, Bevan MJ. T-cell selection. *Current opinion in immunology* 1998; 10:214-219.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375:151-155.
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 2012; 12:557-569.

- Kampinga J, Berges S, Boyd RL, Brekelmans P, Colic M, Van Ewijk W, Kendall MD, Ladyman H, Nieuwenhuis P, Ritter MA, Et Al. Thymic epithelial antibodies: immunohistological analysis and introduction of nomenclature. *Thymus* 1989; 13:165-173.
- Kampinga J, Kroese FGM, Duijvestijn AM, Murawska MB, Rol GH, Nieuwenhuis P. The rat thymus microenvironment: subsets of thymic epithelial cells defined by monoclonal antibodies. *Transplantation Proc* 1987; 19:3171-3174.
- Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, Munster D, MacDonald KP, Hart DN. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol* 2006; 18:857-869.
- Kendall MD. The syncytial nature of epithelial cells in the thymic cortex. *Journal of anatomy* 1986; 147:95-106.
- Kina T, Majumdar AS, Heimfeld S, Kaneshima H, Holzmann B, Katsura Y, Weissman IL. Identification of a 107-kD glycoprotein that mediates adhesion between stromal cells and hemolymphoid cells. *The Journal of experimental medicine* 1991; 173:373-381.
- Kinebuchi M, Ide T, Lupin D, Tamatani T, Miyasaka M, Matsuura A, Nagai Y, Kikuchi K, Uede T. A novel cell surface antigen involved in thymocyte and thymic epithelial cell adhesion. *Journal of immunology* 1991; 146:3721-3728.
- Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature reviews. Immunology* 2009; 9:833-844.
- Klein L, Kyewski B. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Current opinion in immunology* 2000; 12:179-186.
- Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews. Immunology* 2014; 14:377-391.
- Kleindienst P, Chretien I, Winkler T, Brocker T. Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo. *Blood* 2000; 95:2610-2616.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-497.
- Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Forster R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 2010; 115:1906-1912.
- Kurobe H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 2006; 24:165-177.
- Kyewski BA. Thymic nurse cells: possible sites of T-cell selection. *Immunology today* 1986; 7:374-379.
- Lackmann M, Boyd AW. Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Science signaling* 2008; 1:re2.



- Ladi E, Schwickert TA, Chtanova T, Chen Y, Herzmark P, Yin X, Aaron H, Chan SW, Lipp M, Roysam B, Robey EA. Thymocyte-dendritic cell interactions near sources of CCR7 ligands in the thymic cortex. *Journal of immunology* 2008; 181:7014-7023.
- Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, Lee CN, O'keeffe M, Sullivan LC, Brooks AG, Berry R, Rossjohn J, Mintern JD, Vega-Ramos J, Villadangos JA, Nicola NA, Nussenzweig MC, Stacey KJ, Shortman K, Heath WR, Caminschi I. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109:16270-16275.
- Lei Y, Ripen AM, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker LT, Bosl MR, Hollander GA, Hayashi Y, Malefyt Rde W, Nitta T, Takahama Y. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *The Journal of experimental medicine* 2011; 208:383-394.
- Lepesant H, Reggio H, Pierres M, Naquet P. Mouse thymic epithelial cell lines interact with and select a CD3lowCD4+CD8+ thymocyte subset through an LFA-1-dependent adhesion--de-adhesion mechanism. *Int Immunol* 1990; 2:1021-1032.
- Li J, Park J, Foss D, Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *The Journal of experimental medicine* 2009; 206:607-622.
- Li Y, Pezzano M, Philp D, Reid V, Guyden J. Thymic nurse cells exclusively bind and internalize CD4+CD8+ thymocytes. *Cellular immunology* 1992; 140:495-506.
- Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196:1091-1097.
- Mahnke K. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 2003; 101:4862-4869.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology* 2000; 151:673-684.
- Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer research* 2005; 65:7007-7012.
- Marrack P, Ignatowicz L, Kappler JW, Boymel J, Freed JH. Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *The Journal of experimental medicine* 1993; 178:2173-2183.
- Marrack P, Kappler J. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunology today* 1988; 9:308-315.
- Martinez-Caceres E, Ruggiero G, Spits H, Juan M, Barcelo J, Vives J, Martorell J, Vinas O. Stimulation through CD50 (ICAM-3) induces both activation and programmed cell death of human thymocytes. *Tissue antigens* 1996; 48:626-635.

- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427:355-360.
- Mccaughtry TM, Wilken MS, Hogquist KA. Thymic emigration revisited. *The Journal of experimental medicine* 2007; 204:2513-2520.
- Mckay PF, Imami N, Johns M, Taylor-Fishwick DA, Sedibane LM, Totty NF, Hsuan JJ, Palmer DB, George AJ, Foxwell BM, Ritter MA. The gp200-MR6 molecule which is functionally associated with the IL-4 receptor modulates B cell phenotype and is a novel member of the human macrophage mannose receptor family. *European journal of immunology* 1998; 28:4071-4083.
- Merkenschlager M. Tracing interactions of thymocytes with individual stromal cell partners. *European journal of immunology* 1996; 26:892-896.
- Merkenschlager M, Benoist C, Mathis D. Evidence for a single-niche model of positive selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:11694-11698.
- Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 2014; 40:642-656.
- Milicevic Z, Milicevic NM. Ultrastructure of different types of thymic epithelial cells in normal and cyclosporin-A-treated rats. *Anatomy and embryology* 1997; 196:171-183.
- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Forster R. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *The Journal of experimental medicine* 2004; 200:481-491.
- Miyazaki T, Suzuki G, Yamamura K-I. The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance. *International Immunology* 1993; 5:1023-1033.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.
- Munoz JJ, Alonso-C LM, Sacedon R, Crompton T, Vicente A, Jimenez E, Varas A, Zapata AG. Expression and Function of the Eph A Receptors and Their Ligands Ephrins A in the Rat Thymus. *The Journal of Immunology* 2002; 169:177-184.
- Nabarra B, Andrianarison I. Ultrastructural studies of thymic reticulum: I. Epithelial [corrected] component. *Thymus* 1987; 9:95-121.
- Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 1998; 280:450-453.
- Nedjic J, Aichinger M, Mizushima N, Klein L. Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Current opinion in immunology* 2009; 21:92-97.
- Nikolic-Zugic J. Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of alpha beta T cells. *Immunology today* 1991; 12:65-70.

