Współczesna Onkologia (2002) vol. 6: 6; 354–359

Nowotwory, komórki dendrytyczne i sygnał zagrożenia

Tumors, dendritic cells and the danger signal

Dariusz W. Kowalczyk

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Akademia Medyczna i Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Choroba nowotworowa jest procesem wieloetapowym i wielonarządowym. Mutacje powodujące transformację nowotworową komórek prowadzą do ich niekontrolowanego wzrostu, naciekania otaczających tkanek i powstawania przerzutów. Naturalne czynniki, które mogłyby działać cytostatycznie, w większości przypadków nie wpływają na zmutowane komórki nowotworowe. Co więcej, mogą negatywnie oddziaływać na inne tkanki, czego efektem jest powstanie dalszych zaburzeń, jak np. miejscowa i ogólna immunosupresja, niedokrwistość, wyniszczenie nowotworowe itp. W 1994 r. Polly Matzinger przedstawiła nową teorię, nazywaną modelem sygnału zagrożenia. Według tej teorii, swoista odpowiedź immunologiczna powstaje w wyniku rozpoznania procesu uszkodzenia tkanek, a nie tylko samego rozpoznania obcej natury antygenu. Zaproponowany przez Matzinger model odnosi się głównie do zagadnień związanych z powstawaniem tolerancji immunologicznej, niemniej jego założenia mogą dotyczyć także immunologii nowotworów, czy pozornie odległej terapii genowej. Ponieważ proces nowotworowy nie jest rozpoznawany w kategoriach zagrożenia przez organizm, komórki dendrytyczne nie ulegają aktywacji. Brak aktywacji komórek dendrytycznych w połączeniu z towarzyszącą lokalną lub/i ogólną immunosupresją powoduje, że nawet silne antygeny nowotworowe nie indukują odpowiedzi immunologicznej, która mogłaby prowadzić do eliminacji komórek nowotworowych. Dostarczenie antygenów razem z sygnałem zagrożenia powoduje natomiast aktywację komórek dendrytycznych i następnie indukcję odpowiedzi na antygeny nowotworowe, która potencjalnie może prowadzić do zniszczenia komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: nowotwory, komórki dendrytyczne, sygnał zagrożenia, immunoterapia.

WSTĘP

W 1994 r. Polly Matzinger przedstawiła nową teorię nazywaną modelem sygnału zagrożenia [1]. Według tej teorii, swoista odpowiedź immunologiczna powstaje w wyniku rozpoznania procesu uszkodzenia tkanek, a nie tylko samego rozpoznania obcej natury antygenu. Zaproponowany przez Matzinger model odnosi się głównie do zagadnień związanych z powstawaniem tolerancji immunologicznej, niemniej jego założenia mogą dotyczyć także immunologii nowotworów, czy pozornie odległej terapii genowej.

Obowiązująca teoria zakłada, że układ immunologiczny zabezpiecza organizm przed wszystkimi obcymi antygenami [2]. Model zagrożenia dla odmiany nie kładzie nacisku na obcą naturę antygenu, lecz na warunki, w jakich ten antygen jest prezentowany komórkom immunokompetentnym. Warunki prezentacji antygenu, które przez organizm będą odbierane jako stan patologiczny i traktowane jako stan zagrożenia sprzyjać będą powstawaniu odpowiedzi immunologicznej bez względu na to, czy antygen jest tzw. antygenem własnym czy obcym [1, 3, 4]. Cała teoria oparta jest na zasadzie tzw. drugiego sygnału. Jego obecność lub brak determinuje, czy powstanie odpowiedź immunologiczna, czy wytworzy się stan tolerancji. Podczas gdy pierwszy sygnał generowany jest przez swoiste rozpoznanie antygenu, wspomniany drugi sygnał jest dostarczony przez limfocyty T pomocnicze lub kostymulację z profesjonalnych komórek prezentujących antygen [5–7]. Dalsze konsekwencje rozpoznania antygenu (odpowiedź immunologiczna/stan tolerancji) zależą także od stanu zróżnicowania komórek odpowiadających na antygen. Ogólne zasady wyjaśniające mechanizmy indukcji odpowiedzi immunologicznej lub stanu tolerancji można przedstawić w następujących punktach [1]:

