

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie a genetiky eukaryot



Bc. Kamila Kloudová

Význam detekce regulačních T lymfocytů a rozdíly v expresi nádorových antigenů
u ovariálního karcinomu

Impact of the regulatory T cells detection and differences in expression of tumor
antigens in ovarian cancer

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Luděk Sojka, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. 4. 2014.

Podpis:

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Lud'ku Sojkovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce. Děkuji i prof. MUDr. Radku Špíškovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Simoně Partlové za trpělivost a čas, který mi při psaní této práce věnovala.

Děkuji celé své rodině a přátelům za podporu nejen při tvorbě této diplomové práce, ale během celého mého studia.

Abstrakt

Regulační T lymfocyty (Treg) hrají klíčovou roli v udržování imunitní tolerance. Potlačují vznik autoimunitních onemocnění a přispívají k udržení homeostázy imunitního systému. Expanze a nadměrná schopnost regulačních T lymfocytů tlumit imunitní reakci je ve zvýšené míře pozorována také u řady nádorových onemocnění. Dochází k inhibici protinádorové imunitní odpovědi a regulační T lymfocyty tedy přispívají k progresi nádorového onemocnění. Možnost specifické detekce regulačních T lymfocytů na základě jejich fenotypu a analýza jejich funkčních vlastností by mohla přispět k monitorování dynamiky jejich počtu a případně sloužit k přesnějšímu monitorování a nastavení protinádorové imunoterapie. Nádorové buňky exprimují řadu tzv. nádorových antigenů, které mohou sloužit jako cíl protinádorové imunitní odpovědi. Pro racionální úvahy o relevanci jednotlivých nádorových antigenů pro využití v protinádorové imunoterapii je důležité získat informaci o jejich expresi nejen na dostupných nádorových liniích, ale i na primárních nádorových buňkách izolovaných během chirurgických výkonů.

V první části této práce jsem se zabývala kvantitativní analýzou regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni a periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem pomocí nově zavedené metody metyl-senzitivní kvantitativní PCR (MS-qPCR) a pomocí průtokové cytometrie. U těchto pacientek jsem zjistila signifikantně vyšší hladinu regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni v porovnání s periferní krví. Zastoupení regulačních T lymfocytů v periferní krvi pacientek a zdravých dárců se téměř neliší. Navíc, frekvence regulačních T lymfocytů pozitivně koreluje s mírou aktivace těchto buněk v nádorové tkáni i v periferní krvi.

V druhé části práce jsem se zabývala měřením exprese vybraných nádorových antigenů u nádorových linií a na buňkách izolovaných z nádorové tkáně pacientek s karcinomem ovaria. Signifikantní rozdíl v expresi mezi skupinou pacientek a zdravých dárců jsem detekovala u šesti z patnácti vyšetřovaných antigenů. Rozdíly v antigenním profilu pacientek diagnostikovaných v časném a pozdním stádiu nebyly signifikantní. Lze tedy usuzovat, že během rozvoje onemocnění nedochází ke změně v expresi měřených nádorových antigenů. Dále jsem pozorovala velkou variabilitu mezi antigeny exprimovanými primárními nádorovými buňkami pacientek a nádorovými liniemi OV-90 a SK-OV-3 a dokonce mezi liniemi samotnými.

Klíčová slova

Regulační T lymfocyty, karcinom ovaria, nádorová onemocnění, FoxP3, nádorové antigeny, nádorové linie

Abstract

Regulatory T cells (Treg) play a key role in maintaining the immune tolerance. They suppress development of autoimmune diseases and contribute to maintaining the homeostasis of the immune system. Expansion and excessive ability of regulatory T cells to suppress the immune response is increasingly observed also at many types of cancer. Due to the active inhibition of the antitumor immune response Treg contribute to tumor progression. Specific phenotype based detection and analysis of Treg functional properties may contribute to the successful monitoring of Treg accounts and to the effective cancer immunotherapy itself.

Tumor cells express high amounts of so-called tumor antigens, which may play a key role in the antitumor immune response. Expression level of the tumor antigens gives the evidence about relevancy of each antigen in the specific immune response and efficiency of cancer immunotherapy. These data are obviously important to be obtained from the tumor cell lines as well as primary tumor cells.

In the first part of the thesis I was focusing on the quantitative analysis of regulatory T cells in tumor tissue and peripheral blood of patients with ovarian cancer. For this purpose I used the newly introduced methyl-sensitive quantitative PCR (MS-qPCR) method and compare the data with the widely used flow cytometry approach. I found significantly higher level of regulatory T cells in the tumor tissue if compared with the level of these cells in periphery. The ratio of regulatory T cells in peripheral blood of patients and healthy donors was almost identical. Moreover, frequency of regulatory T cells was positively correlating with the highly activated stage of these cells in periphery.

In the second part of the study I measured the expression of selected tumor antigens. Expression profiles were obtained for the ovarian cancer cell lines and also for cells isolated from the tumor tissue of selected ovarian cancer patients. I detected the significant difference of expression in case of five of the group of fifteen tumor antigens investigated in total. There was no difference of the antigens expression in case of the different stages of the disease. Therefore I can conclude that antigen expression is not affected during the course of ovarian cancer. In addition I observed large variability among tumor antigens expressed on patient's primary tumor cells and cancer cell lines OV-90 and SK-OV-3 and also even among the cell lines themselves.

Keywords

Regulatory T cells, ovarian cancer, cancer, FoxP3, tumor antigens, cancer cell lines

Obsah

Abstrakt.....	3
Klíčová slova	4
Abstract.....	5
Keywords	6
Obsah	7
Seznam zkratek	9
1. Úvod.....	11
2. Literární přehled	13
2.1. Imunitní systém.....	13
2.1.1. Regulace imunitní odpovědi	14
2.1.2. Nádorová imunologie.....	15
2.1.3. Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému hostitele	16
2.2. Regulační T lymfocyty	18
2.2.1. Vývoj regulačních T lymfocytů	19
2.2.2. Subpopulace regulačních T lymfocytů.....	20
2.3. Přirozeně se vyskytující regulační T lymfocyty (nTreg).....	21
2.3.1. Fyziologická funkce a fenotypové markery nTreg	21
2.3.2. Kvantitativní analýza nTreg.....	23
2.4. Ovariální karcinom	27
2.5. Treg a nádorová onemocnění.....	28
2.5.1. Role Treg u ovariálního karcinomu	29
2.5.2. Role Treg v léčbě nádorů	29
2.6. Nádorové antigeny asociované s ovariálním karcinomem	31
3. Cíle práce.....	34
4. Materiál a metody.....	35
4.1. Materiál	35
4.2. Výběr pacientů a analyzovaný materiál.....	38
4.3. Metody	38
4.3.1. Příprava standardu pro MS-qPCR.....	38
4.3.1.2. Příprava inzertů	39
4.3.1.3. Ligace inzertu do plazmidu	40
4.3.1.4. Transformace buněk <i>Escherichia coli</i>	41
4.3.1.5. Koloniová PCR.....	41
4.3.1.6. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu	41
4.3.1.7. Izolace plazmidové DNA z bakterie <i>Escherichia coli</i>	42

4.3.1.8.	Příprava ředící řady plazmidového standardu	45
4.3.2.	Zpracování vzorků pro specifickou detekci a kvantifikaci Treg.....	45
4.3.2.1.	Zpracování nádorové tkáně a příprava buněčné suspenze	45
4.3.2.2.	Zpracování periferní krve a příprava buněčné suspenze	46
4.3.3.	Analýza pomocí průtokového cytometru	47
4.3.4.	Analýza pomocí MS-qPCR.....	49
4.3.4.1.	Izolace genomové DNA ze zamražených buněk nádorové tkáně a ze zamražených mononukleárních buněk	49
4.3.4.2.	Ošetření DNA bisulfitem sodným	49
4.3.4.3.	Metyl senzitivní kvantitativní PCR (MS-qPCR).....	51
4.3.4.4.	Analýza dat získaných pomocí metyl senzitivní qPCR.....	52
4.3.5.	Příprava cDNA pro stanovení expresního profilu nádorových linií OV-90 a SK-OV-3, primárních nádorových buněk pacientek s ovariálním karcinomem a periferní krve zdravých kontrol.....	52
4.3.5.1.	Pasážování nádorových linií OV-90 a SK-OV-3	52
4.3.5.2.	Příprava buněčného lyzátu	53
4.3.5.3.	Izolace RNA z buněčného lyzátu	53
4.3.5.4.	Měření stupně integrity a koncentrace RNA	54
4.3.5.5.	Reverzní transkripce	55
4.3.5.6.	Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	56
5.	Výsledky	58
5.1.	Příprava standardu pro kvantitativní analýzu Treg pomocí MS-qPCR.....	60
5.1.1.	Ověření jednotlivých klonů pro úspěšnost transformace	60
5.1.2.	Ověření kvality izolované plazmidové DNA.....	61
5.1.3.	Ředící řada a standardní křivka metylovaného a demetylovaného plazmidu ..	63
5.2.	Kvantitativní analýza Treg pomocí průtokové cytometrie	64
5.3.	Kvantitativní analýza nTreg pomocí Ms-qPCR.....	66
5.4.	Sledování expresního profilu nádorových antigenů karcinomu ovaria	69
6.	Diskuze	73
7.	Závěr	78
8.	Seznam použité literatury	80

Seznam zkratek

APC	antigen prezentující buňka
Bax	protein X asociovaný s Bcl-2
Bcl-2	proapoptotický protein Bcl-2
BIRC-5	bakulovirový inhibitor apoptózy
CA-125	nádorový antigen 125
CD	diferenční antigen
CEA	karcinoembryonální antigen
Cq	cyklus kvantifikace
CREB/ATF	„cAMP response element binding/Activating transcription factor“
CTA	nádorový testikulární antigen
CTLA-4	cytotoxický T lymfocytární antigen
DDX-45	nádorový testikulární antigen 13
DMSO	dimethyl sulfoxid
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EpCAM	molekula epiteliální buněčné adheze
Ets-1	transkripční faktor Ets-1
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA
FOLR-1	folátový receptor 1
FoxP3	gen pro „forkhead box P3“
GITR	gen ze skupiny receptorů tumor nekrotizujících faktorů indukovaný glukokortikoidy
Her-2/neu	receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor
IFN- γ	interferon gamma
iH ₂ O	injekční voda
IL	interleukin
IPEX	syndrom imunitní deregulace, polyendokrinopatie a enteropatie vázaný na chromozom X
iTreg	indukovaný regulační T lymfocyt
LAG-3	lymfocytární aktivační gen 3
MAGE	antigen 1 asociovaný s melanomem
MHC	hlavní histokompatibilní komplex

MS-qPCR	metyl-senzitivní kvantitativní polymerázová řetězová reakce
MUC-1	Mucin 1
NF κ B	„Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells“
NK buňky	přirození zabíječi („natural killer“)
nTreg	přirozeně se vyskytující regulační T lymfocyt
NY-ESO-1	nádorový testikulární antigen 1
OX-40	sekundární kostimulační receptor OX-40 rodiny TNFR
PBMC	periferní mononukleární buňky
PCD	programovaná buněčná smrt
PD-1	receptor programované buněčné smrti 1
PD-1L	ligand programované buněčné smrti 1
PRAME	antigen preferenčně exprimovaný u melanomu
RAG	rekombinace aktivující gen
STAT5	signální přenašeč a aktivátor transkripce 5
TAA	antigen asociovaný s nádorem
TAE	tris-acetát-EDTA
Tc	cytotoxický T lymfocyt
TCR	receptor T lymfocytu pro antigen
TGF- β	transformující růstový faktor beta
Th	pomocný T lymfocyt
TIL	tumor infiltrující lymfocyt
TIM-3	„T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3“
TPBG	glykoprotein trofoblastu
Treg	regulační T lymfocyt
TRT	telomeráza – reverzní transkriptáza
Tr1	regulační T lymfocyt typu 1
TSDR	demetylovaný region specifický pro Treg

1. Úvod

Ovariální karcinom je pátým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a řadí se mezi gynekologické nádory s nejvyšší mortalitou. Každý rok je ve světě diagnostikováno více než 200 000 nových případů, přičemž Česká republika spolu s Baltskými státy patří k zemím s nejvyšší incidencí tohoto onemocnění. Vzhledem k absenci závažnějších symptomů v raných stádiích onemocnění a také nedostatku specifických a senzitivních biomarkerů je většina pacientek diagnostikována v pozdních stádiích onemocnění, které je již těžce léčitelné současnými léčebnými postupy (www.iarc.fr). Zároveň existuje řada prací, které prokazují, že s progresí onemocnění dochází k inhibici protinádorové imunitní odpovědi namířené proti nádorovým buňkám. Jednou z příčin způsobující oslabenou protinádorovou imunitní odpověď je akumulace regulačních T lymfocytů (Treg) v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek. V současné době existuje mnoho publikací, které potvrzují, že regulační T lymfocyty aktivně potlačují protinádorovou imunitní odpověď a tím zřejmě přispívají k progresi onemocnění (Yang a Ansell, 2009). U zdravých lidí jsou regulační T lymfocyty zcela nezastupitelnou buněčnou populací, která má klíčovou roli v zajištění periferní tolerance. Regulační T lymfocyty inhibují autoreaktivní T lymfocyty, které jsou přítomny v organismu a tím brání rozvoji autoimunitní reakce. Důležitost tohoto procesu byla u lidí prokázána po identifikaci pacientů, kteří nemají funkční gen pro transkripční faktor FoxP3 a nedochází u nich tedy k vývoji funkčních regulačních T lymfocytů. Onemocnění je označováno jako IPEX, je vázané na X chromozom a u postižených chlapců dochází v prvních měsících života k rozvoji smrtelných autoimunitních onemocnění (Bennett *et al.*, 2001).