- Nikolić-Žugić J. Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of TcR[alpha][beta] thymocytes. *In: Nikolić-Žugić, J (ed.) Intrathymic T-cell development.* Austin, Tex. : R.G. Landes Co., 1994a, 28-46.
- Nikolić-Žugić J. A relationship between positive and negative selection. *In: Nikolić-Žugić, J (ed.) Intrathymic T-cell development.* Austin, Tex. : R.G. Landes Co., 1994b, 115-126.
- Nonoyama S, Nakayama M, Shiohara T, Yata J. Only dull CD3+ thymocytes bind to thymic epithelial cells. The binding is elicited by both CD2/LFA-3 and LFA-1/ICAM-1 interactions. *European journal of immunology* 1989; 19:1631-1635.
- Norment AM, Bogatzki LY, Gantner BN, Bevan MJ. Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *Journal of immunology* 2000; 164:639-648.
- Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, Gahmberg CG. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *European journal of immunology* 1991; 21:2629-2632.
- Oliveira-Dos-Santos AJ, Rieker-Geley T, Recheis H, Wick G. Murine thymic nurse cells and rosettes: analysis of adhesion molecule expression using confocal microscopy and a simplified enrichment method. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1997; 45:1293-1297.
- Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature reviews. Immunology* 2003; 3:383-391.
- Park CG, Rodriguez A, Ueta H, Lee H, Pack M, Matsuno K, Steinman RM. Generation of anti-human DEC205/CD205 monoclonal antibodies that recognize epitopes conserved in different mammals. *Journal of immunological methods* 2012; 377:15-22.
- Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008; 133:38-52.
- Patarroyo M. Leukocyte adhesion in host defense and tissue injury. *Clinical immunology and immunopathology* 1991; 60:333-348.
- Pavlovic MD, Colic M, Vucevic D, Dujic A. Two novel monoclonal antibodies reactive with different components of the rat thymic epithelium. *Thymus* 1993; 21:235-246.
- Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* 2007; 25:649-679.
- Pezzano M, Li Y, Philp D, Omene C, Cantey M, Saunders G, Guyden JC. Thymic nurse cell rescue of early CD4+CD8+ thymocytes from apoptosis. *Cellular and molecular biology* 1995; 41:1099-1111.
- Pezzano M, Philp D, Stephenson S, Li Y, Reid V, Maitta R, Guyden JC. Positive selection by thymic nurse cells requires IL-1 beta and is associated with an increased Bcl-2 expression. *Cellular immunology* 1996; 169:174-184.
- Philp D, Pezzano M, Li Y, Omene C, Boto W, Guyden J. The binding, internalization, and release of thymocytes by thymic nurse cells. *Cellular immunology* 1993; 148:301-315.

- Picker LJ, Siegelman MH. Lymphoid tissues and organs. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999, 479–531.
- Pircher H, Brduscha K, Steinhoff U, Kasai M, Mizuochi T, Zinkernagel RM, Hengartner H, Kyewski B, Müller K-P. Tolerance induction by clonal deletion of CD4+8+ thymocytes in vitro does not require dedicated antigen-presenting cells. *European journal of immunology* 1993; 23:669-674.
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *Journal of immunology* 2003; 171:4521-4527.
- Pobezinsky LA, Angelov GS, Tai X, Jeurling S, Van Laethem F, Feigenbaum L, Park JH, Singer A. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nature immunology* 2012; 13:569-578.
- Proietto AI, Lahoud MH, Wu L. Distinct functional capacities of mouse thymic and splenic dendritic cell populations. *Immunology and cell biology* 2008; 86:700-708.
- Ritter MA, Boyd RL. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunology today* 1993; 14:462-469.
- Ritter MA, Crispe IN. The thymus. Oxford, IRL Press at Oxford University Press, 1992.
- Robbins SH, Walzer T, Dembele D, Thibault C, Defays A, Bessou G, Xu H, Vivier E, Sellars M, Pierre P, Sharp FR, Chan S, Kastner P, Dalod M. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome biology* 2008; 9:R17.
- Robey E, Fowlkes BJ. The alpha beta versus gamma delta T-cell lineage choice. *Current opinion in immunology* 1998; 10:181-187.
- Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L, Ziltener HJ. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nature immunology* 2005; 6:626-634.
- Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* 1997; 89:2461-2471.
- Salomon DR, Mojcik CF, Chang AC, Wadsworth S, Adams DH, Coligan JE, Shevach EM. Constitutive activation of integrin alpha 4 beta 1 defines a unique stage of human thymocyte development. *The Journal of experimental medicine* 1994; 179:1573-1584.
- Savino W, Dalmau SR, Dealmeida VC. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol* 2000; 7:279-291.
- Savino W, Dardenne M. Developmental studies on expression of monoclonal antibody-defined cytokeratins by thymic epithelial cells from normal and autoimmune mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1988; 36:1123-1129.
- Savino W, Villa-Verde DM, Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunology today* 1993; 14:158-161.
- Sawada M, Nagamine J, Takeda K, Utsumi K, Kosugi A, Tatsumi Y, Hamaoka T, Miyake K, Nakajima K, Watanabe T, Et Al. Expression of VLA-4 on thymocytes.

Maturation stage-associated transition and its correlation with their capacity to adhere to thymic stromal cells. *Journal of immunology* 1992; 149:3517-3524.

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in biophysics and molecular biology* 1999; 71:435-478.

Schuurman HJ, Kuper CF, Kendall MD. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Microscopy research and technique* 1997; 38:216-226.

Schwartz RH. Immunological Tolerance. *In: Paul, WE (ed.) Fundamental immunology*. 3rd ed ed. New York: Raven Press, 1993, 677-731.

Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, Von Boehmer H, Von Andrian UH. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103:7006-7011.

Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS. Selection of the T cell repertoire. *Annual review of immunology* 1999; 17:829-874.

Shavach EM. Accessory Molecules. *In: Paul, WE (ed.) Fundamental immunology*. 3rd ed ed. New York: Raven Press, 1993, 531-575.

Shaw S, Luce GE. The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *Journal of immunology* 1987; 139:1037-1045.

Shiomi A, Usui T. Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2015; 2015:1-13.

Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Seminars in immunology* 1990; 2:3-12.

Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular immunology* 2009; 46:1229-1239.

Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature reviews. Immunology* 2008; 8:788-801.

Singer KH, Denning SM, Whichard LP, Haynes BF. Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *Journal of immunology* 1990; 144:2931-2939.

Small M, Kraal G. In vitro evidence for participation of DEC-205 expressed by thymic cortical epithelial cells in clearance of apoptotic thymocytes. *Int Immunol* 2003; 15:197-203.

Spain LM, Berg LJ. Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *The Journal of experimental medicine* 1992; 176:213-223.

Sprent J. T Lymphocytes and the Thymus. *In: Paul, WE (ed.) Fundamental immunology*. 3rd ed ed. New York: Raven Press, 1993, 75-109.

Sprent J, Gao EK, Kanagawa O, Webb SR. T-cell selection in the thymus. *Princess Takamatsu symposia* 1988; 19:127-136.