A. Reguły dotyczące limfocytów.
   I. Antygenowo dziewicze limfocyty T:
      1) odebranie sygnału pierwszego (tj. rozpoznanie antygenu) przy jednoczesnym braku sygnału drugiego prowadzi do apoptozy,
      2) sygnał drugi może być dostarczony tylko przez profesjonalne komórki prezentujące antygen (obecnie panuje powszechne przekonanie, że dziewiczym limfocytom T drugi sygnał mogą dostarczyć tylko komórki dendrytyczne).
   II. Limfocyty T pamięci:
      1) odebranie sygnału pierwszego przy jednoczesnym braku sygnału drugiego prowadzi do apoptozy,

Neoplastic disease develops as a multistep and multiorgan process. Somatic mutations causing cells transformation lead to uncontrolled cell proliferation, invasion and metastases. Natural factors which could have cytostatic effect on transformed cells in most cases fail to halt tumor growth. Moreover, instead of antitumor activity they might negatively interact with other tissues leading to local or general immunosupression, anemia, cahexia etc. In 1994 Polly Matzinger presented a new theory called the danger model suggesting that specific immune response develops as a result of danger detection rather than discrimination between self and non-self antigens. Although this model refers mainly to immune tolerance its assumptions are valid for such distant subjects as tumors or apparently unrelated with immunology gene therapy. Contemporary self-non-self discrimination model assume that immune system protects the organism against everything which is foreign, thus immune responses are directed towards external entities which are non-self antigens. According to the danger model the immune system detects and then responds to anything whichever is dangerous and not necessarily foreign. In its beganing tumor growth is not recognized as dangerous and does not activate dendritic cells. The lack of dendritic cells activation along with concomitant immunosupression is responsible for the absence of spontaneous immune response against tumor antigens. Antigen delivery in conjunction with the danger signal might thus activate dendritic cells and induce an immune response with a potential to destroy tumor cells.

Key words: tumors, dendritic cells, danger signal, immunotherapy.

2) drugi sygnał może być dostarczony przez limfocyty B, makrofagi lub komórki dendrytyczne.

III. Limfocyty B:

1) odebranie sygnału pierwszego przy jednoczesnym braku sygnału drugiego prowadzi do apoptozy,
2) drugi sygnał może być dostarczony tylko przez efektorowe limfocyty T lub limfocyty T pamięci.

IV. Efektorowe limfocyty T i B:

1) limfocyty efektorowe po rozpoznaniu antygenu wypełniają swoje funkcje bez względu na obecność sygnału drugiego,
2) po wypełnieniu funkcji efektorowych limfocyty ulegają apoptozie lub przechodzą do stanu spoczynkowego.

B. Komórki prezentujące antygen.

I. Profesjonalne komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne):

1) komórki prezentujące antygen pobierają antygeny z otoczenia, wędrują do okolicznych węzłów chłonnych, gdzie prezentują je limfocytom T,
2) w przypadku uszkodzenia tkanek komórki prezentujące antygen ulegają aktywacji,
3) komórki prezentujące antygen posiadają molekuły kostymulujące, które mogą być rozpoznawane przez antygenowo dziewicze limfocyty T,
4) komórki prezentujące antygen zwiększają ekspresję molekuł kostymulujących po otrzymaniu odpowiednich sygnałów z limfocytów T pomocniczych.

II. Limfocyty B:

1) sygnały kostymulacji mogą przekazywać tylko limfocytom T pamięci,
2) limfocyty B mogą swoiście wychwytywać antygeny ze środowiska, koncentrować je i prezentować limfocytom T.

Przedstawione powyżej reguły są bardzo dużym uproszczeniem, niemniej stosunkowo jasno i przystępnie opisują, w jaki sposób dochodzi do indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej lub powstawania stanu tolerancji.