Regulační T lymfocyty se v organismu vyskytují ve dvou funkčně i fenotypově odlišných subpopulacích a dodnes neexistuje jednotný názor na to, jakou roli v nádorové imunosupresi jednotlivé subpopulace sehrávají. Data ohledně rozdílu v počtu regulačních T lymfocytů v periferní krvi u pacientů s nádorovým onemocněním a u zdravých kontrol jsou kontroverzní. U některých nádorových onemocnění byla ale poměrně přesvědčivě prokázána pozitivní korelace mezi hladinou regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni a rozsahem onemocnění. Díky své schopnosti inhibovat imunitní odpověď tvoří vysoké množství těchto imunosupresivních buněk v nádorové tkáni jednu z hlavních překážek účinné nádorové imunoterapie (Yao *et al.*, 2012).

V posledních letech se výzkumné úsilí zaměřuje na hledání znaků, které spolehlivě odlišují jednotlivé subpopulace Treg. To je nezbytné pro přesné pochopení role subtypů Treg při vzniku a progresi nádorového onemocnění a v inhibici protinádorové imunitní reakce.

Včasná diagnostika v raných stádiích a brzké zahájení vhodné léčby by mohly výrazně zlepšit průběh onemocnění a především šanci na úspěšné vyléčení pacientek. Za tímto účelem je potřeba nalézt nové specifické biomarkery, které by mohly sloužit jak pro časnou detekci onemocnění, tak následně pro monitorování úspěšnosti léčby a časnou detekci relapsu nemoci. To by umožnilo dřívější identifikaci pacientek v časném stádiu relapsu a tyto ženy by následně mohly být léčeny agresivnějšími léčebnými metodami.

Spektrum exprimovaných nádorových antigenů je u různých histologických typů nádorů odlišné. Doposud byla popsána celá řada takových antigenů, jejichž zvýšená exprese je pozorována u pacientek s karcinomem ovaria (Chatterjee *et al.*, 2006). Nicméně dodnes nebyl žádný z těchto antigenů testován jako spolehlivý marker použitelný pro diagnostické účely a pro sledování progresu daného onemocnění.

V rámci této diplomové práce jsem se zaměřila na analýzu dvou aspektů nádorového mikroprostředí pacientek s ovariálním karcinomem. V první části jsem se zaměřila na detekci a kvantifikaci regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek a dále na míru aktivace těchto buněk, která je nepostradatelným aspektem jejich funkčnosti. V druhé části práce jsem na základě nejnovějších informací, dostupných z odborné literatury, vybrala panel nádorových antigenů charakteristických pro nádorové buňky ovariálního karcinomu a stanovila expresní profil primárních nádorových buněk a dvou běžně používaných nádorových linií. Naměřená data jsem korelovala se stádiem onemocnění.

2. Literární přehled

2.1. Imunitní systém

Imunitní systém je spolu s nervovým a hormonálním systémem jedním z klíčových mechanismů udržujících homeostázu organismu. Tato jedinečná a zároveň nepostradatelná vlastnost spočívá ve schopnosti imunitního systému rozlišovat mezi strukturami potenciálně škodlivými od těch neškodných a to jak u cizích struktur, tak i struktur těla vlastních. Hlavní funkcí imunitního systému je tedy obrana nejen proti patogenním mikroorganismům, ale i proti vlastním buňkám, které jsou poškozené, staré nebo mutované. Neméně důležitou funkcí imunitního systému je naopak rozpoznávání vlastních zdravých tkání a navozování či udržování imunologické tolerance vůči nim (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Pro efektivní fungování imunitního systému je zapotřebí interakce a vzájemná kooperace dvou jeho základních složek: nespecifické imunity a antigenně specifické, která se ale objevila poprvé v evoluci až u obratlovců. Důležitou roli v obraně organismu proti infekci hraje také neporušená integrita kůže a slizničních bariér.

Nespecifická (přirozená) imunita je evolučně starší a je přítomna u všech mnohobuněčných organismů. Mechanismus jejího fungování je založen na okamžité reakci buněčných složek (makrofágy, NK buňky, granulocyty) i humorálních složek (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny) na přítomnost patogenu v organismu. Nespecifická složka imunitního systému je mnohdy pro eliminaci patogenního agens dostačující a k zapojení specifické složky tudíž ani nemusí dojít (Špíšek *et al.*, 2009).

Antigenně specifická (adaptivní) imunita je ústřední regulační a efektorovou složkou imunitního systému obratlovců. Mechanismus, na kterém je založeno její fungování ale vyžaduje kooperaci se složkami nespecifické imunity. Jedná se o velmi komplexní systém, založený na existenci vysoce specifických molekul, které rozeznávají jakoukoli potenciálně cizorodou strukturu pomocí širokého repertoáru antigenně specifických receptorů či protilátek (Krejsek a Kopecký 2004). Zcela jedinečnou vlastností specifické složky je tzv. imunologická paměť, díky níž dokáže imunitní systém při opakovaném setkání s určitým antigenem reagovat mnohem rychleji a intenzivněji. Buněčnou složku specifické imunity tvoří T a B lymfocyty, zatímco humorální složka je zprostředkována protilátkami.

T lymfocyty, reprezentující specifickou složku, jsou skutečným svorníkem celého imunitního systému. Jejich funkční rozsah je vymežován dvěma hlavními populacemi T buněk, a to pomocnými T buňkami (Th) a cytotoxickými T buňkami (Tc). Tyto dvě populace se od sebe vzájemně odlišují expresí povrchových molekul. Pro Th buňky je specifická exprese povrchové molekuly CD4, zatímco Tc buňky jsou charakterizovány expresí povrchové molekuly CD8 (Hořejší a Bartůňková, 2005).

CD4+ Th buňky zahrnují několik buněčných subpopulací vzájemně se odlišujících cytokinovým profilem a výsledným působením. Th1 buňky produkují především interleukin 2 (IL-2) a interferon gamma (IFN- γ), Th2 buňky produkují zejména IL-4, IL-5 a IL-13. Nedávno identifikované Th17 buňky jsou charakteristické produkcí IL-17, IL-21 a IL-22. Pro buňky s regulačními vlastnostmi je typická vysoká produkce transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) v případě Th3 buněk. Pro Tr1 buňky je specifický IL-10 (Janeway *et al.*, 2012). Regulační T lymfocyty (Treg), které exprimují ve velké míře tlumivé cytokiny IL-10 a TGF- β , sehrávají dle nejnovějších poznatků významnou roli v protinádorové imunitě a také u různých autoimunitních onemocnění (Shevach, 2002).

2.1.1. Regulace imunitní odpovědi

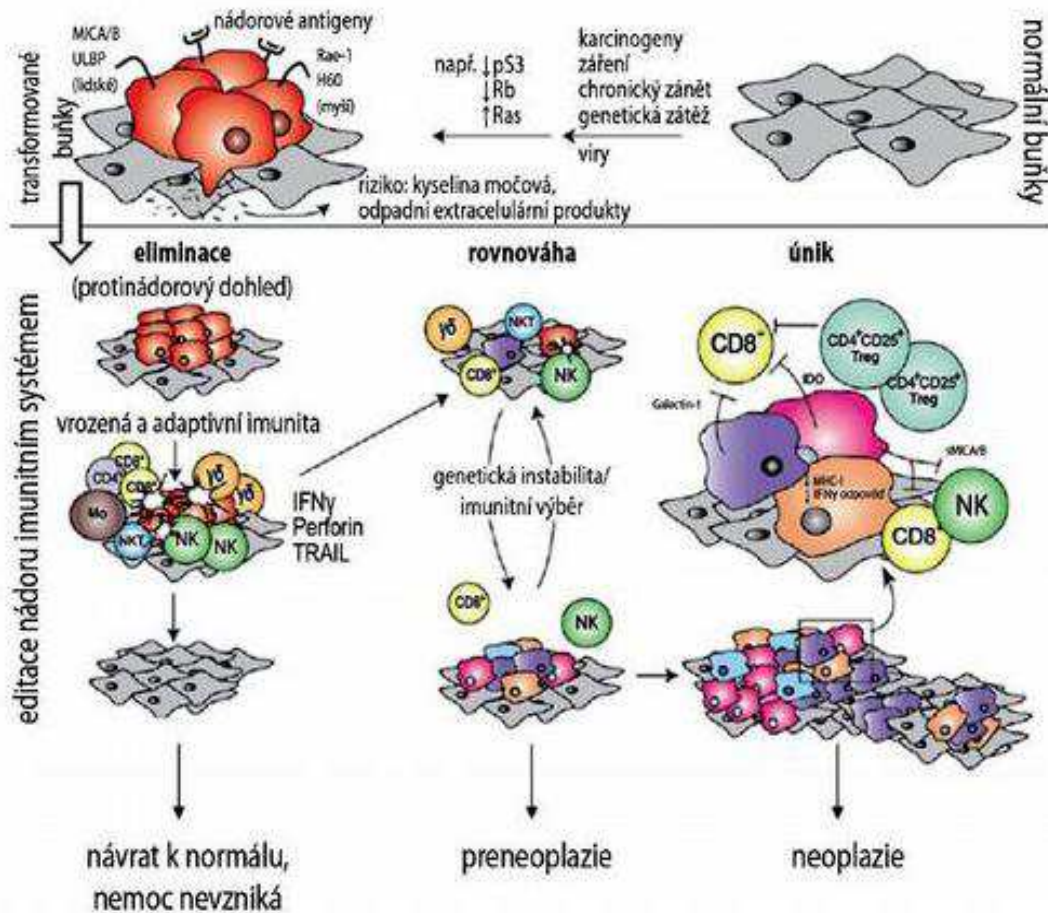
I sebemenší reakce imunitního systému na určitý podnět musí být přísně regulována, aby nedošlo k nechtěnému poškození či dokonce napadení vlastních tkání. Intenzita imunitní odpovědi je regulována mnoha odlišnými mechanismy. Vzhledem k zaměření této práce je třeba zmínit především tu regulaci imunitní odpovědi, kterou zprostředkovávají regulační T lymfocyty (Treg). Tato subpopulace T buněk se podílí na eliminaci autoreaktivních T lymfocytů a tím i na snížení pravděpodobnosti vzniku různých autoimunitních onemocnění. Většina autoreaktivních T lymfocytů je odstraněna již v thymu během procesu zvaném negativní selekce. I přes tento velmi přísný selektivní proces ale část autoreaktivních T lymfocytů centrální toleranci v thymu unikne a za jejich eliminaci poté zodpovídají právě Treg. Potlačení nepřiměřené imunitní odpovědi pomocí Treg je tudíž jedním z nejdůležitějších mechanismů udržení periferní tolerance.