- Sprent J, Webb SR. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Advances in immunology* 1987; 41:39-133.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346:425-434.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 2003; 21:139-176.
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine* 2000; 191:411-416.
- Stritesky GL, Xing Y, Erickson JR, Kalekar LA, Wang X, Mueller DL, Jameson SC, Hogquist KA. Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110:4679-4684.
- Tadic V, Colic M, Miyasaka M, Ilic V. 7-LFA-1/ICAM-1 adhesion pathway is involved in both apoptosis and proliferation of thymocytes induced by thymic dendritic cells. *In: Lukic, M, Colic, M, Mostarica-Stojkovic, M & Cuperlovic, K (eds.) Immunoregulation in health and disease: experimental and clinical aspects.* London: Academic Press, 1997, 77-89.
- Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews. Immunology* 2006; 6:127-135.
- Taylor ME, Bezouska K, Drickamer K. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267:1719-1726.
- Tough DF, Sprent J. Thymic emigration - a reply. *Immunology today* 1995; 16:273-274.
- Tramont PC, Tosello-Tramont AC, Shen Y, Duley AK, Sutherland AE, Bender TP, Littman DR, Ravichandran KS. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nature immunology* 2010; 11:162-170.
- Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, Huang Y, Schlesinger SJ, Park CG, Nussenzweig MC, Granelli-Piperno A, Steinman RM. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203:607-617.
- Ushiki T. A scanning electron-microscopic study of the rat thymus with special reference to cell types and migration of lymphocytes into the general circulation. *Cell Tissue Res* 1986; 244:285-298.
- Utsumi K, Sawada M, Narumiya S, Nagamine J, Sakata T, Iwagami S, Kita Y, Teraoka H, Hirano H, Ogata M, Et Al. Adhesion of immature thymocytes to thymic stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88:5685-5689.
- Van De Laar L, Coffey PJ, Woltman AM. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 2012; 119:3383-3393.

- Van De Wijngaert FP, Kendall MD, Schuurman HJ, Rademakers LH, Kater L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1984; 237:227-237.
- Van Ewijk W. Cell surface topography of thymic microenvironments. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1988; 59:579-590.
- Van Ewijk W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annual review of immunology* 1991; 9:591-615.
- Van Ewijk W, Hollander G, Terhorst C, Wang B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 2000; 127:1583-1591.
- Van Meerwijk JP, Macdonald HR. In vivo T-lymphocyte tolerance in the absence of thymic clonal deletion mediated by hematopoietic cells. *Blood* 1999; 93:3856-3862.
- Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 2001; 97:1733-1741.
- Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 1997; 7:291-301.
- Villa-Verde DM, Calado TC, Ocampo JS, Silva-Monteiro E, Savino W. The conveyor belt hypothesis for thymocyte migration: participation of adhesion and de-adhesion molecules. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:569-572.
- Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008; 29:352-361.
- Volkman A, Zal T, Stockinger B. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *Journal of immunology* 1997; 158:693-706.
- Von Boehmer H, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J, Azogui O. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Current opinion in immunology* 1999; 11:135-142.
- Von Gaudecker B, Steinmann GG, Hansmann ML, Harpprecht J, Milicevic NM, Müller-Hermelink HK. Immunohistochemical characterization of the thymic microenvironment. *Cell and Tissue Research* 1986; 244:403-412.
- Vremec D, Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of immunology* 1997; 159:565-573.
- Vrisekoop N, Monteiro JP, Mandl JN, Germain RN. Revisiting thymic positive selection and the mature T cell repertoire for antigen. *Immunity* 2014; 41:181-190.
- Vucevic D, Colic M, Popovic P, Gasic S. Different roles of a rat cortical thymic epithelial cell line in vitro on thymocytes and thymocyte hybridoma cells: phagocytosis, induction of apoptosis, nursing and growth promoting activities. *Dev Immunol* 2002; 9:63-72.

- Vukmanovic S. The molecular jury: deciding whether immature thymocytes should live or die. *The Journal of experimental medicine* 1996; 184:305-309.
- Watt SM, Thomas JA, Edwards AJ, Murdoch SJ, Horton MA. Adhesion receptors are differentially expressed on developing thymocytes and epithelium in human thymus. *Experimental hematology* 1992; 20:1101-1111.
- Wiest DL, Berger MA, Carleton M. Control of early thymocyte development by the pre-T cell receptor complex: A receptor without a ligand? *Seminars in immunology* 1999; 11:251-262.
- Wiley EL, Nosal JM, Freeman RG. Immunohistochemical demonstration of H antigen, peanut agglutinin receptor, and Saphora japonica receptor expression in infant thymuses and thymic neoplasias. *American journal of clinical pathology* 1990; 93:44-48.
- Wirnsberger G, Mair F, Klein L. Regulatory T cell differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106:10278-10283.
- Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, Inaba K, Steinman RM. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cellular immunology* 1995; 163:157-162.
- Witt CM, Raychaudhuri S, Schaefer B, Chakraborty AK, Robey EA. Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS biology* 2005; 3:e160.
- Woods M, Shimizu Y. Signaling networks regulating  $\beta 1$  integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to extracellular matrix. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 69:874-880.
- Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Seminars in immunology* 2005; 17:304-312.
- Wurbel MA, Malissen B, Campbell JJ. Complex regulation of CCR9 at multiple discrete stages of T cell development. *European journal of immunology* 2006; 36:73-81.
- Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, Victorero G, Freeman T, Wooding P, Miazek A, Mattei MG, Malissen M, Jordan BR, Malissen B, Carrier A, Naquet P. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *European journal of immunology* 2000; 30:262-271.
- Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Fuchs C, Germain RN. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 2000; 404:506-510.
- Yin X, Ladi E, Chan SW, Li O, Killeen N, Kappes DJ, Robey EA. CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *Journal of immunology* 2007; 179:7358-7364.
- Zhao T, He C, Su M, West CA, Swanson SJ, Young AJ, Mentzer SJ. Cell adhesion molecule expression in the sheep thymus. *Developmental and comparative immunology* 2001; 25:519-530.



Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 2010; 115:1897-1905.

## **PRILOZI**

# An anti-DEC-205 monoclonal antibody stimulates binding of thymocytes to rat thymic dendritic cells and promotes apoptosis of thymocytes

IVANA MAJSTOROVIĆ<sup>1</sup>, DRAGANA VUČEVIĆ<sup>1,2</sup>, BOJAN PAVLOVIĆ<sup>1</sup>, SAŠA VASILJIĆ<sup>1,2</sup>, MIODRAG ČOLIC<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Medical Faculty, Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Medical Faculty, University of Niš, Niš, Serbia

## Abstract

*DEC-205, a transmembrane receptor responsible for cross-presentation of apoptotic cell-derived antigens, is expressed by cortical thymic epithelial cells (TEC) and thymic dendritic cells (TDC) in humans and mice, but its function in T-cell development is still unclear. In this work we have studied for the first time the expression of DEC-205 in the rat thymus by HD83 monoclonal antibody (mAb) and immunohistochemistry, as well as the ability of this mAb to modulate thymocyte – TDC interactions in vitro. We showed the positivity of cortical TEC in situ, including thymic nurse cells (TNC) in suspension, and TDC, whereas subcapsular, perivascular and medullary TEC were negative. All examined DEC-205 positive and DEC-205 negative structures were MHC class II positive. HD83 mAb increased apoptosis of thymocytes in co-culture with TDC in vitro and the process was associated with increased binding of thymocytes to TDC in a rosette form. Since negative selection of thymocytes by clonal deletion (apoptosis) was mediated predominantly by TDC, our results suggest the possible indirect effect of the DEC-205 molecule in these mechanisms.*

**Key words:** rat thymus, TDC, DEC-205, thymocyte apoptosis.

(Centr Eur J Immunol 2014; 39 (4): 411-418)

## Introduction

T-cell differentiation and repertoire selection in the thymus are essential for the establishment and maintenance of the adaptive immune system, and play a critical role in immunological tolerance [1].