Jedną z podstawowych różnic między proponowanym modelem sygnału zagrożenia i obowiązującą teorią jest sposób, w jaki dochodzi do inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Obowiązująca teoria zakłada, że do zapoczątkowania odpowiedzi immunologicznej wystarcza obca natura antygenu [2]. Model zagrożenia zakłada natomiast, że głównym czynnikiem wyzwalającym odpowiedź jest prezentacja antygenu w kontekście uszkodzenia tkanek. Pojawienie się obcego antygenu przy braku uszkodzenia tkanek lub śmierci komórek na drodze apoptozy nie wywoła odpowiedzi immunologicznej. Jednakże uszkodzenie komórek, stres komórkowy lub nekrotyczna śmierć komórek prowadzić będzie do powstania odpowiedzi [1, 3, 4].

Ponieważ absolutna większość komórek organizmu z powodu braku molekuł kostymulujących może dostarczyć limfocytom T tylko sygnał pierwszy, podstawową reakcją odpowiadających limfocytów T jest powstawanie stanu tolerancji. Ten typ odpowiedzi jest niezwykle pożądany w celu uniknięcia autoagresji skierowanej przeciw własnym tkankom i narządom. W celu inicjacji odpowiedzi immunologicznej profesjonalne komórki prezentujące antygen muszą być w stanie wykryć uszkodzenie tkanek i informować o tym limfocyty T. Uszkodzenie tkanek powinno zatem aktywować komórki dendrytyczne, które załadowane pochłoniętymi antygenami, uzbrojone w molekuły kostymulujące migrują do najbliższych węzłów chłonnych. Aktywowane w ten sposób komórki dendrytyczne są następnie gotowe do prezentacji antygenów

limfocytom T i inicjacji odpowiedzi immunologicznej.

MOLEKUŁY SYGNAŁU ZAGROŻENIA

Model sygnału zagrożenia proponuje, że komórki dendrytyczne nie mają stale na swojej powierzchni molekuł kostymulujących. Ekspresja tych cząsteczek pojawia się tylko w sytuacjach zagrożenia (uszkodzenia tkanek). Regulacja ekspresji molekuł kostymulujących zależna od uszkodzenia tkanek sugeruje, że komórki prezentujące antygen muszą mieć odpowiedni receptor (bądź receptory), który byłby w stanie wykryć i rozpoznać jakiekolwiek oznaki związane z uszkodzeniem. W najprostszym przypadku, komórki dendrytyczne mogłyby być aktywowane bezpośrednio przez niektóre wirusy, białka wirusowe lub bakteryjny DNA [8–12]. Wykazano, że adenowirusy lub oczyszczony DNA mogą transdukować i aktywować (tj. indukować ekspresję molekuł kostymulujących) komórki dendrytyczne [8–12]. Wspomniana cecha adenowirusów powoduje, że są one niezwykle wydajnymi nośnikami szczepionek [9]. Oczyszczone białka wirusowe mają działania podobne do wirusów [10]. Sygnał zagrożenia może być przekazany z sąsiednich komórek, które uległy stresowi jak infekcja, niedotlenienie, urazowi mechanicznemu itp. Do tej pory nie udało się dokładnie zdefiniować mediatorów uszkodzenia tkanek odbieranych przez komórki dendrytyczne. Jednymi z najbardziej prawdopodobnych mediatorów mogących być sygnałem zagrożenia są białka szoku termicznego. Badania prowadzone przez grupę Srivastavy wykazały, że białka szoku termicznego odgrywają krytyczną rolę w procesie określanym jako *cross-priming*, gdzie dochodzi do prezentacji antygenów pochodzących z innych komórek na komórkach dendrytycznych w kontekście MHC klasy I. Wykazano również, że komórki dendrytyczne posiadają swoiste receptory białek szoku termicznego [15, 16]. Inni podejrzani kandydaci to nukleotydy i cytokiny [17].