2.1.2. Nádorová imunologie

S rostoucí průměrnou délkou života lidské populace dochází k vzestupu incidence zhoubných nádorových onemocnění. Imunitní systém se tak musí čím dál častěji potýkat s problémem spojeným se zahájením imunitní odpovědi vůči nádorovým buňkám. Takové buňky vznikají genetickou přeměnou vlastních buněk organismu. A rozpoznání vlastní tkáně jako nebezpečné je mnohem komplikovanější proces, než rozeznání různých patogenních struktur, které jsou tělu cizí. První teorie popisující myšlenku, že imunitní systém dokáže rozeznat a následně vyvolat odpověď na přítomnost nádorově transformované buňky v těle, byla formulována na počátku dvacátého století americkým chirurgem W. Coleyem, který pozoroval spontánní regrese nádorů během bakteriálních, plísňových i virových infekcí (Hoption *et al.*, 2003). V roce 1957 Thomas a Burnet formulovali hypotézu protinádorového imunitního dohledu, která je založena na existenci jisté buněčné populace vznikající v thymu, jejímž úkolem je kontrolovat vznik a výskyt nádorových buněk v těle (Burnet, 1970). Pravdivost této hypotézy prokázaly experimenty provedené na imunodeficientních myších, které postrádaly funkční geny pro rekombinaci T a B buněčných receptorů RAG1 a RAG2. Takto geneticky modifikované myši podléhaly častějšímu výskytu chemicky indukovaných i spontánních nádorů než imunokompetentní jedinci (Shankaran *et al.*, 2001). O další prozkoumání teorie imunitního dohledu se zasloužil Gavin P. Dunn, který na základě dosud známých fakt rozšířil původní poznatky do mnohem komplexnější teorie, tzv. editace nádorů imunitním systémem, neboli „cancer immune editing“ (Dunn *et al.*, 2004). Základní myšlenkou této teorie je existence tří možných stádií, která mohou nastat v průběhu boje imunitního systému proti nádorově transformovaným buňkám (Obr. 1, str. 16):

1. *Stádium eliminace nádorové buňky.* Během tohoto stádia dochází k včasnému rozpoznání a odstranění nádorové buňky imunitním systémem. K této situaci dochází v organismu celkem běžně, ale celý proces je zde většinou ukončen. Nicméně bylo popsáno, že stádium eliminace také může přejít do dalších fází teorie imunitního dohledu (viz níže).
2. *Stádium ustanovení rovnováhy mezi nádorovou buňkou a hostitelským organismem.* V tomto stádiu jsou postupně selektovány takové nádorově transformované buňky, které mají nejnižší imunogenicitu a imunitnímu systému tak nakonec mohou uniknout.

3. *Stádium úniku nádorové buňky imunitnímu dohledu.* Organismus v tomto stádiu ztrácí kontrolu nad transformovanou buňkou a dochází tak k rozvoji nádorového onemocnění (Dunn *et al.*, 2004),



Obr. 1: Teorie protinádorového dohledu - editace nádoru imunitním systémem a klinický efekt jednotlivých stádií (Špišek *et al.*, 2010).

Na vzniku a progresi nádorového onemocnění se podílí také Treg. Tato subpopulace T lymfocytů svými unikátními tlumivými vlastnostmi přispívá k růstu a progresi nádorů, čímž výrazně zhoršuje prognózu pacientů s nádorovým onemocněním (Yang a Ansell, 2009).

2.1.3. Mechanismy úniku nádorových buněk imunitnímu systému hostitele

Díky selekčnímu tlaku, který je kladen na nádorové buňky imunitním systémem hostitele, tyto buňky postupně vyvinuly řadu sofistikovaných únikových strategií, pomocí nichž mohou účinky imunitního systému obejít. Nádorové prostředí tak dokáže

zmanipulovat imunitní systém ve svůj vlastní prospěch na úkor hostitele. Existuje zde řada analogií s únikovými mechanismy různých patogenních agens.

Genetické mutace nádorových buněk jsou velmi rafinovanou zbraní. K častým mutacím dochází jednak v nádorově specifických antigenech a jednak v genech kódujících podjednotky komplexu MHC I (hlavní histokompatibilní komplex I). Důsledkem je snížená exprese nebo dokonce úplná ztráta molekul MHC I na povrchu nádorových buněk, které tak mohou uniknout pozornosti cytotoxických T lymfocytů (Khong a Restifo, 2002).

Dalším významným mechanismem je produkce tlumivých cytokinů, jako TGF- β a IL-10, které imunitní reakci do určité míry potlačují (Letterio a Roberts, 1998).

Při nízké hustotě exprese nádorových antigenů nebo úplné ztrátě jejich exprese může dojít k navození imunologické tolerance (DuPage *et al.*, 2012).

U rychle rostoucích nádorů dochází k hromadění vedlejších produktů metabolismu, které nepřímo ovlivňují fungování T buněk tvorbou kyselého, hypoxického prostředí (Calcinotto *et al.*, 2012).

Expresí negativních regulačních receptorů na povrchu T buněk také částečně usnadňuje nádorovým buňkám cestu k úniku. Tyto receptory jsou nezbytné pro ochranu vlastních tkání před nadměrnou reaktivitou efektorových T lymfocytů, ale zároveň představují významnou překážku pro vyvolání trvalé protinádorové imunity. Mezi nejvíce studované negativní regulační receptory dnes patří cytotoxický T-lymfocytární antigen 4 (CTLA-4) a receptor programované buněčné smrti 1 (PD-1), které váží ligandy z B7 rodiny. Důležitost CTLA-4 byla prokázána na myších postrádajících tuto bílkovinu. U takových myší se vyvinula letální lymfoproliferativní autoimunitní onemocnění (Chambers *et al.*, 1997).

Akumulace Treg v nádorovém mikroprostředí a periferní krvi je dalším faktorem přispívajícím k usnadnění úniku nádorových buněk téměř u všech dosud popsaných malignit. Velké množství studií se zaměřuje na hledání vztahu mezi frekvencí Treg a klinickým obrazem onkologických pacientů (deLeeuw *et al.*, 2012). V naší laboratoři byla experimentálně prokázána pozitivní korelace mezi hladinou Treg v nádorové tkáni a stádiem onemocnění u pacientek s ovariálním karcinomem (Fialova *et al.*, 2013). Analogická data byla publikována u některých dalších nádorových onemocnění v laboratořích po celém světě (Chen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Liyanage *et al.*, 2002).

2.2. Regulační T lymfocyty

Jakákoli reakce imunitního systému na určitý podnět je přísně regulována. Musí být zajištěno, že za normálních podmínek dojde k eliminaci patogenu nebo nádorové buňky, ale nedojde k poškození či dokonce ztrátě funkce vlastních tkání. Tuto úlohu v těle zastává minoritní, ale funkčně zcela nezastupitelná subpopulace T buněk – regulační T lymfocyty. Jejich stěžejním úkolem je tedy ochrana jedince před škodlivými účinky autoreaktivních T lymfocytů, které se díky nedokonalé negativní selekci probíhající v thymu vyskytují v těle každého z nás (Itoh *et al.*, 1999). V lidském těle se vyskytují různé subtypy CD4+ i CD8+ regulačních T lymfocytů (Aandahl *et al.*, 2008). Tato práce se dále experimentálně zabývá především rolí CD4+ regulačních T lymfocytů (Treg), neboť role CD8+ regulačních T lymfocytů v nádorové imunologii nebyla dodnes příliš prostudována.

Regulační T lymfocyty (Treg) jsou definovány jako subpopulace CD4+ T buněk, která exprimuje ve velké míře povrchovou molekulu CD25 (α řetězec receptoru pro IL-2). V periferní krvi zdravých jedinců se tato subpopulace vyskytuje v četnosti 5-10 % všech CD4+ buněk. Treg jsou esenciální pro udržení periferní tolerance a tím i homeostázy imunitního systému. Původně byla tato subpopulace identifikována díky schopnosti potlačovat vznik orgánově specifických autoimunit u myši. Při jejich deficitu tak dochází k rozvoji četných autoimunitních onemocnění (Sakaguchi *et al.*, 1995). K opačné situaci dochází u většiny nádorových onemocnění, pro něž je charakteristická zvýšená hladina Treg v periferní krvi a nádorové tkáni. Tento jev úzce souvisí s imunosupresivním prostředím, které postupně vzniká v těle onkologických pacientů. Dochází tak k potlačování protinádorové imunitní odpovědi, což většinou zhoršuje účinky chemoterapie i celkovou prognózu pacientů (Yang a Ansell, 2009).

V lidském těle se vyskytují dvě subpopulace CD4+ Treg, které se do jisté míry funkčně překrývají, ale odlišují se místem jejich vzniku. Přirozeně se vyskytující Treg (nTreg) vznikají v thymu, zatímco indukované Treg (iTreg) vznikají v periférii za přesně definovaných podmínek (Curotto de Lafaille a Lafaille, 2009).

2.2.1. Vývoj regulačních T lymfocytů

K diferenciaci nTreg dochází v thymu z prekurzorů, které mají charakter CD25^{hi} FoxP3- CD4+ CD8- thymocytů. K samotnému rozpoznání vlastního antigenu dochází pomocí autoreaktivního vysokoafinního T buněčného receptoru (TCR), který tyto buňky nesou na svém povrchu. Pro úspěšné spuštění diferenciačního programu thymocytu právě v nTreg musí dojít u příslušné antigen prezentující buňky (APC) k interakci TCR s antigenem navázaným na molekule MHC II (hlavní histokompatibilní komplex II), (Lio a Hsieh, 2008). Hlavním rozhodujícím faktorem je síla signálu afinitní interakce mezi TCR a komplexem MHC II. Příliš slabý signál vede k programované buněčné smrti (PCD) daných thymocytů z důvodu jejich příliš slabé odpovědi (pozitivní selekce). Naopak příliš silný signál vzniká u autoreaktivních TCR, které jsou potenciální příčinou vzniku různých autoimunitních onemocnění. T lymfocyty nesoucí tyto TCR musí být proto také eliminovány pomocí PCD (negativní selekce). Do periferie se tedy teoreticky dostávají pouze konvenční T lymfocyty, které prošly touto přísnou selekcí a váží MHC II komplex, ale s nízkou afinitou (Sebzda *et al.*, 1999) a dále pak malé množství CD4+ CD25+ FoxP3+ nTreg, jejichž T buněčné receptory váží vlastní antigen se zvýšenou afinitou, ale stále ještě pod prahovou hodnotou negativní selekce (Lio a Hsieh, 2008).

Správný vývoj a funkce nTreg vyžaduje přítomnost transkripčního faktoru FoxP3, který je v buňce nepostradatelný a je důležitý pro vyvolání správného fenotypu nTreg u konvenčních CD4+ CD25- T lymfocytů (Hori *et al.*, 2003). Nepostradatelnost transkripčního faktoru FoxP3 byla prokázána jak u člověka, tak u myši, kde mutace ve FoxP3 vyvolává závažná multiorgánová autoimunitní onemocnění. Jedná se o syndrom imunitní dysregulace, polyendokrinopatie a enteropatie, vázaný na chromozom X (IPEX) (Bennett *et al.*, 2001). Jedinou možností pro postižené chlapce je rychlá transplantace hematopoetických kmenových buněk buňkami zdravého dárce. Onemocnění jinak probíhá fatálně pod obrazem nekontrolovatelného autoimunitního onemocnění.

Diferenciační program v nTreg je dále podmíněn určitým cytokinovým prostředím v thymu. Expres FoxP3 a tudíž i celý vývojový cyklus nTreg je závislý na přítomnosti dostatečné hladiny IL-2, IL-7 a IL-15, které v menší (IL-7 a IL-15) či větší (IL-2) míře ovlivňují aktivaci transkripčního faktoru STAT 5. Ten se přímo váže na promotor pro FoxP3. Tento jev byl experimentálně potvrzen na myších postrádajících IL-2

IL2(-/-) nebo IL-2R α IL2R α (-/-). Takové myši produkují v porovnání se zdravými kontrolami signifikantně méně FoxP3+ thymocytů, zatímco nepřítomnost IL-7 nebo IL-15 se neprojevuje sníženou hladinou těchto buněk. Kombinované odstranění těchto tří cytokinů vede ke kompletní ztrátě FoxP3+ thymocytů a periferních FoxP3+ T buněk (Vang *et al.*, 2008).

Z hlediska vývoje vznikají iTreg zcela odlišnou cestou než nTreg. K jejich diferenciaci dochází z FoxP3- CD25- CD4+ naivních T lymfocytů v periferních lymfoidních orgánech po interakci s cizorodým antigenem v přítomnosti TGF- β . Následně ale v periférii vykonávají stejnou imunopresivní úlohu jako nTreg (Chen *et al.*, 2003). Dalším možným mechanismem konverze naivních T lymfocytů v iTreg v periférii je tzv. infekční tolerance. Tento jev se uskutečňuje na základě přímého buněčného kontaktu mezi nTreg a naivním CD4+ T lymfocytem. Následná supresorová aktivita těchto buněk je závislá na produkci klíčových tlumivých cytokinů TGF- β a IL-10 (Jonuleit *et al.*, 2002).

