

STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena sekrecji cytokin oraz aktywności telomerazy i długości telomerów w populacjach komórek dendrytycznych (DCs) generowanych z krwi i tkanek limfatycznych zwierząt zakażonych wirusem białaczki bydła (BLV).

Komórki dendrytyczne wygenerowano *in vitro* z monocytów (MoDCs) krwi, szpiku, śledziony i węzłów chłonnych zwierząt naturalnie zakażonych BLV w stadium aleukemicznym. Grupę kontrolną stanowiły komórki dendrytyczne zwierząt niezakażonych. Analogiczne hodowle DCs uzyskane z tkanek zwierząt wolnych od BLV zakażano *in vitro* wirusem pochodzącym z supernatantu hodowli linii komórkowej FLK/BLV. Obecność prowirusa BLV w komórkach dendrytycznych potwierdzano metodami molekularnymi: nested PCR i *in situ* PCR.

W hodowlach MoDCs pochodzących z tkanek zwierząt naturalnie zakażonych, niezakażonych oraz MoDCs zakażonych BLV *in vitro*, przy pomocy testów ELISA oznaczano profile sekrecyjne: IL-6, IL-10, IL-12(p40) i IL-12(p70).

Z krwi zwierząt zakażonych i niezakażonych BLV izolowano mieloidalne DCs (mDCs), plazmacytoidalne DCs (pDCs) oraz monocyty, z których *in vitro* generowano MoDCs. W hodowlach tych metodą cytometrii przepływowej oznaczono poziom: IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IFN- γ i TNF- α .

Następnie, metodą immunofluorescencji (IF) analizowano obecność telomerazy w DCs (krwi, szpiku, śledziony i węzłów chłonnych) zwierząt zakażonych i niezakażonych BLV. Wyniki porównano z nowotworowymi liniami komórkowymi (HeLa, 1301, Jurkat i FLK/BLV).

Aktywność telomerazy oznaczano metodą real-time PCR w populacjach: mDCs, pDCs i MoDCs oraz liniach komórkowych (HeLa, 1301, Jurkat i FLK/BLV).

Metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) badano długość sekwencji telomerowych w komórkach dendrytycznych (mDCs, pDCs oraz MoDCs) zwierząt zakażonych BLV oraz zwierząt kontrolnych.

Metodami molekularnymi (nested i *in situ* PCR) wykryto obecność prowirusa BLV we wszystkich hodowlach MoDCs zakażonych *in vitro* i wszystkich MoDCs pochodzących od zwierząt naturalnie zakażonych.

Testem ELISA wykazano, że komórki dendrytyczne generowane z krwi zwierząt zakażonych BLV charakteryzowały się statystycznie istotnym wzrostem sekrecji IL-6, IL-10 i IL-12(p40) w porównaniu do grupy kontrolnej. W populacji MoDCs izolowanych ze szpiku, nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w produkcji badanych cytokin. W MoDCs

pochodzących ze śledziony i węzłów chłonnych zakażonych zwierząt, w porównaniu do grupy kontrolnej odnotowano statystycznie istotny wzrost sekrecji cytokin Th2 (IL-10 i IL-6) przy jednoczesnym spadku produkcji Th1 (obu form IL-12). Sugerować to może osłabienie odpowiedzi immunologicznej, typowe dla przewlekłych infekcji wirusowych. W hodowlach MoDCs zakażanych *in vitro* BLV zaobserwowano znacznie niższą sekrecję wszystkich badanych cytokin.

Metodą cytometrii przepływowej wykazano, że supernatanty populacji mDCs zakażonych BLV charakteryzowały się wzrostem poziomu IL-12(p70) i IL-10 oraz zmniejszeniem poziomu IFN- γ w porównaniu do grupy kontrolnej. W pDCs zakażonych BLV zaobserwowano statystycznie istotny wzrost sekrecji IFN- γ , co wskazuje na udział tej populacji w aktywacji odpowiedzi Th1. Zakażone MoDCs charakteryzowały się zwiększoną produkcją IL-6, IL-12 (p40), a także TNF- α . W grupie tej poziom IL-10 również był podwyższony, nie były to jednak różnice statystycznie istotne. Pobudzenie produkcji cytokin Th1 i Th2 może świadczyć o aktywacji tej populacji komórek w patogenezie zakażenia BLV.

W komórkach dendrytycznych pochodzących z krwi i tkanek limfatycznych zwierząt zakażonych BLV wykazano obecność telomerazy. Obecność tego enzymu potwierdzono także w liniach komórkowych HeLa, 1301 i FLK/BLV. W badanych populacjach: mDCs, pDCs i MoDCs zwierząt zakażonych wirusem białaczki wykazano wzrost aktywności telomerazy. Wysoką aktywność tego enzymu odnotowano także w liniach: HeLa, 1301, FLK/BLV, natomiast w linii Jurkat nie stwierdzono aktywności telomerazy.

Na podstawie badań metodą FISH wykazano, że zakażone BLV komórki dendrytyczne należące do wszystkich analizowanych populacji charakteryzowały się krótszymi telomerami w porównaniu do grupy kontrolnej.