DOWODY EKSPERYMENTALNE

Fenomen braku odpowiedzi immunologicznej w pewnych warunkach na całkowicie obce antygeny jest dość dobrze znany, niemniej nie do końca wyjaśniony [1]. Co więcej, w celu uzyskania silnej odpowiedzi immunologicznej wiele antygenów musi być podawanych razem z substancjami dodatkowymi jakimi są adjuwanty. Według modelu zagrożenia te dodatkowe, zwykle drażniące substancje dostarczają lub indukują w tkankach wymagany sygnał zagrożenia.

W modelu terapii genowej hemofilii typu B, rodzaj i siła odpowiedzi immunologicznej przeciwko produktowi transgenu była ściśle uzależniona od typu wektora użytego do dostarczania genu terapeutycznego. Domięśniowa iniekcja wirusa AAV z DNA kodującym czynnik IX nie indukowała powstawania swoistych limfocytów T. Dostarczenie tego samego genu przy pomocy wektorów adenowirusowych indukowało natomiast silną, skierowaną przeciw czynnikowi IX odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych i pomocniczych, prowadząc do powstania stanu zapalnego, uszkodzenia mięśni i aktywacji limfocytów B [18].

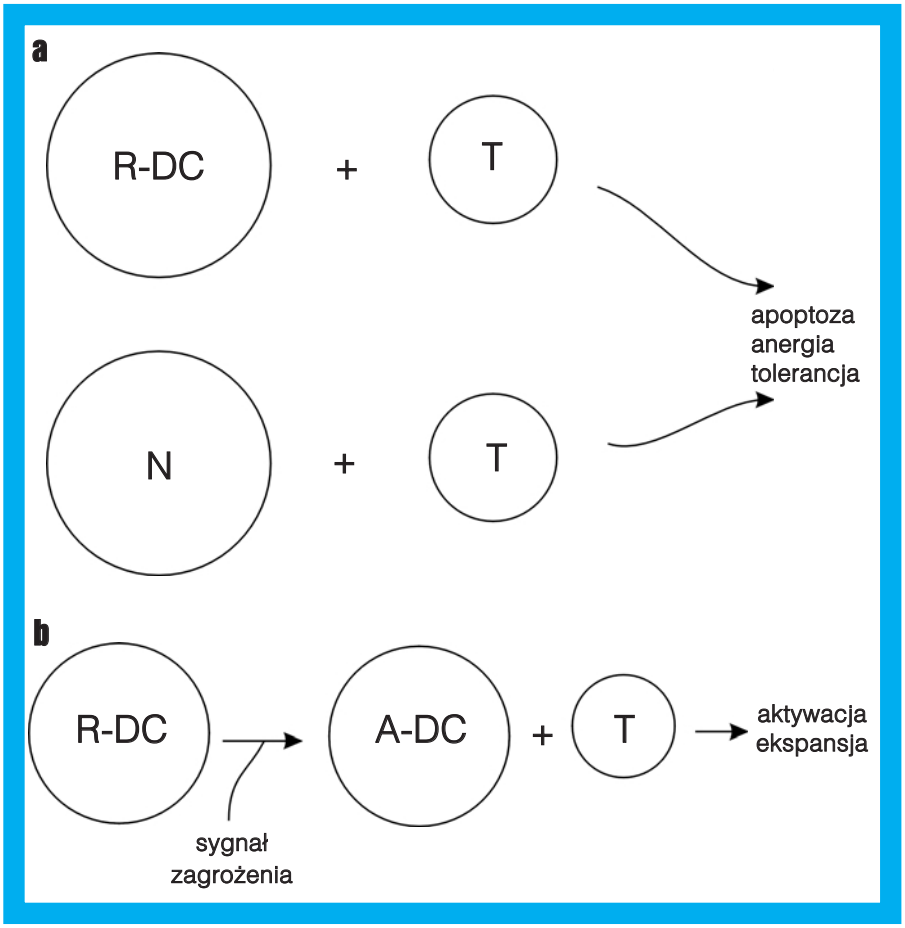
Podobny brak reaktywności zauważono w wielu badaniach wykorzystujących modelowe antygeny nowotworowe. Wprawdzie odpowiedź immunologiczna skierowana przeciw antygenom nowotworowym występuje w całkowicie odmiennym kontekście biologicznym, niemniej istnieją tu podobne pytania typu czy i jak komórki nowotworowe mogą indukować odpowiedź immunologiczną. Najbardziej przekonujące wyniki uzyskano w doświadczeniach opartych na bezpośredniej detekcji swoistych wobec komórek nowotworowych limfocytów T. Ostatnio jednymi z najbardziej użytecznych narzędzi immunologii są fluorescencyjnie wybarwione rekombinowane tetramery MHC klasy I, zawierające odpowiedni peptyd wiążący się z receptorem antygenowym swoistych limfocytów T lub stymulacja limfocytów komórkami nowotworowymi połączona z detekcją cytokin [19, 20]. Techniki te umożliwiają bezpośrednie uwidocznienie antygenowo swoistych (swoistych wobec komórek nowotworowych) limfocytów T i ich analizę bez konieczności żadnych dodatkowych manipulacji *in vitro.*