The mechanisms of positive and negative selection are central for the generation of self-tolerant T-cells, capable of recognizing foreign antigens in the context of self-MHC molecules [2]. These processes require various inputs from surrounding thymic stromal cells composed of thymic epithelial cells (TEC), thymic dendritic cells (TDC), macrophages and other cells (fibroblasts, endothelial cells, etc.) which provide an array of optimal signals to developing thymocytes. Substantial evidence now supports the notion that major inducers of positive selection of thymocytes are cortical TEC, whereas TDC and medullary TEC contribute to the negative selection [3]. Many of the signals required for different stages of intrathymic development are provided by thymic stromal cells in the form of cell surface molecules [1]. Although intrathymic

T-cell differentiation and selection have been an area of intense investigation, the molecular and cellular mechanisms of these processes are not resolved yet.

Previous investigations have shown that DEC-205 (CD205), a 205 kDa integral membrane glycoprotein, positively discriminates cortical TEC [4, 5]. Expression of DEC-205 was detected also on antigen presenting cells, especially on DC in many different tissues including TDC [4, 6]. Studies investigating the CD205 expression by peripheral DC have demonstrated that CD205 operates as an antigen uptake and processing receptor [5]. Human and mouse DEC-205 antigen exhibits approximately 80% protein homology, suggesting its conserved function between species [7]. Park *et al.* [8] successfully generated anti-human DEC-205 monoclonal antibodies (mAbs), produced from human DEC-205-immunized DEC-205 knock-out mice, which were species cross-reactive. One of these mAbs, named HD83, was found to recognize DEC-205 antigen in rat spleen and lymph node [8]. To date, there has

Correspondence: Prof. Miodrag Čolić, Medical Faculty, Military Medical Academy, University of Defence, Crnotravska 17, 1100 Belgrade, Serbia, e-mail: fakultet.vma@mod.gov.rs

been no report on the expression status and the potential functional significance of DEC-205 in the rat thymus.

In an attempt to delineate the function of rat DEC-205 in thymocyte development we characterized its expression within the rat thymus by using HD83 mAb and an immunohistochemical approach. We also analyzed the adhesive interactions between thymocytes and TDC *in vitro* and showed that HD83 mAb enhanced the binding of thymocytes to TDC and stimulated thymocyte apoptosis.

These results suggest the possible molecular mechanisms through which DEC-205 antigen may influence T-cell development and selection in the thymus.

## Material and methods

### Animals

Autoshaping-operant (AO) rats, male, 6-8 weeks old, bred at the Farm for Experimental Animals, Military Medical Academy (MMA) (Belgrade, Serbia) were used in this study. The study was approved by the Ethical Committee of MMA, Belgrade, Serbia, according to the Guidelines for Animal Study, N° 282-12/2002.

### Antibodies

The following mouse anti-rat monoclonal antibodies (mAbs) were used: HD83, mouse anti-DEC-205 mAb cross-reactive with human, mouse, monkey and rat DEC-205 antigen, a kind gift from Dr. Chae Gyu Park (Severance Biomedical Science Institute, Yonsei University College of Medicine, Korea) [8] and OX-6 mAb, (anti I-A) (Serotec). As an irrelevant mAb, the isotype matching mAb VAM 4.1, reactive with Pseudorabies virus and nonreactive with rat antigens, produced at the Institute for Medical Research, MMA, Belgrade, was used. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) was purchased from Dako, Denmark.

### Immunohistochemistry

Cryostat sections (6-8  $\mu\text{m}$ ) of rat thymus were fixed in acetone for 10 minutes at  $-20^{\circ}\text{C}$ , air dried and rehydrated in 50 mM Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6. Slides were then incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with appropriate dilutions of mAbs (final concentrations 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for all tested mAbs) and washed in TBS. After that, incubation with HRP-conjugated rabbit anti-mouse Ig (1 : 25) in TBS containing 5% normal rat serum for 30 minutes followed. After washing in TBS the specific immunolabeling was visualized by adding 0.06% diaminobenzidine (DAB) (Serva) and 0.01% hydrogen peroxide (Sigma) in TBS. Finally, the sections were washed and then lightly counterstained with haematoxylin, prior to mounting. Micrographs of stained thymus sections were taken under the conventional light microscope (Olympus, BX 41). The specificity of immunostaining was confirmed by omission of primary mAb.

### Immunocytochemistry

Cytospins of TDC rosettes were fixed in pararosaniline for 2 minutes, washed in TBS and incubated with appropriate dilution of HD83 mAb (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 60 minutes. After washing in TBS, slides were incubated with HRP-conjugated rabbit anti-mouse Ig (1 : 25) with addition of 5% normal rat serum. Specific immunolabeling was visualized by adding 0.06% diaminobenzidine (DAB) (Serva) and 0.01% hydrogen peroxide (Sigma) as already described. The slides were lightly counterstained with haematoxylin, prior to mounting. The control was VAM 4.1, used as an irrelevant mAb at the same concentration.

### Thymic dendritic cells preparation and cultivation

Thymic dendritic cells were isolated from rat thymuses by using the method previously described by Vasilić *et al.* [9]. Briefly, 4 ml of thymocyte cell suspension ( $3-4 \times 10^8$  cells) was overlaid on 3 ml of OptiPrep™ gradient (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) (density 1.078  $\text{g}/\text{ml}$  and osmolarity 390 mOsm). Cells were then centrifuged at 600 g for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and TDC fraction was collected at the RPMI medium/Optiprep interface. The purity of such prepared TDC was 40%, as checked by morphology. Contaminating cells were mostly thymocytes and macrophages. To further enrich the TDC suspension, TDC were cultivated overnight in 6-well plates (Flow, ICN) at a concentration of  $1.5 \times 10^6$  cells/ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 5 ng/ml mouse recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor (rGM-CSF) (Genzyme, Boston, USA) at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Thymic dendritic cells were collected as non-adherent cells, resuspended in warm RPMI 1640 medium with 0.02% Na-EDTA and purified again over OptiPrep™ density gradient (Sigma). After washing twice in RPMI 1640 with 2% FCS, the TDC suspension was counted and analyzed in Turk's solution under the microscope. The purity of cultivated TDC was around 80%.

### Thymocytes

To prepare thymocytes, the thymus was teased with a syringe plunger, cells were collected, filtered through a nylon mesh, centrifuged for 10 minutes at  $600 \times g$ , and washed in 1640 RPMI medium with 2% FCS. The thymocyte suspension was counted, and cell viability, which was higher than 95%, was checked by Trypan blue exclusion.