2.2.2. Subpopulace regulačních T lymfocytů

Přirozeně se vyskytující Treg (nTreg), odvozené z thymu, a indukované Treg, (iTreg) generované v periférii, mají podobný fenotyp a srovnatelné supresivní vlastnosti namířené proti nadměrné imunitní reakci i proti cizorodým antigenům či patogenům. Obě populace ale vykazují určité specifické rozdíly, jako je odlišný expresní profil, z velké části se překrývající, ale ne zcela shodná tvorba bílkovin a epigenetické modifikace či stabilita. Na základě těchto rozdílů vznikají dvě unikátní buněčné populace, které jsou navzájem nezastupitelné (Curotto de Lafaille a Lafaille, 2009). Přesné odlišení nTreg od iTreg tak může přispět k objasnění biologických pochodů, ke kterým dochází během periferní tolerance, autoimunit i v nádorové imunitě.

iTreg se vyvíjí v periférii během chronického zánětu a při vzniku chronických alergických reakcí (Curotto de Lafaille *et al.*, 2008), udržují homeostázi a snižují zánětlivé prostředí v trávicím traktu během setkávání se s komenzálními bakteriemi (Nutsch a Hsieh, 2012), dále potlačují imunitní odpověď na potravinové alergeny a také se významně podílí na udržení slizniční tolerance (Mucida *et al.*, 2005). iTreg zahrnují dvě další subpopulace regulačních T buněk. Jedná se o regulační T lymfocyty typu 1 (Tr1) a pomocné T lymfocyty typu 3 (Th3). Tr1 jsou charakteristické produkcí vysoké hladiny prozánětlivého IL-10 a TGF- β . Mají

schopnost tlumit antigenně specifické efektorové T lymfocyty skrze produkované cytokiny. Mechanismus suprese tudíž nevyžaduje přímý buněčný kontakt iTreg s daným efektorovým T lymfocytem. Tr1 buňky jsou nezbytnou součástí regulace adaptivní imunitní odpovědi (Roncarolo *et al.*, 2006). Th3 jsou indukovány z naivních CD4+ T buněk v přítomnosti TGF- β , který následně ve velké míře produkuje. Po aktivaci mají schopnost tlumit efektorové funkce Th1 i Th2 buněk. Charakteristická je také produkce IL-10 a na rozdíl od Tr1 také produkce FoxP3. Th3 hrají významnou roli v orální toleranci (Weiner, 1997).

nTreg vznikají v thymu v raných fázích vývoje a poté migrují do periferních lymfoidních orgánů, kde vykonávají svou supresorovou funkci.

2.3. Přirozeně se vyskytující Regulační T lymfocyty (nTreg)

2.3.1. Fyziologická funkce a fenotypové markery nTreg

nTreg jsou populací CD4+ CD25+ FoxP3+ T lymfocytů, které mají unikátní vlastnost tlumit reakce autoreaktivních T lymfocytů namířené proti antigenům vlastního těla a zabraňovat tak vzniku autoimunitních onemocnění. Autoreaktivní T lymfocyty se díky nedokonalé centrální toleranci probíhající v thymu vyskytují v těle každého z nás. Pro zdravého jedince ale díky imunosupresivním vlastnostem nTreg nepředstavují hrozbu (Sakaguchi *et al.*, 2006).

Od počátku 90. let minulého století, kdy byly nTreg poprvé identifikovány jako samostatná buněčná populace s imunosupresivními schopnostmi, je snahou mnoha vědeckých skupin po celém světě najít spolehlivý marker, který by byl pro nTreg specifický. V době objevu těchto buněk byl znám jejich fenotyp pouze jako CD4+ CD25+ (Sakaguchi *et al.*, 1995). Následoval objev transkripčního faktoru FoxP3, který je sice nepostradatelnou součástí vývoje i následné efektorové aktivity nTreg, ale po indukci iTreg z naivních CD4+ T lymfocytů nebo po aktivaci konvenčních T lymfocytů také začne docházet k tranzientní, až konstitutivní expresi FoxP3. Tento transkripční faktor tudíž nelze považovat za specifický marker nTreg (Vang *et al.*, 2008), ale jako obecný marker specifický pro regulační T lymfocyty. Podle výsledků studií provedených v roce 2010 *in vitro* na základě myších i lidských buněk je možné odlišit Treg vznikající v thymu od Treg indukovaných v periférii na základě přítomnosti

transkripčního faktoru Helios. Tento faktor patří do rodiny transkripčních faktorů Ikaros. V roce 2013 provedl Thornton a kolektiv experimenty, při kterých bylo v periferních lymfoidních orgánech detekováno až 70 % FoxP3 pozitivních buněk, které byly označeny jako Helios pozitivní. Nicméně již dříve bylo popsáno, že Helios pozitivní jsou všechny nTreg, jejichž vývoj proběhl v thymu. Treg přítomné v periférii se skládají z populace iTreg i nTreg. 70 % Helios pozitivních Treg detekovaných v periférii tedy dokazuje, že se jedná o populaci nTreg (Thornton *et al.*, 2010). Výsledky získané pomocí těchto experimentů byly posléze potvrzeny experimentem provedeným *in vivo*, kde indukované iTreg byly zjištěny jako Helios negativní (Thornton *et al.*, 2010). Avšak výsledky nejnovějších studií naznačují, že transkripční faktor Helios nakonec nemusí být tím markerem, který spolehlivě odliší populaci nTreg od iTreg, jak bylo popsáno. Konstitutivní exprese Helios pravděpodobně svědčí spíše o aktivované formě Treg, než o původu vzniku, a tím i odlišení nTreg od iTreg (Gottschalk *et al.*, 2012; Verhagen a Wraith, 2010).

Mezi další molekuly specifické pro nTreg patří povrchový receptor GITR a cytotoxický T lymfocytární antigen 4 (CTLA-4). GITR patří do rodiny receptorů tumor nekrotizujících faktorů. Je negativním regulátorem aktivity Treg a má tak schopnost potlačovat jejich imunosupresivní funkci. Této vlastnosti bylo využito při hledání léčiv podporujících protinádorovou imunitní odpověď (Aida *et al.*, 2014; Coe *et al.*, 2010). CTLA-4 je strukturním homologem kostimulačního receptoru CD28. Má stejnou úlohu také u Treg, kde jako kostimulační molekula hraje klíčovou úlohu při aktivaci těchto buněk a také v udržování imunologické tolerance (Takahashi *et al.*, 2000).

nTreg dále konstitutivně exprimují široké spektrum molekulárních markerů, které jsou pro ně charakteristické. Seznam těchto molekul je uveden v Tabulce 1 (str. 23). Žádný z těchto markerů ale není specifický pouze pro nTreg.

Přelomovým zjištěním v možnosti specifické detekce nTreg byl až objev epigenetické modifikace v regionu TSDR, který je součástí sekvence genu pro FoxP3. U nTreg zde dochází k demetylaci CpG ostrůvků, zatímco všechny ostatní buněčné populace mají tuto oblast metylovanou (Baron *et al.*, 2007). V nedávné minulosti byl také prokázán pozitivní vliv demetylace CpG ostrůvků v regionu TSDR na stabilní expresi FoxP3. Do oblasti TSDR, která je demetylovaná, se váží transkripční faktory Ets-1, CREB/ATF a NFκB a stabilizují tak zřejmě transkripci FoxP3 (Polansky *et al.*,

2010). Demethylací TSDR regionu tak vzniká populace stabilních regulačních T buněk, které nepodléhají plasticitě a změně fenotypu v jiný buněčný typ ani při přechodu z homeostatického do prozánětlivého prostředí a stimulací různými cytokiny (Toker *et al.*, 2013).

Markery charakterizující Treg		Produkce	Myš	Člověk
CD25	IL2-R α	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
FoxP3	Transkripční faktor	Vysoká; intracelulární	Ano	Ano
CTLA-4	Kostimulační molekula	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
GITR	Inhibiční molekula	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
CD127	IL7-R α	Nízká; povrchová	Ano	Ano
CD62L	Adhezivní molekula	Vysoká; povrchová	Ano	ND
PD-1/CD279	Receptor programované buněčné smrti	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
CD39	Ektonukleotidáza	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
CD44	Glykoprotein	Vysoká; povrchová	Ano	ND
MHCI/HLA-DR	Hlavní histokompatibilní komplex	Vysoká; povrchová	ND	Ano
LAP	TGF- β 1	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
CD103	Integrin	Vysoká; povrchová	Ano	ND
CCR6	Chemokinový receptor	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
LAG-3	Lymfocytární aktivační gen	Vysoká; povrchová	Ano	ND
GARP	Glykoprotein	Vysoká; povrchová	ND	Ano
Galektin-1	Lektin	Vysoká; povrchová	Ano	Ano
Galektin-10	Lektin	Vysoká; intracelulární	ND	Ano
Helios	Transkripční faktor	Vysoká; intracelulární	Ano	Ano
TNFRSF25	Receptor tumor nekrotizujícího faktoru	Vysoká; povrchová	Ano	ND

Tab. 1: Charakterizace Treg pomocí povrchových a vnitrobuněčných znaků. Markery charakterizující Treg; hladina a výskyt jejich produkce; výskyt u myších / lidských Treg; ND – neurčeno. (Schmetterer *et al.*, 2012), upraveno pro účely této diplomové práce.

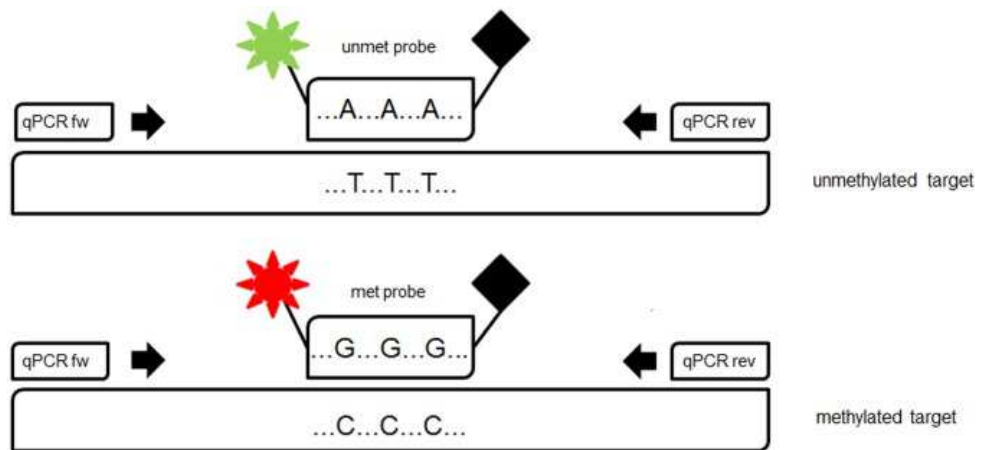
2.3.2. Kvantitativní analýza nTreg

Pro objasnění přesné role nTreg v nádorové imunologii je zapotřebí existence spolehlivé metody pro přesnou detekci a kvantifikaci těchto buněk v nádorové tkáni a periferní krvi onkologických pacientů. Transkripční faktor FoxP3 je nepostradatelnou součástí detekce Treg, neboť je hlavním regulátorem iniciace diferenciaci těchto buněk

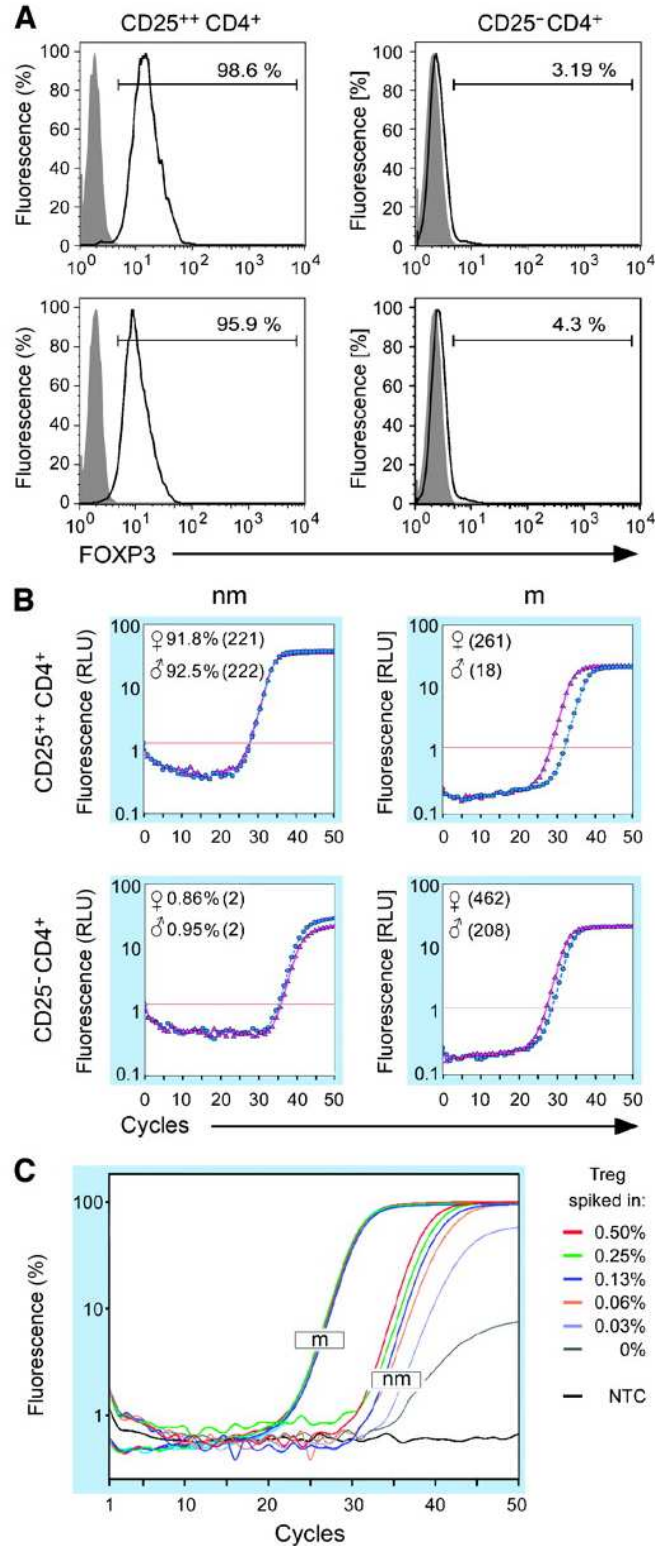
a následně i jejich správného fungování. Nejedná se ale o marker, který by odlišil nTreg od ostatních subpopulací regulačních T lymfocytů a není tudíž pro nTreg specifický (Roncador *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2003). Tato skutečnost je limitujícím faktorem pro detekci nTreg pomocí průtokového cytometru, který je v praxi běžně užívanou metodou pro stanovení všech FoxP3+ Treg jako jedné buněčné populace (Nettenstrom *et al.*, 2013).