Guzy nowotworowe bardzo często indukują powstanie intensywnego nacieku zawierającego limfocyty T, jednakże swoistość naciekających komórek nie była znana. Posługując się wyżej wspomnianymi technikami wykazano, że zwierzęta laboratoryjne nie rozwijają absolutnie żadnej odpowiedzi na całkowicie obce antygeny nowotworowe [21, 22]. Prezentacja tych samych antygenów nowotworowych poprzez podanie rekombinowanych adenowirusów indukowała natomiast niezwykle silną odpowiedź [20–22]. Co więcej, wcześniejsze zaprezentowanie antygenów nowotworowych razem z antygenami adenowirusowymi zabezpieczało całkowicie myszy przed rozwojem nowotworu [20]. A zatem to, czy pojawi się odpowiedź immunologiczna całkowicie zależy od panujących warunków i kontekstu, w jakim dany antygen jest prezentowany.

Badania nad wektorami stosowanymi w próbach terapii genowej lub do celów immunizacji wykazały, że jedyną populacją odpowiedzialną za indukcję odpowiedzi immunologicznej są komórki dendrytyczne [23]. Tym samym antygeny prezentowane czy to przez makrofagi, czy limfocyty B nie będą w stanie zainicjować odpowiedzi immunologicznej [24].

MODEL ZAGROŻENIA I NOWOTWORY

Zakłada się, że komórki nowotworowe wykazują ekspresję antygenów, które nie występują wcale lub wystę-



Ryc. Indukcja odpowiedzi immunologicznej: a – rozpoznanie antygenu na spoczynkowych komórkach dendrytycznych (R-DC) lub komórkach nowotworowych przez antygenowo dziewiczy limfocyt T (T) prowadzi do jego apoptozy; b – sygnał zagrożenia aktywuje spoczynkowe komórki dendrytyczne (R-DC). Rozpoznanie antygenu przez dziewiczy limfocyt T (T) na aktywowanych komórkach dendrytycznych (A-DC) indukuje odpowiedź immunologiczną i powstanie efektorowych limfocytów T