### Rosette assay

Thymic dendritic cells ( $5 \times 10^4$ ) were preincubated with HD83 mAb, control VAM 4.1 mAb (both at the concentrations of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), or medium alone for 15 min, then mixed with freshly isolated thymocytes ( $2.5 \times 10^5$ ), 1 : 5 ratio, in 20  $\mu\text{l}$  of the complete medium, transferred into a Terasaki microwell plate and cultured in a hanging drop. After 30 minutes

of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, the cells were gently collected and cytocentrifuged onto glass slides. Cytospins were stained with May-Grunwald Giemsa (MGG) and analyzed by light microscopy. Thymic dendritic cells that bound three or more thymocytes were scored as rosettes. For each assay 200-500 TDC were counted and each determination was performed in duplicate. Two parameters were determined: rosette formation (represented by the percentage of TDC forming rosettes in comparison with a total number of TDC) and mean number of thymocytes per rosette.

### Apoptosis assays

Purified cultivated TDC were mixed with syngeneic thymocytes at 1 : 5 ratio and cultivated in RPMI 1640 medium with 10% FCS in 96-well flat bottom plates. HD83 mAb or control VAM 4.1 mAb (both 10 µg/ml) were added to TDC/thymocyte co-cultures. After 6 h incubation thymocyte apoptosis was measured. The percentage of apoptotic thymocytes, identified in TDC/thymocyte co-cultures, was determined by morphological criteria as previously described [10] and AnnexinV-FITC/Propidium Iodide (PI) method. For morphological evaluation, thymocytes cultivated with TDC were washed with PBS, fixed with Turk's solution and analyzed by light microscopy. In each sample at least 500 cells were counted. Apoptotic cells were identified by condensation of chromatin, nuclear pyknosis and/or karyorrhexis. The results were expressed as a percentage of apoptotic thymocytes relative to total counted thymocytes. For cytometric determination of thymocyte apoptosis, cells were stained with AnnexinV-FITC/PI kit KXN50 (R&D, Abingdon, Oxon, UK). Cells from each well were stained according to the manufacturer's instructions and analyzed using a flow cytometer (CyFlow Cube 6, Partec, Germany). Double negative cells are viable cells, AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> cells represent thymocytes in the early stage of apoptosis, double positive cells are late apoptotic/secondary necrotic thymocytes, whereas only PI<sup>+</sup> cells are primarily necrotic cells.

Apoptosis of thymocytes within TDC rosettes on cytopins prepared after 30 minutes of incubation, was determined also based on morphological criteria. The results were expressed as % of apoptotic thymocytes within rosettes relative to total thymocytes bound to TDC.

### Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed by *t*-test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Expression of DEC-205 antigen in the rat thymus

The sections of rat thymuses were stained with HD83 mAb. Results presented in Figure 1 clearly show that this an-

tibody stains cortical epithelium and isolated stellate or ramified cells in the medulla, resembling TDC. The staining of the cortex was stronger than in the medulla, especially on the border of epithelial-free zones, which were clearly negative, and at the cortico-medullary zones. Subcapsular epithelial cells, perivascular epithelial cells in the cortex and medullary epithelial cells were DEC-205 negative. By comparing the staining of the thymus with OX-6 mAb (an anti-rat MHC class II molecule antibody), it can be seen that both cortical and medullary epithelial cells, including subcapsular/perivascular TEC, TDC in the medulla and macrophage-like cells throughout the whole section, including macrophages within epithelial-free zones, express MHC class II molecules.

The positive immunoreaction of isolated thymic nurse cells (TNC) and TDC (Fig. 2), and negative staining of both viable and apoptotic thymocytes by HD83 mAb (data not shown), confirmed the pattern expression of the DEC-205 antigen seen *in situ*.

### HD83 mAb stimulates the formation of rosettes between thymocytes and thymic dendritic cells

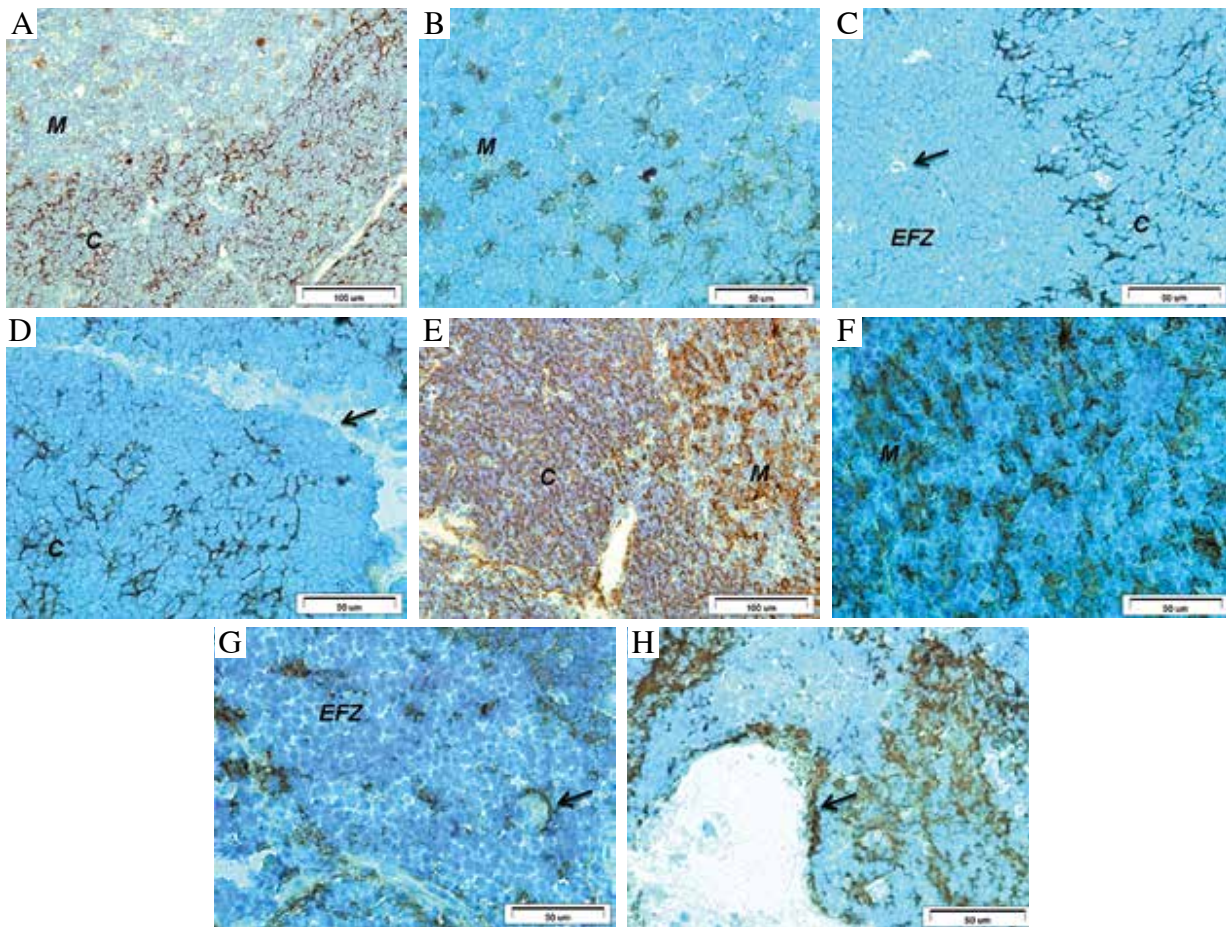
To study possible functional roles of the DEC-205 antigen in the thymus, we performed a rosette assay between thymocytes and TDC *in vitro*. Figure 3 shows that HD83 mAb stimulates the rosette formation, compared to corresponding controls, as judged by either the percentage of TDC forming rosettes or by the mean number of thymocytes per rosette.