Pro specifickou detekci a kvantifikaci nTreg slouží až nedávno objevená metoda kvantitativní analýzy demetylovaných FoxP3 lokusů. Tato metoda vychází ze zjištění, že v intronu 1 genu pro FoxP3 se nachází větší množství CpG ostrůvků, které jsou součástí vysoce konzervované sekvence TSDR regionu („Treg specific demethylated region“). CpG ostrůvky jsou v této oblasti DNA epigeneticky modifikovány. Znamená to, že u nTreg dochází k jejich demetylaci, zatímco u všech ostatních buněk je tato oblast metylována (Baron *et al.*, 2007).

Tato metoda spočívá ve využití kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), která umožňuje specifickou a velmi citlivou detekci nTreg měřením množství demetylované FoxP3 TSDR DNA. Genomová DNA je vystavena účinku hydrogensulfidu sodného (sodium bisulfit), který způsobuje konverzi všech cytosinů v CpG ostrůvcích, které nejsou chráněny metylací, na uracil. V následné qPCR je uracil DNA polymerázou rozpoznáván jako thymin a je k němu tudíž komplementárně přiřazován adenosin místo původního guanosinu. Ke konverzi cytosinů chráněných metylací ale nedochází. Pro oblast TSDR regionu, která obsahuje CpG ostrůvky, jsou navrženy primery a hybridizační sonda specifická pro metylovanou, resp. demetylovanou sekvenci. V následné metyl-senzitivní qPCR (MS-qPCR) dochází k amplifikaci dvou odlišných sekvencí DNA (Obr. 2, str. 25). Pro ověření specificity a citlivosti obou typů reakcí a pro následné vyhodnocení experimentu slouží ředící řada plazmidových standardů (Obr. 3, str. 26), (Wieczorek *et al.*, 2009).



Obr. 2: Schématické znázornění metody MS-qPCR. Amplifikace dvou odlišných sekvencí podle přítomnosti metylovaných či demetylovaných CpG ostrůvků v TSDR regionu genu pro FoxP3 (Tatura *et al.*, 2012; upraveno pro účely této diplomové práce).



Obr. 3: Srovnání stanovení množství Treg pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (FACS) a MS-qPCR. K tomu bylo použito CD25^{high} CD4⁺ T lymfocytů a CD25⁻CD4⁺ T lymfocytů. A) FACS analýza CD25^{high} (vlevo) a CD25⁻ CD4⁺ T lymfocytů od mužských (nahore) a ženských (dole) dárců. Expres FoxP3 byla naměřena u více než 95 % z CD25^{high} Treg a až 4,3 % u CD25⁻CD4⁺ T buněk. B) Pomocí MS-qPCR bylo stanoveno 93 % CD25^{high} Treg vykazujících demetylovaný

FoxP3 TSDR u mužských dárců (modrá křivka) a 92 % u ženských dárců (červená křivka). Mezi CD25-CD4+ bylo naměřeno méně než 1 % demetylovaných FoxP3 TSDR Treg. C) Test citlivosti metody detekce Treg: qPCR reakce byla připravena z konstantního množství kontrolních buněk – granulocytů (metylovaný FoxP3 TSDR), ke kterým bylo přidáno postupně se snižující množství Treg (demet FoxP3 TSDR). Amplifikační profil demetylovaných templátů DNA (nm) vykazuje lineární posun podél osy x odrážející postupný pokles množství přidávaných Treg. U methylovaných templátů DNA (m) se všechny amplifikační křivky překrývají ve stejném cyklu (Wieczorek *et al.*, 2009).

2.4. Ovariální karcinom

Karcinom ovaria vzniká ze tří odlišných buněčných typů. Více než tři čtvrtiny diagnostikovaných případů jsou epidermálního původu. Zbylé případy jsou ve stejné míře zastoupeny karcinomem ovaria pocházejícím ze stromálních buněk nebo z embryonálních buněk. Tento typ nádoru se vyskytuje zejména u mladých žen. Špatná prognóza karcinomu ovaria je dána především absencí závažnějších symptomů v raných stádiích onemocnění (Williams *et al.*, 2007). Především díky nedostatku diagnostických biomarkerů a faktu, že se onemocnění šíří v oblasti břišní dutiny bez klinických příznaků velice rychle, je téměř 70 % patientek s karcinomem ovaria diagnostikováno až v pokročilém stádiu onemocnění (Rosenthal a Jacobs, 1998). Podle rozsahu se toto onemocnění dělí do čtyř klinických stádií (I-IV), přičemž většina patientek je diagnostikována až ve III. až IV. stádiu, kdy jsou již často přítomny metastázy v peritoneu a v malé pánvi (Singh *et al.*, 2008).

Standardní léčbou pro pacientky s karcinomem ovaria je chirurgické odstranění nádorové tkáně s následnou chemoterapií založenou na kombinaci platiny a taxanu (Bookman, 2005), což vede k významné redukci maligních buněk. Často však v těle pacientky zůstane malá část nádorových buněk rezistentních k použité chemoterapii. Tento stav je označován jako minimální reziduální nemoc. Většina patientek prodělává během 2-5 let relaps onemocnění, jehož důsledky bývají fatální (du Bois *et al.*, 2003; Ozols *et al.*, 2003).

Progrese onemocnění je ovlivněna řadou faktorů. Jedná se především o stádium onemocnění v okamžiku diagnózy, věk a celkový zdravotní stav. Pro zlepšení prognózy patientek s karcinomem ovaria je třeba vyvinout terapeutické postupy, které by doplňovaly standardní léčbu a snížily riziko relapsu nádoru z malého množství maligních buněk rezistentních k použité chemoterapii. Vzhledem k tomu, že imunitní

system hraje klíčovou úlohu v patogenezi nádorů a je dokonce schopný za určitých okolností nádor eliminovat (Nathanson, 1976; Wang *et al.*, 2008a), mohla by právě aktivace protinádorové imunitní odpovědi pomocí různých přístupů protinádorové imunoterapie přispět k potlačení minimální reziduální nemoci.

2.5. Treg a nádorová onemocnění

Řada prací popsala zvýšenou hladinu Treg v periferní krvi a především v nádorové tkáni. Treg jsou tudíž považovány za důležité mediátory suprese protinádorové imunitní odpovědi zprostředkované nádorovou tkání. U karcinomu pankreatu byla prokázána souvislost mezi zvýšeným množstvím Treg a špatnou prognózou pacientů (Hiraoka *et al.*, 2006), stejně tak jako u karcinomu ovaríí (Curiel *et al.*, 2004). Vyšší proporce Treg u nemalobuněčného karcinomu plic jsou asociovány s kratší dobou přežívání bez recidivy po chirurgickém odstranění nádorové tkáně (Shimizu *et al.*, 2010). U studií prováděných na melanomu byl pozorován signifikantní nárůst Treg mezi tumor infiltrujícími lymfocyty u pacientů v pozdním relapsu (Miracco *et al.*, 2007). Podobných výsledků docílily i studie zaměřené na karcinom prsu, ve kterých vysoká hladina Treg pozitivně koreluje s agresivitou nádorového bujení. Treg tak pravděpodobně přispívají k indukci imunitní tolerance vůči agresivnějším a rychleji progradujícím formám nádorů (Bohling a Allison, 2008).

Význam Treg v nádorové imunitě ale není zcela jednoznačný. Existují studie, které naopak poukazují na zvýšenou hladinu Treg jako na pozitivní prognostický faktor pro pacienty s hematologickými malignitami, jako je například folikulární lymfom (Lee *et al.*, 2006) nebo Hodgkinův lymfom (Alvaro *et al.*, 2005). U pacientů s kolorektálním karcinomem je hladina Treg infiltrujících nádorovou tkáň spojována s delší dobou přežití (Salama *et al.*, 2009).

Dodnes nezodpovězenou otázkou zůstává, proč u některých typů nádorových onemocnění je zvýšená proporce Treg asociována s příznivějším klinickým průběhem, zatímco u naprosté většiny dnes známých nádorů je tomu naopak. Tento rozpor může být způsoben schopností Treg potlačovat produkci vnitřních prozánětlivých a proangiogenních faktorů, které přispívají k progresi některých nádorů (Badoual *et al.*, 2009). Dalším možným vysvětlením je supresivní funkce Treg, zaměřená proti nízkoavidní imunitní odpovědi zprostředkované T lymfocyty. Důsledkem toho vzniká silnější odpověď vysokoavidních CD8⁺ T buněk namířená proti infekčním patogenům,

kteřá je následována i silnější paměť adaptivního imunitního systému vůči daným antigenům. Tato imunitní odpověď může být potenciálně stejně účinně zahájena i proti nádorovým antigenům (Ali-Fehmi *et al.*, 2010).

2.5.1. Role Treg u ovariálního karcinomu

Nádorové mikroprostředí u pacientek s ovariálním karcinodem má schopnost nasměřovat efektorovou funkci regulačních T lymfocytů a dalších buněk imunitního systému proti postupně vznikající protinádorové imunitní odpovědi, zatímco přítomnost vysoké hladiny intraepiteliálních CD8+ tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) u ovariálního karcinomu je asociováno s lepší prognózou a delším přežitím pacientek (Sato *et al.*, 2005). Nárůst Treg u pacientek s karcinodem ovaria není spojován pouze s horší prognózou (Wolf *et al.*, 2005), ale i s nepříznivými klinickými parametry, jako je pokročilé stádium onemocnění, vyšší agresivita nádorových buněk („high grade“), tvorba metastáz či obtížné chirurgické odstranění tumoru (Barnett *et al.*, 2010).

2.5.2. Role Treg v léčbě nádorů

Imunosuprese zprostředkovaná Treg je považována za jednu z hlavních překážek úspěšné protinádorové imunoterapie, neboť tato vlastnost je u zdravého člověka zcela fyziologická, ale u většiny nádorových onemocnění se mění v klíčový mechanismus úniku nádorových buněk imunitnímu systému hostitele (Zou, 2005). Treg ustanovují periferní toleranci potlačováním autoreaktivních T lymfocytů rozeznávajících tělu vlastní antigeny (Itoh *et al.*, 1999). Většina nádorových antigenů je ale také rozeznávána jako tělu vlastní. Potlačení funkce autoreaktivních T lymfocytů specifických pro nádorové antigeny je tak jedním z důvodů selhání protinádorové imunity. Potlačením supresivní funkce Treg či deplecí těchto buněk by efektivita imunoterapie byla výrazně posílena.