pują w niewielkich ilościach na innych komórkach. Potencjalne antygeny nowotworowe mogą powstać w drodze mutacji, infekcji wirusowej, aktywacji wyłączonych genów lub tzw. amplifikacji klonalnej. Produkty zmutowanych genów, antygeny wirusowe lub unikalne sekwencje, jakimi są np. fragmenty idiotypowe immunoglobulin w chłoniakach wywodzących się z limfocytów B, mogą być potencjalnie rozpoznawane przez układ immunologiczny jako obce antygeny. Tym samym, w większości przypadków komórki nowotworowe mające takie antygeny powinny być łatwo eliminowane. Jak powszechnie wiadomo – tak się, niestety, nie dzieje. Komórki nowotworowe mogą uciec spod nadzoru immunologicznego lub być niezdolne do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Przyjmuje się, że komórki nowotworowe są genetycznie i fenotypowo znacznie mniej stabilne niż zdrowe komórki i mogą przez to bardzo szybko zaadaptować się do nowych warunków i uniknąć destrukcji. Liczne są sposoby, dzięki którym komórki mogą stać się nierozpoznawalne dla układu immunologicznego. Wprawdzie komórki nowotworowe mogą wykazywać ekspresję zmutowanych białek, mogą one jednak nie wiązać się z molekułami MHC. Uszkodzenie procesu prezentacji antygenów lub brak ekspresji MHC na komórkach nowotworowych mogłoby wyjaśnić, dlaczego komórki nowotworowe nie mogą być rozpoznane i niszczone przez swoiste limfocyty T. W żaden sposób nie tłumaczy to jednak braku znaczącej liczby swoistych limfocytów T, które mogą reagować z antygenami nowotworowymi. Ponieważ indukcja odpowiedzi immunologicznej odbywa się poprzez komórki dendrytyczne w procesie *cross-primingu,* prezentacja antygenów na komórce nowotworowej nie jest w tej fazie konieczna. Tym samym znalezienie swoistych limfocytów T nie powinno być problemem. Jak wiadomo, takich limfocytów we krwi obwodowej się jednak nie wykrywa w znaczącej liczbie. Brak swoistych limfocytów może być tłumaczony obecnością czynników, które negatywnie wpływają na całkowitą odpowiedź immunologiczną. W wielu przypadkach chorób nowotworowych rzeczywiście obserwuje się defekty odpowiedzi immunologicznej, jednakże w badaniach modelowych z użyciem zwierząt laboratoryjnych w pełni immunokompetentnych także nie obserwuje się odpowiedzi na komórki nowotworowe [22]. Wydaje się zatem, że musi istnieć bardziej ogólna przyczyna takiego niezwykłego zachowania się układu immunologicznego. Podobnie do innych tkanek, komórki nowotworowe nie wykazują ekspresji molekuł kostymulujących. Antygeny prezentowane przez komórki nowotworowe będą prowadzić do stanu tolerancji, nawet mimo ich całkowicie obcego charakteru. Zakładając, że komórki nowotworowe nie wyrządzają początkowo żadnych szkód w swoim bezpośrednim otoczeniu, nie będą zatem rozpoznawane jako zagrożenie i będą całkowicie ignorowane przez układ immunologiczny. Uszkodzenie otaczających tkanek lub nekroza, które mogłyby aktywować komórki dendrytyczne pojawiają się późno w czasie rozwoju nowotworu, zwykle po wielu latach ukrytego wzrostu. W tym czasie bardzo prawdopodobne jest rozwinięcie się stanu tolerancji. Co więcej, nekroza w guzie nowotworowym występuje na ogół w jego centralnej części i otoczona jest *zdrowymi* komórkami nowotworowymi, które skutecznie blokują dostęp do niej komórkom dendrytycznym [25]. Także taka sytuacja nie jest optymalna, by zapoczątkować odpowiedź immunologiczną. Duże guzy nowotworowe posiadają również kolejną cechę utrudniającą działanie układu immunologicznego. Nawet w przypadku efektywnej odpowiedzi immunologicznej indukowa-

nej, np. odpowiednią szczepionką, model zagrożenia przewiduje, że wywołana szczepieniem odpowiedź ulega wygaszeniu. Na zahamowanie odpowiedzi wpłynie ograniczona żywotność limfocytów efektorowych (zob. reguły powyżej) oraz ponownie brak sygnału zagrożenia, który mógłby podtrzymywać proces powstawania nowych komórek efektorowych. Efektorowe limfocyty T zabijają komórki nowotworowe na drodze indukcji apoptozy, która nie wywołuje sygnału zagrożenia (jakkolwiek istnieją dowody przeczące temu założeniu), koniecznego dla wzmocnienia lub podtrzymania toczącej się odpowiedzi. W konsekwencji, pozostałe komórki nowotworowe przeżyją nie dlatego, że uciekły w jakiś sposób spod nadzoru immunologicznego, lecz dlatego, że układ immunologiczny przestał na nie odpowiadać sam z siebie [4].