### HD83 mAb stimulates apoptosis of thymocytes

Thymocytes die rapidly in culture and the apoptotic process was accelerated in co-culture with TDC. Both morphological and flow-cytometric methods gave similar results (Fig. 4A and 4B). When HD83 mAb was added to the co-culture, apoptosis of thymocytes was further increased, compared to controls. The process was more evident when early stage apoptotic cells (AnnexinV-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) were analyzed (Fig. 4B). To check whether this process was associated with increased adhesiveness of thymocytes to TDC, apoptosis was measured separately in rosettes. It can be seen that the percentage of apoptotic thymocytes in rosettes was higher compared to apoptosis of total thymocytes. The percentage of apoptotic thymocytes in rosettes (stimulated in the presence of HD83 mAb) was statistically significantly higher compared to the percentage of apoptotic thymocytes in rosettes in control cultures (without HD83 mAb or in the presence of Ir mAb). This finding suggests that the increased formation of TDC/thymocyte rosettes was associated with increased apoptosis of thymocytes within these cell-to-cell clusters.

## Discussion

The first mAb produced against mouse DEC-205, NLDC-145, has been shown to stain cortical TEC and

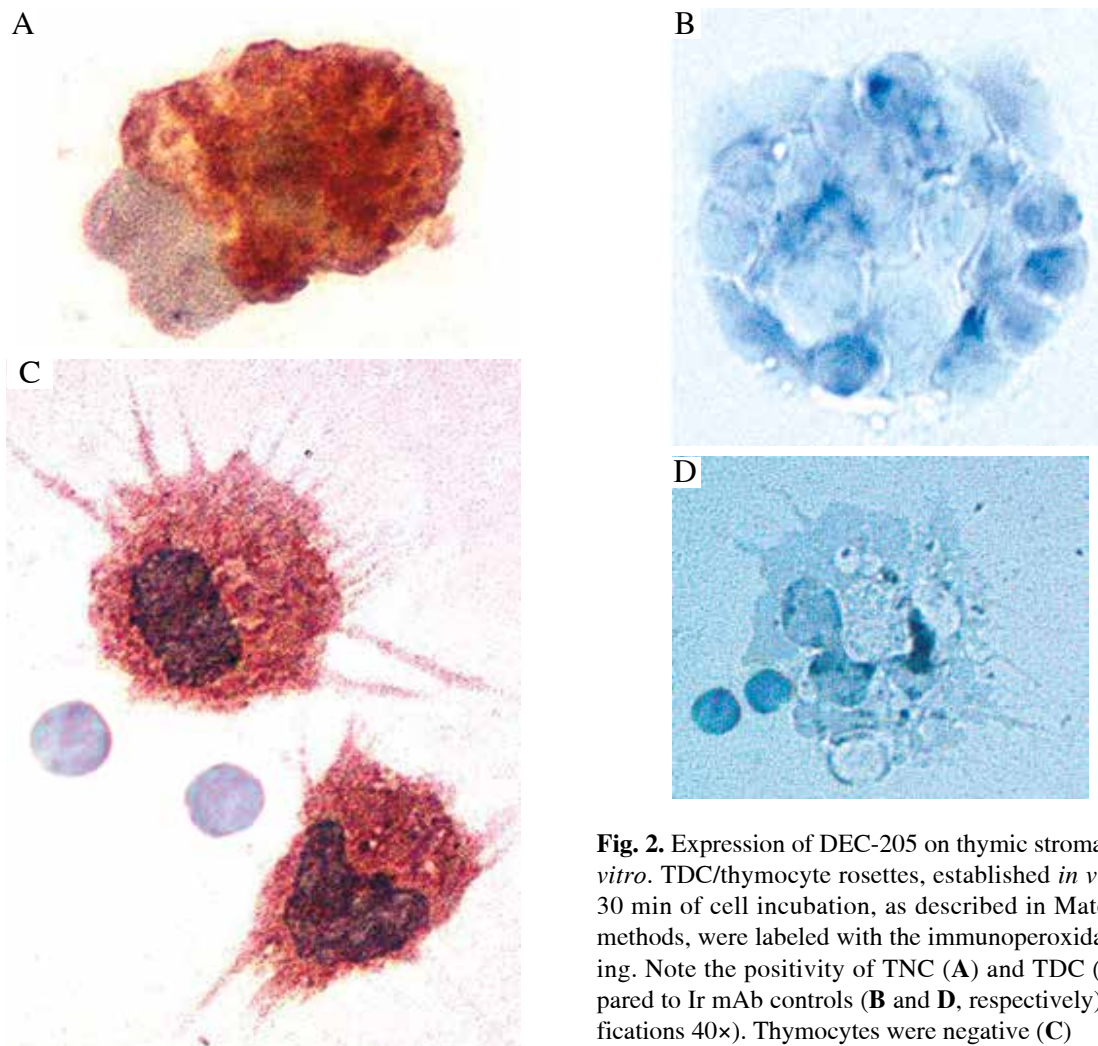


M – medulla; C – cortex; EFZ – epithelial-free zone

**Fig. 1.** Immunoperoxidase staining of rat thymus, with HD83 mAb (A-D) and anti-MHC II mAb (E-H). Specific HD83 labeling is localized in the cortex (A) and less intense on some individual dendritic-like cells scattered in the medulla (B). Note stronger HD83 labeling of cortical epithelium, specifically at the cortico-medullary (A) and cortico-epithelial-free zones border (C). Perivascular epithelial cells (arrow) (C) and subcapsular epithelial cells (arrow) (D) are HD83 negative. Staining with OX-6 mAb shows the positivity of both cortical and medullary compartment (E). Note strong staining of medullary TEC and TDC (F), isolated macrophages and perivascular TEC (arrow) in epithelial-free zones (G), subcapsular epithelium (arrow) and cortical epithelium (H). Magnifications: A and E 20×; others 40×

medullary TDC [11]. Subsequent studies confirmed the expression of DEC-205 on mouse DC in other lymphoid organs, especially on the CD8+ DC subset and weakly on other antigen-presenting cells (macrophages and B-cells) [4, 12-14]. Later on, the study in the human system showed distribution of DEC-205 on other cells, including myeloid blood DC and monocytes, but also at low levels on natural killer cells, plasmacytoid DC and T-cells [6]. Since the data related to DEC-205 expression in the rat system are very scarce [8], the first aim of this study was to characterize the expression of this molecule in the rat thymus. By using an immunohistochemical approach on rat thymus sections and isolated cells, we confirmed that the pattern expression of DEC-205 closely resembled that in

the mouse thymus. Namely, cortical TEC, including TNC, and medullary TDC were strongly DEC-205 positive. It is interesting that subcapsular and perivascular epithelial cells in the cortex were DEC-205 negative. In contrast, all thymic epithelial structures, TDC and macrophages were MHC class II positive. These findings, together with negative staining of medullary TEC with HD83 mAb are in accordance with already published phenotypic heterogeneity of TEC [15]. An extensive immunohistochemical study demonstrated that subcapsular/perivascular and most medullary TEC share the same phenotype, in contrast to the cortical TEC, which express some specific markers [15]. It is obvious that such a unique cortical TEC-subset-specific marker is DEC-205.