Różnice w profilach sekrecyjnych badanych populacji DCs wskazują na ich odmienne role w przebiegu infekcji BLV. Komórki dendrytyczne generowane *in vitro* ze śledziony i węzłów chłonnych cechował wzrost sekrecji cytokin typu Th2 i spadek produkcji cytokin Th1, co może sprzyjać rozwojowi zakażenia BLV oraz progresji procesu nowotworowego. Komórki dendrytyczne izolowane *in vitro* z krwi charakteryzowały się wzrostem sekrecji cytokin Th1 oraz Th2, co sugeruje aktywację tej populacji komórek w patogenezie zakażenia BLV. Populacja naturalnie zakażonych mDCs wykazywała wzrost sekrecji IL-10 i zmniejszoną produkcję IFN- γ , co wskazuje na hamujący wpływ zakażenia BLV na tę populację DCs. Plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (pDCs) wyróżniały się znacznym wzrostem sekrecji IFN- γ , co może wskazywać na udział tej populacji w aktywacji odpowiedzi Th1. Spadek produkcji cytokin w komórkach dendrytycznych zakażonych *in vitro* sugeruje supresyjne działanie wirusa w początkowej fazie zakażenia. Ponadto, populacje DCs charakteryzujące się zwiększoną sekrecją IL-6 i IL-10 mogą odgrywać rolę w

mechanizmach latencji i onkogenezy BLV. Wykazano, że zakażenie BLV powoduje wzrost aktywności telomerazy i skracanie sekwencji telomerowych we wszystkich badanych populacjach komórek dendrytycznych.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate secretion profile, telomerase activity and telomere length in dendritic cells (DCs) generated from blood and lymphatic tissues of animals infected with bovine leukemia virus (BLV).

Dendritic cells were *in vitro* generated from monocytes (MoDCs) of blood, bone marrow, spleen and lymph nodes from animals naturally infected with BLV in an aleukemic state. DCs from uninfected animals were used as a negative control. Analogous cultures of DCs originated from tissues of BLV-negative animals were *in vitro* infected with virus from FLK/BLV cell line supernatant. Infection was confirmed by nested PCR and *in situ* PCR.

In cultures of MoDCs originated from infected animals and in MoDCs infected *in vitro* - IL-6, IL-10, IL-12(p40) and IL-12(p70) profiles were analysed. Level of these cytokines was determined in supernatants from MoDCs cultivation by ELISA tests.

Mieloid DCs (mDCs), plasmacytoid DCs (pDCs) and monocytes were isolated from blood of BLV-positive and BLV-negative animals. MoDCs were generated *in vitro*. In cultures of these DCs populations IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IFN- γ and TNF- α profiles were analysed by flow cytometry.

Next, presence of telomerase in MoDCs (blood, bone marrow, spleen, lymph nodes) of BLV-positive and BLV-negative animals was analysed by immunofluorescence (IF). The results of this analysis were compared with telomerase detection in tumorous cell lines (HeLa, 1301, Jurkat and FLK/BLV) by IF.

Telomerase activity was measured in mDCs, pDCs, MoDCs and cell lines (HeLa, 1301, Jurkat and FLK/BLV) by real-time PCR.

Telomere sequences length was analysed in populations of mDCs, pDCs and MoDCs from BLV-infected and control animals by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

The presence of BLV provirus was detected in both MoDCs *in vitro* infected and generated from infected animals, by nested and *in situ* PCR. Dendritic cells generated from blood of BLV-positive animals were characterised by higher secretion of IL-6, IL-10 and IL-12(p40), compared to control group. In cultures of bone marrow MoDCs, no statistically significant differences in cytokines production were observed. In MoDCs originated from spleen and lymph nodes of infected animals increase in Th2 cytokines (IL-10 and IL-6) secretion and decrease in Th1 (both forms of IL-12) production was noted, compared to control group. It may suggest impairment of immune

system, typical for chronic viral infections. In cultures of MoDCs *in vitro* infected with BLV significantly lower secretion of almost all analysed cytokines was observed.

Flow cytometry investigations showed increase of IL-12(p70) and IL-10 but decrease of IFN- γ levels in supernatants of BLV infected mDCs. In BLV-positive pDCs secretion of IFN- γ was significantly higher, which may suggest participation of this population in activation of Th1 response. BLV infected MoDCs were characterised by elevated production of IL-6, IL-12(p40) and TNF- α . In this group the level of IL-10 was increased, but this discrepancy was not statistically significant. Induction of Th1 and Th2 cytokines production may indicate activation of this cells population during BLV infection.

In dendritic cells generated from tissues of BLV-positive animals the presence of telomerase was detected. In HeLa, 1301 and FLK/BLV cell lines telomerase was also confirmed.

In mDCs, pDCs and MoDCs from BLV infected animals telomerase activity was elevated, compared to DCs of uninfected animals. High activity of this enzyme was also confirmed in HeLa, 1301 and FLK/BLV cell lines, while it was not detected in Jurkat cell line.

The results of FISH indicated that all analysed populations of dendritic cells infected with BLV were characterised by shorter telomeres, compared to control group.

The differences in cytokines profiles suggest engagement of analysed DCs populations in diverse roles in pathogenesis of bovine leukemia virus. Dendritic cells generated *in vitro* from spleen and lymph nodes were characterized by increase in Th2 cytokines and decrease in Th1, which may favour progression of BLV infection and oncogenesis. MoDCs isolated from blood showed elevation in Th1 and Th2 cytokines secretion suggesting activation of this population during BLV infection. Population of naturally infected mDCs was characterized by increase in IL-10 production and decrease in IFN- γ , which may imply suppressing influence of BLV infection on this cell population. Infected pDCs showed significant increase in IFN- γ secretion, suggesting contribution of this population to Th1 activation. Decrease in cytokine production in dendritic cells *in vitro* infected with BLV suggests suppressive effect of virus, early after infection. BLV infected dendritic cells through higher production of IL-6 and IL-10 may play contributory role in viral latency and oncogenesis. Additionally, BLV infection caused telomerase reactivation and telomere shortening.