PODSUMOWANIE

Wprawdzie opisano wiele mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego, model sygnału zagrożenia wyjaśnia w bardzo ogólny, prosty sposób, dlaczego komórki nowotworowe nie wywołują odpowiedzi immunologicznej nawet mimo całkowitej obcości antygenów nowotworowych. Guzy nowotworowe nie dostarczają sygnału zagrożenia dla komórek dendrytycznych i nie aktywują w ten sposób układu immunologicznego. Potencjalne, swoiste limfocyty T swój pierwszy kontakt z antygenami nowotworowymi mają zatem albo na komórkach nowotworowych, albo na spoczynkowych komórkach dendrytycznych. Ponieważ w obu sytuacjach nie ma odpowiedniej kostymulacji, swoiste limfocyty T ulegną anergii lub apoptozie, co w efekcie końcowym prowadzi do stanu tolerancji [26].

PIŚMIENNICTWO

1. Matzinger P. *Tolerance, danger, and the extended family.* Annu Rev Immunol 1994; 12: 991-1045.
2. Janeway CA Jr. *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self.* Immunol Today 1992; 13: 11-6.
3. Matzinger P. *An innate sense of danger.* Semin Immunol 1998; 10: 399-415.
4. Fuchs EJ, Matzinger P. *Is cancer dangerous to the immune system?* Semin Immunol 1996; 8: 271-80.
5. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T--killer cell.* Nature 1998; 393: 474-8.
6. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.* Nature 1998; 393: 480-3.
7. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. *Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.* Nature 1998; 393: 478-80.
8. Wu Y, Liu Y. *Viral induction of co-stimulatory activity on antigen-presenting cells bypasses the need for CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses.* Curr Biol 1994; 4: 499-505.
9. Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC. *A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier.* Virology 1996; 219: 220-7.
10. Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT. *Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells.* J Immunol 2001; 166: 5346-55.
11. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein.* Science 1993; 259: 1745-9.
12. Kowalczyk DW, Ertl HC. *Immune responses to DNA vaccines.* Cell Mol Life Sci 1999; 55: 751-70.
13. Suto R, Srivastava PK. *A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides.* Science 1995; 269: 1585-8.
14. Udono H, Levey DL, Srivastava PK. *Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo.* Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1994; 91: 3077-81.
15. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. *CD91: a receptor for heat shock protein gp96.* Nat Immunol 2000; 1: 151-5.
16. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. *CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin.* Immunity 2001; 14: 303-13.
17. Galluci S, Matzinger P. *Danger signals: SOS to the immune system.* Curr Opin Immunol 2001; 13: 114-9.
18. Fields PA, Kowalczyk DW, Arruda VR, Armstrong E, McCleland ML, Hagstrom JN, Pasi KJ, Ertl HC, Herzog RW, High KA. *Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX.* Mol Ther 2000; 1: 225-35.
19. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, *Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.* Science 1996; 274: 94-6.
20. Kowalczyk DW, Wlazlo AP, Giles-Davis W, Ertl HC. *Staining of antigen activated lymphocytes (SAAL): a highly specific method for flow cytometric quantitation of tumor-specific CD8 (+) T cells.* J Immunol Methods 2000; 241: 131-9.
21. He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW, Cheng J, Xiang ZQ, Giles-Davis W, *Ertl HC. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16.* Virology 2000; 270: 146-61.
22. Kowalczyk DW, Wlazlo AP, Blaszczyk--Thurin M, Xiang ZQ, Giles-Davis W, Ertl HC. *A method that allows easy characterization of tumor-infiltrating lymphocytes.* J Immunol Methods 2001; 253: 163-75.
23. Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM. *Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers.* J Virol 1998; 72: 4212-23.
24. Fuchs EJ, Matzinger P. *B cells turn off virgin but not memory T cells.* Science 1992; 258: 1156-9.
25. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. *In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas.* J Exp Med 1999; 190: 1417-26.
26. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. *Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1998; 95: 1178-83.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. Dariusz W. Kowalczyk
Zakład Diagnostyki
i Immunologii Nowotworów
Wielkopolskie Centrum Onkologii
Akademia Medyczna
im. Karola Marcinkowskiego
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: dkowalczyk@wco.pl
tel. (061) 854 06 67