**Fig. 2.** Expression of DEC-205 on thymic stromal cells *in vitro*. TDC/thymocyte rosettes, established *in vitro* after 30 min of cell incubation, as described in Material and methods, were labeled with the immunoperoxidase staining. Note the positivity of TNC (A) and TDC (C) compared to Ir mAb controls (B and D, respectively) (magnifications 40 $\times$ ). Thymocytes were negative (C)

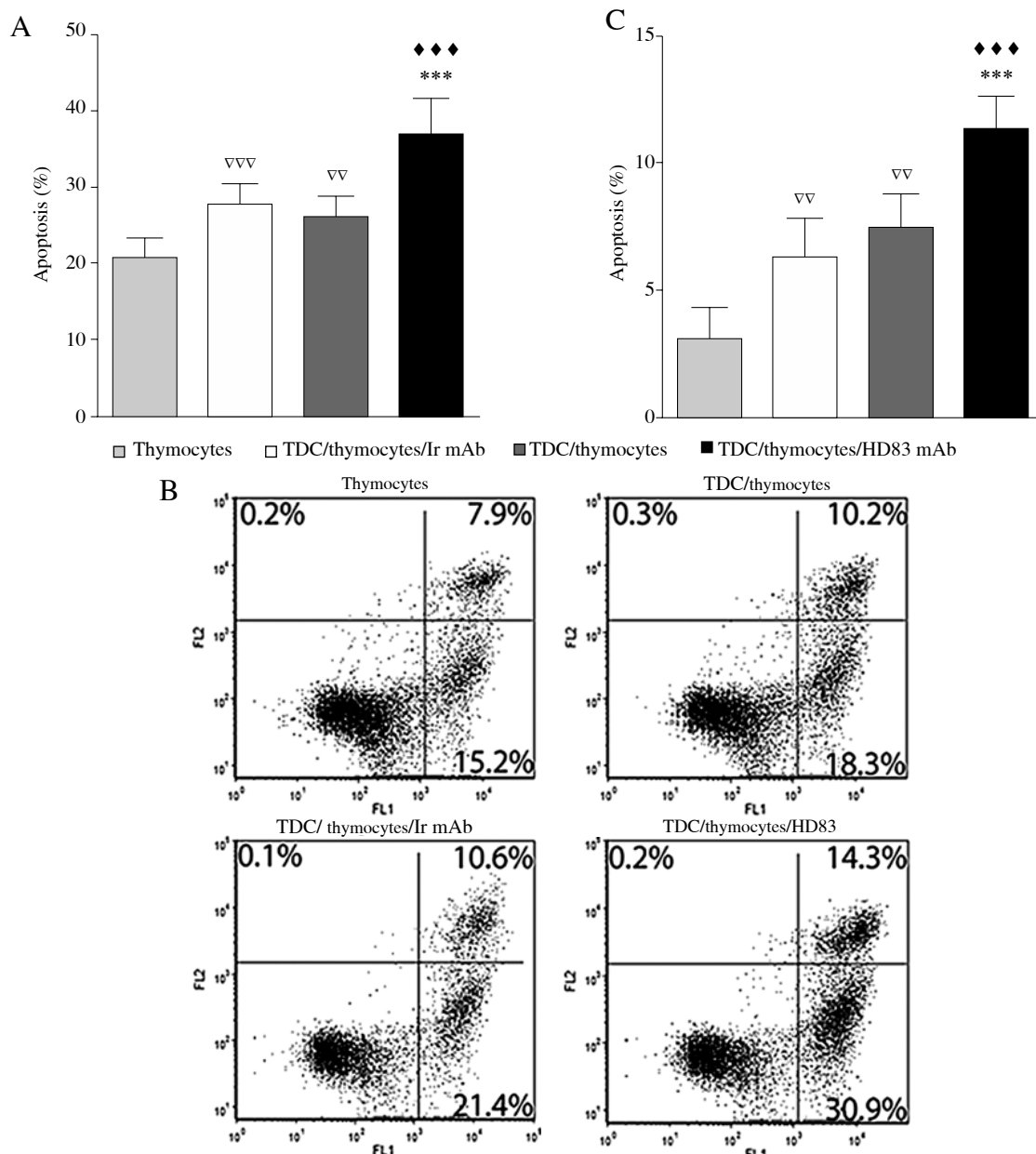
It is known that DEC-205 belongs to the macrophage mannose receptor family of C-type lectin endocytic receptors, which behaves as an antigen-uptake/processing receptor for DC and cortical TEC [5]. Its predominant function is to direct capture of antigens from the extracellular space to a specialized antigen-processing compartment [16]. Based on these results it can be postulated that DEC-205 must have a role in endocytosis and subsequent processing of self-antigens in the thymus. Such mechanisms are important for selection processes in the thymus [17]. A paper published by Small and Kraal [18] showed an *in vitro* evidence for participation of DEC-205 in clearance of apoptotic thymocytes by mouse cortical TEC. Later on, such a role has been postulated for mouse CD8+ DC subset, which selectively endocytoses dying cells in culture and *in vivo* [14]. This finding is very important because CD8+ DC, in contrast to CD8- DC, are specialized to capture dying cells and to cross-present cellular antigens to both CD4+ and CD8+ T-cells, where DEC-205 might

have a very important role. The ligands for DEC-205 in the tissue have not been identified yet. The only paper that deals with this research area showed evidence that CpG oligonucleotides, well known pathogen associated molecular pattern and a selective TLR-9 agonist, bind to both mouse and human DEC-205 [19]. It has been recently confirmed that apoptotic thymocytes express ligands for mouse DEC-205, as demonstrated by using a DEC-205 – Ig fusion protein [20].

All these results motivated us to study the possible role of rat DEC-205 in the processes of thymocyte apoptosis. Our previous results showed that rat TDC in culture stimulated apoptosis of thymocytes. This process was associated with binding of thymocytes to TDC and was partially blocked by a LFA-1 mAb [21]. Such results were confirmed later by other authors [22] by demonstrating the involvement of TDC- and thymic macrophages-derived NO, as an important effector mechanism in apoptosis induction of rat thymocytes. To see whether DEC-205 inter-







\*\*\* $p < 0.001$  compared to Ir mAb, \*\*\* $p < 0.001$  compared to TDC/thymocytes, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared to thymocytes alone

**Fig. 4.** Effect of HD83 mAb on thymocyte apoptosis. Apoptosis of total thymocytes in culture with TDC after 6 hours of cultivation determined by morphological criteria (A), and flow cytometry staining with AnnexinV-FITC/PI (B). The percentage of apoptotic thymocytes within rosettes formed after 30 min compared to total thymocytes (C) determined by morphological criteria. The results were given as mean  $\pm$  SD (3 different experiments) after 500 thymocytes (A), 5000 thymocytes (B) or 200-500 thymocytes within rosettes (C) were calculated in each experiment

It is also possible that HD83, upon binding to DEC-205 on TDC, modulates other adhesion molecules on these cells. Our previous results in the rat system, showed that a number of mAbs, including those to class II MHC molecules and CD45, stimulated the rosette formation between TDC and thymocytes in a LFA-1-dependent and LFA-1-independent pathway, respectively [23].