V posledních letech je velký důraz kladen na výzkum monoklonálních protilátek blokuujících povrchové imunosupresivní receptory T lymfocytů, které mají inhibiční funkci. Specifické zablokování CTLA-4 monoklonální protilátkou proti tomuto inhibičnímu receptoru indukuje protinádorovou imunitní odpověď tím, že dojde k potlačení inhibiční schopnosti Treg, zvýšení proliferace a prodlouženému přežívání efektorových T lymfocytů (Leach *et al.*, 1996; Peggs *et al.*, 2009). V roce 2011 byla Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) schválena monoklonální protilátka

proti CTLA-4, ipilimumab (Yervoy) jako nový léčebný přípravek pro léčbu metastatického maligního melanomu. Podávání ipilimumabu vedlo k signifikantnímu zlepšení přežití a na základě rozsáhlé klinické studie byl tento přípravek schválen ke klinickému použití (Hoos *et al.*, 2010). Ve shodě s mechanismem účinku je ale podávání ipilimumabu spojeno s vysokou frekvencí nežádoucích účinků, především těžkých autoimunitních reakcí. Absence inhibiční funkce Treg vede u léčených pacientů k aktivaci T buněčné reakce proti vlastním tkáním, což se projevuje celou řadou autoimunitních onemocnění. Popsány byly i smrtelné případy těchto komplikací u léčených pacientů. Terapie ipilimumabem je tedy určena pouze pro pacienty ve velmi pokročilém stádiu onemocnění. Pro potlačení rizika vzniku vedlejších účinků v podobě autoimunit nyní probíhají studie, ve kterých se testují jiné dávkovací režimy (Fransen *et al.*, 2013).

Mnoho nádorových onemocnění, včetně ovariálního karcinomu, je spojováno s nadprodukcí inhibičního receptoru PD-1, resp. jeho solubilního ligandu PD-L1. Zablokování tohoto receptoru nebo jeho ligandu by tak mohlo vést k posílení T buněčné odpovědi (Hamanishi *et al.*, 2007; Nomi *et al.*, 2007). V současné době probíhají rozsáhlé klinické studie fáze III u řady onemocnění, ve kterých je testována klinická účinnost monoklonálních protilátek proti PD-1 nebo PD-L1. Průběžná data ukazují na minimálně srovnatelnou účinnost s ipilimumabem, ale mnohem lepší bezpečnostní profil těchto molekul.

Účinek léčby nádorových onemocnění pomocí monoklonálních protilátek je dále testován v různých fázích klinických studií, kde cíli těchto protilátek jsou další inhibiční receptory, například lymfocytární aktivační gen 3 (LAG 3) nebo TIM 3 (Pardoll, 2012).

Další možností navození účinné imunitní odpovědi je naopak aktivace kostimulačních receptorů T lymfocytů. Monoklonální protilátkou proti kostimulačnímu receptoru GITR, který se nachází na povrchu Treg, je možné přímo potlačit jejich supresivní funkci (Coe *et al.*, 2010). Stejným způsobem může být indukována adaptivní imunitní odpověď pomocí monoklonální protilátky proti OX-40. OX-40, neboli CD137, je členem TNFR superrodiny a slouží jako další kostimulační molekula T lymfocytů (Piconese *et al.*, 2008).

Účinné deplece Treg může být dosaženo podáním monoklonální protilátky proti molekule CD25. Dnes se za tímto účelem experimentálně používá basiliximab (Okita *et al.*, 2009), daclizumab nebo denileukin diftotox, fúzní protein IL-2 a Diphtheria toxinu.

Tyto dvě látky byly podávány v kombinaci s protinádorovou vakcínou, která aktivuje antigeně specifickou adaptivní imunitní odpověď u pacientů s melanomem. K trvalému snížení hladiny Treg ale u většiny pacientů nedošlo (de Vries *et al.*, 2011).

Podávání cyklofosfamidů pacientům s nádorovým onemocněním má rozporuplné výsledky. Studií provedenou v roce 2007 byl cyklofosfamid považován za účinný léčebný přípravek pro snížení hladiny Treg před následným zahájením imunoterapeutické léčby (Ghiringhelli *et al.*, 2007). V ten samý rok ale byla provedena fáze I klinické studie u metastatického karcinomu, ve které nebyl pozorován vliv samotného cyklofosfamidů na snížení hladiny Treg, ale pouze v kombinaci s imunoterapií (Audia *et al.*, 2007).

2.6. Nádorové antigeny asociované s ovariálním karcinomem

Humorální odpověď specifické složky imunitního systému v nádorové imunologii je namířena proti proteinům nádorové tkáně, u kterých došlo k neobvyklé změně exprese nebo struktury díky mutacím. Takto pozměněné proteiny nebo jejich epitopy se označují jako antigeny asociované s nádory (TAA), (Ali-Fehmi *et al.*, 2010). Vznik těchto nádorových antigenů může být důsledkem bodových mutací (Winter *et al.*, 1992), posttranskripčních úprav, například alternativního sestřihu pre-mRNA (Wang *et al.*, 2008b), aberantní exprese daného proteinu (Chen *et al.*, 1997) či jeho zvýšenou expesí (Disis *et al.*, 2000) nebo post-translačními úpravami daného antigenu (Guo *et al.*, 2013).

Na základě dostupné literatury jsem vybrala následující antigeny pro měření hladiny mRNA. Mucin 1 (Muc-1) je významným nádorovým antigenem karcinomu ovaria. Vysoká hladina Muc-1 je asociována s histologickým nálezem „high grade“ a pokročilým klinickým stadiem (Feng *et al.*, 2002). Hraje tedy pravděpodobně roli v progresi nádorové tkáně a vzniku metastáz (Van Elssen *et al.*, 2010). Nadměrná exprese tohoto antigenu koreluje se zvýšenou chemorezistencí vůči používaným chemoterapeutikům, což zhoršuje celkovou prognózu a zvyšuje mortalitu pacientek (Zhang *et al.*, 2013).

Dalším nádorovým antigenem charakteristickým pro karcinom ovaria je onkogen Her-2/neu. Nadměrná exprese tohoto antigenu byla zjištěna u většiny (75 %) z dvaceti testovaných nádorových linií odvozených od pokročilých stádií ovariálního karcinomu (Hellstrom *et al.*, 2001). Zvýšená hladina tohoto antigenu se udává

v rozmezí 8-66 % případů patientek s karcinomem ovaria (Tuefferd *et al.*, 2007). V letošním roce ale byla publikována retrospektivní meta-analýza zahrnující přes tři tisíce patientek s ovariálním karcinomem, zařazených do dvaceti různých studií, korelující expresi Her-2/neu s přežitím patientek. Výsledkem bylo zjištění, že nadprodukce Her-2/neu nebyla asociována se signifikantním dopadem na přežívání patientek (Wang *et al.*, 2014).

Velká pozornost je věnována proteinu epiteliální buněčné adheze (EpCAM). Jeho zvýšená hladina byla pozorována u karcinomu ovaria a je spojována se zkrácenou dobou přežití patientek (Heinzelmann-Schwarz *et al.*, 2004). Metylací promotoru genu pro EpCAM dochází k částečnému umlčení jeho transkripce a tím i exprese EpCAM, a to o 60-80 %. Cílená metylace tohoto promotoru by tudíž mohla být využita v terapii nádorových onemocnění vykazujících zvýšenou hladinu tohoto antigenu (Nunna *et al.*, 2014). Karcinom ovaria se zdá být vhodným cílem takového typu terapie, neboť stabilně zvýšená exprese EpCAM byla naměřena jak u patientek s prvotní diagnózou, tak u patientek s relapsem (Pietzner *et al.*, 2013).

Mezi rozsáhle studovaný nádorový antigen karcinomu ovaria patří nádorový antigen 125 (CA-125), jehož hladina v séru byla zvýšena u 50 % patientek ve stadiu I a u 90 % patientek ve stadiu II-IV (Zurawski *et al.*, 1988). Zvýšená hladina CA-125 ale byla naměřena také u zdravých žen během menstruace nebo u patientek s dalšími gynekologickými onemocněními či malignitami. Z této skutečnosti vyplývá, že zvýšená hladina CA-125 u patientek s karcinomem ovaria je nejspíš do určité míry způsobena falešně pozitivním výsledkem a je tedy otázkou, jak moc spolehlivým markerem tento antigen může být (Takahashi *et al.*, 1986).

Folátový receptor 1 (FOLR-1) reguluje expresi proapoptotických proteinů Bcl-2 a Bax a inhibuje apoptózu vyvolanou cytotoxickými látkami *in vitro*. FOLR-1 je tak dalším nádorovým antigenem způsobujícím chemorezistenci (Chen *et al.*, 2012). Zvýšená hladina cirkulujícího FOLR-1 byla naměřena i v periferní krvi patientek s karcinomem ovaria (Basal *et al.*, 2009).

Glykoprotein trofoblastu (TPBG) a karcinoembryonální antigen (CEA) patří mezi onkofetální antigeny. Zvýšená hladina TPBG signifikantně koreluje s pokročilými stádii karcinomu ovaria. Patientky s vysokou hladinou TPBG vykazují sníženou odpověď na adjuvantní terapii a horší přežívání (Wrigley *et al.*, 1995).

Telomeráza – reverzní transkriptáza (TRT) je ve zvýšené míře detekována ve formě velkých granul, nacházejících se v cytoplazmě a jádře nádorových buněk ovariálního karcinomu. Nebyl ale naměřen signifikantní rozdíl v hladině mRNA mezi maligní formou nádorů a neinvazivním „borderline“ typem (Maraei *et al.*, 2012).

Nadprodukce bakulovirového inhibitoru apoptózy, neboli survivinu (BIRC-5), byla prokázána u šedesáti různých nádorových linií, kde způsobuje inhibici apoptózy vazbou na kaspázu 3 a kaspázu 7 a jejich inaktivaci (Tamm *et al.*, 1998). Zvýšená hladina BIRC-5 by mohla sloužit jako prognostický faktor u pacientek s ovariálním karcinomem léčených neoadjuvantní chemoterapií (Gasowska-Bodnar *et al.*, 2014).

NY-ESO-1, PRAME, DDX-43, MAGE-A3, MAGE-A10 a MAGE-A12 patří do rodiny nádorových testikulárních antigenů (CTA), jejichž nadprodukce byla detekována u pacientů s mnoha typy nádorových onemocnění včetně karcinomu ovaria. Díky vysoké imunogenicitě jsou některé z těchto antigenů vhodnými cíli imunoterapie, která zesiluje potlačenou specifickou protinádorovou imunitní odpověď (Fratta *et al.*, 2011).

3. Cíle práce

V rámci této diplomové práce jsem měla přístup k peroperačním vzorkům nádorové tkáně od pacientek operovaných pro karcinom ovaria. Po izolaci nádorových buněk a buněk imunitního systému, které infiltrují nádorovou tkáň, jsem se zaměřila na analýzu dvou aspektů nádorového mikroprostředí:

1. Kvantitativní analýza regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni a periferní krvi karcinomu ovaria

- Pomocí klonování připravit plazmidový konstrukt pro přípravu standardu a následnou kvantitativní analýzu nTreg izolované DNA
- Pomocí průtokové cytometrie stanovit zastoupení Treg z izolované buněčné suspenze nádorové tkáně a periferní krve pacientek na základě fenotypických znaků těchto buněk a výsledek porovnat se zdravými kontrolami. Dále určit míru aktivace Treg jako Helios+ buněk
- Zavedením metyl-senzitivní kvantitativní PCR stanovit populaci stabilních nTreg z izolované buněčné suspenze nádorové tkáně a periferní krve pacientek na základě specifického epigenetického markeru – demethylace CpG ostrůvků TSDR oblasti genu pro FoxP3

2. Analýza exprese vybraného panelu nádorových antigenů na primárních buňkách karcinomu ovaria a na nádorových liniích

- Stanovit expresi mRNA vybraných nádorových antigenů jako potenciálních molekulárních markerů detekce časného stadia ovariálního karcinomu na primárních nádorových buňkách a porovnat ji s expresním profilem dvou ovariálních nádorových linií OV-90 a SK-OV-3

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

Chemikálie:

Barvicí látka pro elektroforézu 6x DNA Loading Dye (Fermentas)
Dimethyl Sulfoxid (DMSO), (Sigma Aldrich)
Ethanol 96 % (Penta)
Ethidium Bromid (Lachema)
Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)
Marker pro elektroforézu GeneRuler 1kb Ladder (Fermentas)
Agar pro pevné půdy (LB médium + ampicilin 100 ug/ul; ÚMG AV ČR)
Primery a TaqMan sonda (TIB MOLBIOL, East Port)
Agaróza (Invitrogen)

Komerčně dostupné kity:

BigDye Terminator® v3.1 cycle sequencing kit (Life technologies)
Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent)
MethylCode Bisulfite Conversion Kit (Invitrogen)
Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)
QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN)
RNeasy Mini Kit (250) (QIAGEN)
Wizard Plus Midipreps DNA Purification Kit (Promega)

Připravované roztoky:

Barvicí roztok pro průtokovou cytometrii
(PBS pH 7,2 + 2 % FBS, ředěná protilátka)
Kompletní médium
(RPMI 1640, 10 % FBS, 5 % L-glutamin, 5 % streptomycin a 5 % penicilin)
Zamrazovací médium
(70 % kompletní médium, 20 % FBS, 10 % DMSO)
Tris-acetát-EDTA pufr (TAE)
RLT pufr s 2-merkaptoetanolem
(na 1 ml RLT pufru 10 µl 2-merkaptoethanolu)

Komerčně dostupné roztoky:

Brefeldin A (BioLegend)
Injekční voda (B. Braun)
Fetální bovinní sérum (FBS) (GE Healthcare)
Fixační pufr (eBioscience)
GlutaMAX I CTS (Gibco)
Ionomycin (Sigma-Aldrich)
Kryší sérum (Sigma-Aldrich)
Phorbol 12-Myristát 13-Acetat (PMA) (Sigma-Aldrich)
PBS pH 7,2 (Londa)
PBS s 2 mmol/l EDTA (Londa)
Penicilin – Streptomycin (East Port)
Permeabilizační pufr (eBioscience)
RPMI 1640 (Gibco)
Trypanová modř (Invitrogen)

Enzymy:

Taq DNA polymeráza (Roche)
KAPA PROBE qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)
DNáza I (QIAGEN)
Kolagenáza D (Roche)
Restrikční endonukleázy *EcoRI*, *Hind III* (Fermentas)
Reverzní transkriptáza iScriptTM (BioRad)
T4 DNA ligáza (BioLabs)
Trypsin (Invitrogen)

Monoklonální protilátky:

CD4 PE-Cy 7 (eBioscience)
CD8 PE-Dynamics 590 (EXBIO)
CD25 PerCP/Cy 5.5 (BioLegend)
CD28 Alexa Fluor 700 (EXBIO)
CD127 Alexa Fluor 647 (BioLegend)
FoxP3 Alexa Fluor 488 (eBioscience)

Helios PE (BioLegend)

Plazmid:

pUC 18 (Amersham Biosciences)

Bakteriální kmen:

Escherichia coli kmen TOP 10

Genotyp: (*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1*
araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ*)

(dar od dr. Libora Krásného, MBÚ AV ČR)

Přístrojové zařízení:

Bioanalyzátor 2100 (Agilent)

CO₂ inkubátor SteriCycle 371 (Thermo Scientific)

Disociátor GentleMACS (Milteny Biotec)

Elektroforéza (Thermo Scientific OWL EASYCAST B1)

Fotoaparát C-8080 WZ (Olympus)

Laminární box (HeraSAFE KS 12, Biohazard)

PCR cyklier CFX96 Real-Time System (BioRad)

PCR cyklier MyCycler Thermal cyklier (BioRad)

Průtokový cytometr (BD LSRFortessa)

Kapilární sekvenátor ABI PRISM 3130xL (Life technologies)

Spektrofotometr Nanodrop 2000c (Thermo Scientific)

Stolní centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific)

Stolní centrifuga Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific)

Inkubátor Binder BD 53 (Binder)

Světelný mikroskop (Nikon eclipse TS 100)

Transiluminátor (Herolab UVT-20M/W)

Vodní lázeň TW8 Walter Bath (Julabo)

Vortex PV-1 (Grant Bio)

Programy a internetové aplikace:

BD FACSDiva Software (BD)

Blast[®] (NCBI)

CFX Manager 3.1 (BioRad)

FlowJo 8.5.2 (Tree Star Company)

GenEx (MultiD)

Chromas 2.33

STATISTICA 12 (StatSoft)

4.2. Výběr pacientů a analyzovaný materiál

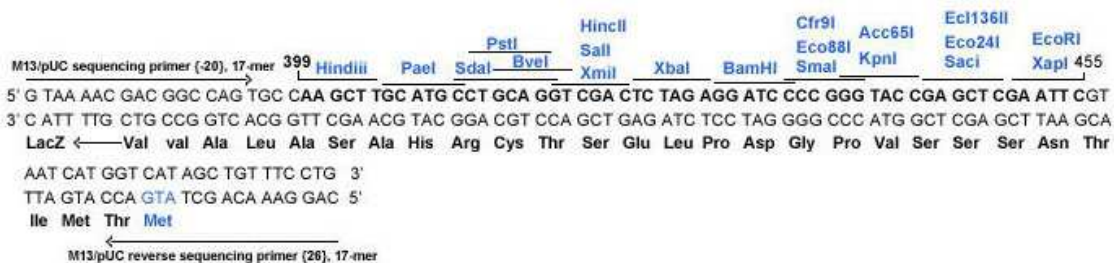
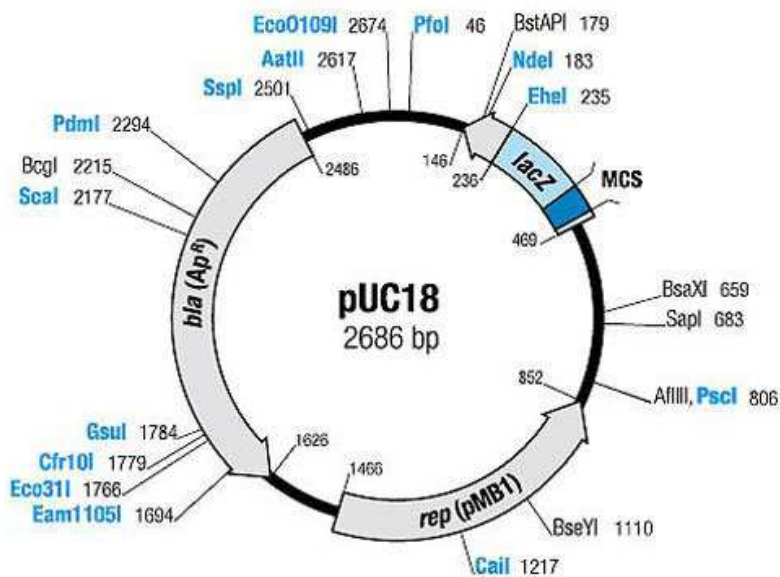
Vzorky nádorové tkáně a periferní krve pacientek s ovariálním karcinomem, jejichž analýza byla provedena v rámci této práce, byly získány ve spolupráci s gynekologicko-porodnickou klinikou fakultní nemocnice v Motole. Pacientky poskytly informovaný souhlas pro použití získaného materiálu k výzkumným účelům. Průměrný věk pacientek byl 60 let, s věkovým rozmezím 42 až 82 let. Vzorky byly získány celkem od 27 pacientek. Z důvodu asymptomatického průběhu v počátku onemocnění bylo získáno pouze 5 vzorků od pacientek v I. stadiu onemocnění, zbylých 22 vzorků bylo od pacientek ve stadiu III. Zpracování vzorků bylo vždy prováděno ve sterilních podmínkách tak, aby nedošlo ke kontaminaci materiálu.

4.3. Metody

4.3.1. Příprava standardu pro MS-qPCR

4.3.1.1. Příprava plazmidů - linearizace

Komerčně dostupný plazmid pUC18 byl linearizován pomocí restriční endonukleázy *EcoR*I a defosforilován. Plazmid byl dále doštěpen endonukleázou *Hind* III. Reakce byla provedena v PCR cycleru (3h 37°C, 15 min 65°C). Každá reakce o celkovém objemu 15 µl obsahovala 1 µg/µl plazmidu pUC18; 0,5 µl *Hind* III; 1,5 µl pufru M; 8 µl iH₂O.



Obr. 4: Restriční mapa plazmidu pUC18 a sekvence mnohočetného klonovacího místa (MCS).

4.3.1.2. Příprava inzertů

Metylované a demetylované úseky regionu TSDR o délce 80 párů bazí s koncovými přesahy odpovídajícími cílovým místům pro restriční endonukleázy (Tab. 2, str. 40) byly komplementárně spojeny pomocí programu „Anneal“ v PCR cycleru (95°C – 45°C, 1°C = 1 min).

HindIII A*AGCTT
 TTCGA*A
EcoRI G*AATTC
 CTTAA*G

FoxP3 primer	TSDR DNA (80bp)
Met forward	AGCTTCCCTCTTCTCTCCTCCGTAATATCGATAAAACCCG ACGCATCCGACCGCCATAACGTCAATAACGAAAAAATCG
Met reverse	AATTCGATTTTTTTCGTTATTGACGTTATGGCGGTCGGATG CGTCGGGTTTTATCGATATTACGGAGGAAGAGAAGAGGGA
DeMet forward	AGCTTCCCTCTTCTCTCCTCCATAATATCAATAAAACCC AACACATCCAACCACCATAACATCAATAACAAAAAATCG
DeMet reverse	AATTCGATTTTTTGTATTGATGTTATGGTGGTTGGATGT GTTGGGTTTTATTGATATTATGGAGGAAGAGAAGAGGGA

Tab. 2: Sekvence metylovaného a demetylovaného úseku TSDR s koncovými přesahy odpovídajícími cílovým místům pro restriční endonukleázu *HindIII* a *EcoRI*.

Každá PCR reakce o celkovém objemu 10 μ l obsahovala:

- 1,5 μ l iH₂O
- 0,5 μ l (10 μ M) forward primeru pro metylovanou sekvenci
- 0,5 μ l (10 μ M) reverse primeru pro metylovanou sekvenci
- 5 μ l PCR mixu obsahujícího DNA polymerázu, dNTPs, qPCR pufr a MgCl₂

Reakce pro amplifikaci demetylované sekvence standardu byla připravena obdobně pomocí primerů specifických pro demetylovanou sekvenci.

4.3.1.3. Ligace inzertu do plazmidu

Byla namíchána ligační reakce s plazmidem pUC18 rozštěpeným *EcoRI* a *Hind III* obsahující metylovanou či demetylovanou sekvenci DNA a s nerozštěpeným plazmidem bez vloženého inzertu, sloužící jako kontrola. V tomto procesu enzym DNA ligáza spojuje kohezní konce plazmidů a ligovaných inzertů za vzniku fosfodiesterových vazeb. Reakce je energeticky náročná a vyžaduje přítomnost ATP v prostředí.

Každá ligační reakce o objemu 10 μ l obsahovala:

- 5 μ l plazmidové DNA
- 1 μ l 10x ligačního pufru s ATP
- 1 μ l T4 DNA ligázy
- 3 μ l (10 μ M) primerů

Vzorky byly inkubovány v termobloku při teplotě 16°C a po dobu 2 hodin.

4.3.1.4. Transformace buněk *Escherichia coli*

Transformace kmene *Escherichia coli* připravenými plazmidovými konstrukty byla provedena metodou tepelného šoku. Zamražené kompetentní buňky uchovávané při -80°C se nechaly pomalu rozmrazit na ledu. Ligační směs byla rozdělena do vychlazených (4°C) zkumavek, ke kterým bylo přidáno po 100 μl kompetentních buněk. Směsi byly lehce protřepány a inkubovány po dobu 5 min na ledu. Následná inkubace probíhala po dobu 45 sekund ve 42°C a poté 2 min na ledu. Buňky byly natřeny na agarové misky se selekčním antibiotikem (ampicilin, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a inkubovány přes noc ve 37°C .

4.3.1.5. Koloniová PCR

Metodou koloniové PCR byly otestovány vybrané rekombinantní klony na přítomnost hledaného konstruktu v plazmidu pUC18. Pomocí sterilní špičky bylo postupně vybráno pět kolonií z misky obsahující plazmidy se sekvencí pro metylovaný konstrukt. Tyto špičky obsahující buněčný materiál byly promíchány v 5 μl iH_2O připravené v příslušné zkumavce. Zbylé buňky ve špičce byly natřeny na předem označené místo na nové agarové misce s příslušným antibiotikem. Stejný postup následoval pro konstrukty s demetylovanou sekvencí. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí PCR podle následujícího programu:

- 99°C , 5 min (narušení buněčných stěn a vylití obsahu buněk)
- 95°C , 30 sec (denaturace DNA)
- 42°C , 45 sec (nasednutí primerů na ssDNA)
- 72°C , 1 min (syntéza nového řetěze DNA)

Reakce byla po proběhnutí první fáze (99°C , 5 min) pozastavena a ke vzorkům bylo přidáno po 45 μl předem připraveného PCR mixu. Poté byl program dokončen. Zbylé tři fáze proběhly ve 20 cyklech.

4.3.1.6. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu

Pro analýzu produktů koloniové PCR pocházejících z potenciálních pozitivních klonů byla využita horizontální agarózová elektroforéza. Pro kontrolu velikosti fragmentů DNA byl používán hmotnostní marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder o koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Vzorky byly nanášeny v roztoku vzorkového pufru

obsahujícího bromfenolovou modř a xylen cyanol sloužící ke sledování průběhu elektroforézy (bromfenolová modř putuje na úrovni 250 bp a xylen cyanol na úrovni 2500 bp). K zobrazení fragmentů DNA v agaróze byl použit roztok ethidium bromidu.