In conclusion, our results showed that the expression pattern of DEC-205 in the rat thymus is very similar to that in the mouse. In addition, we have addressed for the first time a possible role of rat DEC-205 in thymocyte apoptosis through increased TDC-thymocyte interactions. Although preliminary, these results suggest the involvement of DEC-205 in the processes of thymocyte selection in the thymus.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. Chae Gyu Park (Yonsei University College of Medicine, Korea) for a generous gift of HD83 monoclonal antibody.

*The authors declare no conflict of interest.*

*This study is supported by the grants (ON175102) of the Ministry of Education, Science and Technological Development of R. Serbia and the project of the Ministry of Defense of R. Serbia (MFVMA/4/13-15).*

## References

1. Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA (2006): Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 7: 338-343.
2. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA (2003): Positive and negative selection of T cells. *Ann Rev Immunol* 21: 139-176.
3. Takahama Y (2006): Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6: 127-135.
4. Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, et al. (1995): Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. *Cell Immunol* 163: 148-156.
5. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, et al. (1995): The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375: 151-155.
6. Kato M, McDonald KJ, Khan S, et al. (2006): Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol* 18: 857-869.
7. East L, Isacke CM (2002): The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1572: 364-386.
8. Park CG, Rodriguez A, Ueta H, et al. (2012): Generation of anti-human DEC205/CD205 monoclonal antibodies that recognize epitopes conserved in different mammals. *J Immunol Methods* 377: 15-22.
9. Vasilijic S, Colic M, Vucevic D (2003): Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an anti-apoptotic cytokine for thymic dendritic cells and a significant modulator of their accessory function. *Immunol Lett* 86: 99-112.
10. Colic M, Gasic S, Vucevic D, et al. (2000): Modulatory effect of 7-thia-8-oxoguanosine on proliferation of rat thymocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *Int J Immunopharmacol* 22: 203-212.
11. Kraal G, Breeel M, Janse M, Bruin G (1986): Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163: 981-997.
12. Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, et al. (1995): Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. *Cell Immunol* 163: 157-162.
13. Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM (1995): DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 165: 302-311.
14. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, et al. (2002): The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture an in vivo. *J Exp Med* 195: 1289-1302.
15. Kampinga J, Berges S, Boyd RL, et al. (1989): Thymic epithelial antibodies: immunohistological analysis and introduction of nomenclature. *Thymus* 13: 65-173.
16. Mahnke K, Guo M, Lee S, et al. (2000): The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151: 673-683.
17. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B (2009): Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev* 9: 833-844.
18. Small M, Kraal G (2003): In vitro evidence for participation of DEC-205 expressed by thymic cortical epithelial cells in clearance of apoptotic thymocytes. *Int Immunol* 15: 197-203.
19. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, et al. (2012): DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16270-16275.
20. Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, et al. (2009): CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol* 46: 1229-1239.
21. Tadic V, Colic M, Miyasaka M, Ilic V. 7-LFA-1/ICAM-1 adhesion pathway is involved in both apoptosis and proliferation of thymocytes induced by thymic dendritic. In: *Immunoregulation in health and disease, experimental and clinical aspects*. Lukic M, Colic M, Mostarica-Stojkovic M, Cuperlovic K (eds.). Academic Press, London 1997; 77-89.
22. Aiello S, Noris M, Piccinini G, et al. (2000): Thymic dendritic cells express inducible nitric oxide synthase and generate nitric oxide in response to self- and alloantigens. *J Immunol* 164: 4649-4658.
23. Colic M, Ilic V, Pavlovic MD, et al. (1996): Mechanisms involved in the binding of thymocytes to rat thymic dendritic cells. *Dev Immunol* 5: 37-51.

## BIOGRAFIJA

Ivana Majstorović je rođena 16.06.1973. u Gospiću. Nakon završene Osme beogradske gimnazije u Beogradu upisala je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija, školske 1992/1993. godine. Diplomirala je 1998. godine sa ocenom 10. Po završenim studijama boravila je u Istraživačkom centru Novartis, u Bazelu (Švajcarska), u svojstvu praktikanta, u trajanju od 6 meseci. Radila je u Odeljenju za metabolizam kostiju na problemu delovanja fluoroaminaluminata na metabolizam kostiju. Rezultati ovih istraživanja su publikovani u časopisu *Bone* (Vol. 30 No.1 January 2002). Od marta 1999. godine najpre kao volonter, a potom (od septembra 1999. godine) u stalnom radnom odnosu radi na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Zaposlena je u Odeljenju za molekulske medicinu i aktivno uključena kao saradnik u projektima: Genetičko inženjerstvo i tehnologija hibridoma u medicini, 1995-2006, Imunoregulatorni mehanizmi u inflamaciji i zarastanju rana (VMA/06-10/B.7), Značaj proinflamatornih i imunoregulatornih citokina u razvoju hroničnih dentalnih periapikalnih lezija (VMA/06-08/B.3), Uloga granulocita u akutnoj i hroničnoj inflamaciji i zarastanju rana (VMA/06-08/B.9), Autologe vakcine dendritskim ćelijama u terapiji kolorektalnog karcinoma (VMA/06-08/A.7), Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u terapiji tumora (projekat Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije 2011-2014, broj 175102), Regulatorni mehanizmi u zapaljenskim imunskim reakcijama (MFVMA/9/16-18). Doktorske studije je upisala 2007. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program: Neuronauke, modul: Neurobiologija sa neuroimunologijom. Ivana Majstorović je do sada bila autor i koautor u 28 naučnih publikacija u vrhunskim časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja, kao i u više od 70 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Njeni radovi su citirani više od 250 puta.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Мајсторовић

број индекса Б3040/2007

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Експресија и биохемијска и функционална карактеризација R-МС 17 антигена пацова

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

Потпис докторанда

У Београду, 21.07.17.

Ивана Мајсторовић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Мајсторовић

Број индекса Б3040/2007

Студијски програм Неуронауке

Наслов рада Експресија и биохемијска и функционална карактеризација R-МС 17  
антигена пацова

Ментор др Миодраг Чолић, академик и др Биљана Божић, редовни професор

Потписани/а Ивана Мајсторовић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 21.07 '17

Ивана Мајсторовић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Експресија и биохемијска и функционална карактеризација R-МС 17 антигена пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 21.07.17

Ивана Марковић