Nejprve byla sestavena aparatura pro elektroforézu. Dále bylo připraveno požadované množství elektroforetického pufru 1x TAE ze zásobního 50x TAE. 1% agarózový gel byl připraven z 1 g agarózy a 100 ml 1x TAE krátkým povařením a následným zchlazením pod tekoucí vodou na teplotu asi 50°C a nalit do elektroforetického aparátu. Poté byl do agarózy umístěn hřeben. Po ztuhnutí byla agaróza přelita pufrem 1x TAE a hřeben byl vyjmut. Do startovacích komůrek gelu byly naneseny vzorky a hmotnostní marker. Aparatura byla připojena ke zdroji napětí o 120 V. Doba potřebná k rozdělení DNA byla asi 60 minut. Gel byl vyjmut z elektroforetického aparátu a vložen na 60 minut do roztoku ethidium bromidu. Po nabarvení byl gel analyzován na UV transiluminátoru.

4.3.1.7. Izolace plazmidové DNA z bakterie *Escherichia coli*

Minipreparace – „QIAprep Spin Miniprep Kit“

Tato metoda je založena na adsorpci DNA na silikagel v přítomnosti vysoké koncentrace solí. Volná RNA a proteiny jsou postupně vymývány zvyšující se koncentrací solí a plazmidová DNA je eluována nízkou koncentrací solí.

Jednotlivými koloniemi bylo inokulováno po 10 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/µl. Založené tekuté kultury byly inkubovány přes noc ve 37°C. Kultury napěstované přes noc se daly chladit na led. Poté byly centrifugovány po dobu 10 min, 2 200 x g, při 4°C. Pelet byl resuspendován 250 µl pufru P1 obsahujícího RNázu a byl přenesen do nových mikrozkušavek. K buněčné suspenzi bylo přidáno 250 µl pufru P2 a mikrozkušavka byla jemným obracením promíchána. Následně bylo přidáno 350 µl pufru N3 a znovu obracením promícháno. Vzorek byl centrifugován po dobu 30 min, při 18 000 x g, ve 4°C. Po stočení bylo opatrně odebráno 1000 µl supernatantu na kolonku a po dobu 1 min centrifugováno. Přefiltrovaný supernatant byl opět přenesen na novou kolonku a centrifugován po dobu 1 min. Supernatant byl vylit a na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru PB a vzorek byl centrifugován po dobu 1 min. Supernatant byl vylit a na kolonku bylo přidáno 750 µl pufru PE s následnou

centrifugací po dobu 1 min. Po uplynutí 1 min centrifugováno znovu 1 min, ale tentokrát už na sucho, pro zbavení se zbytků etanolu. Kolonka byla přenesena do nové mikrozkuřavky a bylo na ni naneseo 50 μ l pufru EB. Poté byla kolonka inkubována 5 min v pokojové teplotě a dále byla 1 min centrifugována.

Sekvence izolované plazmidové DNA

Sekvence plazmidové DNA byla ověřena v Sekvenačním servisu Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze Krči.

Sekvenační reakce byla připravena pomocí Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu od firmy Life technologies. Každá reakce o objemu 10 μ l obsahovala:

- 7 μ l plazmidové DNA
- 1 μ l (10 μ M) primeru
- 2 μ l BDT

Takto připravené vzorky byly vloženy do PCR cycleru CFX96 Real-Time system a reakce probíhala podle programu Sequen 48:

- 96°C, 10 sec
- 48°C, 5 sec
- 60°C, 4 min

Tyto tři fáze proběhly ve 25 cyklech.

Po ukončení programu byly vzorky přeneseny na led a ke každému bylo přidáno 10 μ l 3M roztoku octanu sodného a 80 μ l iH_2O . Směs byla promíchána a přenesena do 1,5 ml mikrozkuřavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 5 μ g glykogenu a promícháno. Dále bylo přidáno 300 μ l 96 % etanolu, vzorky byly promíchány a centrifugovány po dobu 30 min, 17 000 x g, 4°C. Etanol byl slit a pelet opláchnut 250 μ l 70 % etanolu. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 min za stejných podmínek, etanol byl znovu slit a mikrozkuřavky se nechaly přes noc sušit v pokojové teplotě. Takto připravené vzorky byly podrobeny sekvenaci.

Na základě výsledků sekvence byl od každého konstruktu (metylovaného a demetylovaného) vybrán jeden pozitivní klon *E. coli* s ověřenou sekvencí a z těchto klonů bylo izolováno odpovídající množství plazmidové DNA metodou Midipreparace.

Midipreparace – „Wizard Plus Midipreps DNA purification system“

Pomocí midipreparace byla kvantitativně připravena plazmidová DNA o dostatečné čistotě pro následující pokusy. Tato metoda izolace plazmidové DNA je založena na afinitní chromatografii, kdy je plazmidová DNA vychytávána na „WizardTM Midipreps Purification Resin“, tedy na částice na kolonce v prostředí chaotropních solí. Odtud je po promytí plazmidová DNA eluována.

Jednou kolonií bylo inokulováno 100 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/µl. Kultura byla inkubována přes noc ve 37°C. Narostlá kultura byla centrifugována při 1 700 x g, 15 min, při 4°C. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 3 ml resuspendačního pufru. Po přidání 3 ml lyzačního pufru byl roztok jemně promíchán otáčením kyvety. Dále byly přidány 3 ml neutralizačního pufru a kyveta byla opět jemně promíchána. Roztok byl centrifugován po dobu 30 min, při 1 900 x g, 4°C. Supernatant byl přelit do sterilní falkonky a k němu bylo přidáno 10 ml zcela rozmíchaného WizardTM Midipreps Purification Resin. Následovalo důkladné promíchání a okamžité přenesení na kolonku. Roztok na kolonce byl odsát pomocí vývěvy. Následně byla kolonka dvakrát po sobě promyta 15 ml Column Wash Solution a poté 30 sekund sušena pomocí zapnuté vývěvy. Rezervoár kolonky byl vložen do sterilní mikrozkušavky bez víčka (pomocí skalpelu byla odříznuta nepotřebná část kolonky). Zbytek kolonky (s pryskyřicí a adsorbovanou plazmidovou DNA) v mikrozkušavce byl centrifugován v mikrocentrifuze při 12 000 x g, po dobu 2 min. Kolonka byla přenesena do nové sterilní mikrozkušavky a bylo na ni nanášeno 300 µl injekční vody a inkubováno 1 min při pokojové teplotě. Kolonka v mikrozkušavce byla centrifugována při 12 000 x g, po dobu 20 sekund, kolonka byla odstraněna, mikrozkušavka uzavřena a centrifugována při 12 000 x g, po dobu 5 min. Plazmidová DNA v supernatantu byla precipitována etanolem v prostředí octanu sodného podle následujícího postupu: supernatant obsahující plazmidovou DNA byl smíchán s 1/10 objemu 3 M octanu sodného, pH 5,2. K takto vzniklému celkovému objemu bylo přidáno 2,2 objemu 96 % etanolu předchlazeného na - 20°C a vše bylo důkladně promícháno. Roztok byl inkubován 20 min v - 70°C. Plazmidová DNA byla poté centrifugována 12 000 x g, po dobu 20 min, 4°C. Sediment byl opláchnut vychlazeným 70 % etanolem, usušen na vzduchu a rozpuštěn na ledu v 50 µl injekční vody (pokud se při srážení vytvořilo vřeteno DNA) nebo ve 30 µl vody (pokud se vřeteno nevytvořilo). Koncentrace plazmidové DNA byla měřena spektrofotometricky.

4.3.1.8. Příprava ředící řady plazmidového standardu

Výchozí koncentrace metylované a demetylované plazmidové DNA byla 100 ng/μl. Původní koncentrace byla naředěna vždy desetkrát, a to v deseti po sobě jdoucích ředěních. Pro následný experiment ale byla použita ředící řada až od čtvrtého ředění z důvodu co nejpřesnějšího pokrytí rozsahu hodnot cyklu kvantifikace (Cq) u měřených vzorků (Tab. 3, str. 45). Výchozí počet kopií plazmidové DNA byl vypočítán standardním způsobem pomocí Avogadrovy konstanty.

Ředění	Koncentrace	Počet kopií
1.	100 ng/μl	34 x 10 ⁹
2.	10 ng/μl	34 x 10 ⁸
3.	1 ng/μl	34 x 10 ⁷
Do qPCR reakce ↓		
4.	100 pg/ul	34 x 10 ⁶
5.	10 pg/ul	34 x 10 ⁵
6.	1 pg/ul	34 x 10 ⁴
7.	100 fg/ul	34 x 10 ³
8.	10 fg/ul	34 x 10 ²
9.	1 fg/ul	340
10.	0,1 fg/ul	34

Tab. 3: Ředící řada plazmidového standardu s výslednými koncentracemi a počtem kopií plazmidové DNA pro dané ředění.

4.3.2. Zpracování vzorků pro specifickou detekci a kvantifikaci Treg

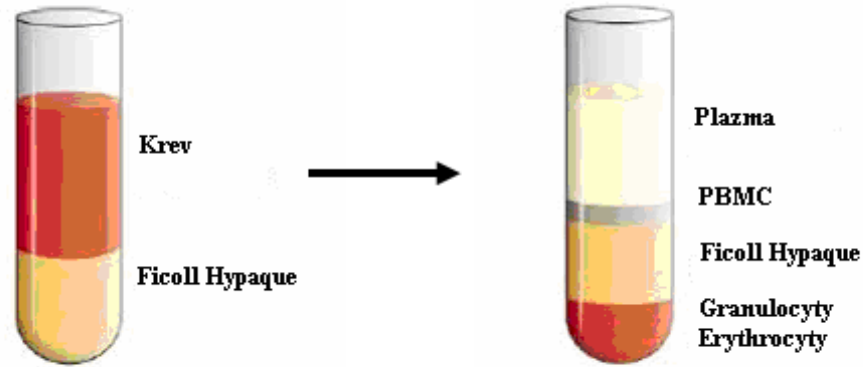
4.3.2.1. Zpracování nádorové tkáně a příprava buněčné suspenze

Nádorová tkáň, získaná během radikální operace ve spolupráci s gynekologicko-porodnickou klinikou FN Motol, byla nejprve mechanicky rozmělněna pomocí sterilních nástrojů a vzorek byl disociován ve zkumavce gentle MACS C-Tube pomocí disociátoru Gentle MACS. K homogenizované tkáni byla za účelem enzymatického rozštěpení přidána kolagenáza D o koncentraci 1 mg/ml a vzorek byl následně inkubován po dobu 30 min ve 37°C. Následovalo opakování disociace na disociátoru.

K získání buněčné suspenze byl vzorek přefiltrován přes 100 µm sítko do 50 ml zkumavky a ta byla doplněna do 50 ml pomocí PBS. Buněčná suspenze byla centrifugována při 270 x g po dobu 10 minut ve 4°C. Pelet byl resuspendován a promyt v PBS. Následovala opakovaná centrifugace při 270 x g po dobu 10 minut ve 4°C. Pelet byl resuspendován v PBS s 2 % FBS. 10 µl buněčné suspenze bylo obarveno 10 µl trypanové modři a buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky na optickém mikroskopu. Počítány byly T lymfocyty a nádorové buňky, které ve vzorcích vždy převažovaly. Buňky byly rozděleny po 0,4 milionu do 96ti jamkové destičky pro následné barvení a měření na průtokovém cytometru. Zbylé buňky byly zamrazeny do kapalného dusíku.

4.3.2.2. Zpracování periferní krve a příprava buněčné suspenze

Do 50 ml zkumavky bylo připraveno 15 ml roztoku Ficoll Paque. Vzorek periferní krve byl naředěn pomocí PBS a EDTA tak, aby byl výsledný poměr 1 : 1. Takto připravená směs krve s PBS byla opatrně pomocí serologické pipety navrstvena na hladinu Ficoll Paque a byla následně centrifugována po dobu 30 min při 600 x g a laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odebrán prstenec mononukleárních buněk na rozhraní Ficoll Paque a plazmy (Obr. 5, str. 47) do nové 50 ml zkumavky. Buněčný pelet byl posléze resuspendován v PBS s EDTA a centrifugován při 270 x g po dobu 10 min ve 4°C. Tento promývací krok byl zopakován ještě dvakrát, přičemž počet otáček byl snížen na 200 x g a následně na 120 x g. 10 µl buněčné suspenze bylo obarveno 10 µl trypanové modři a buňky byly spočítány pomocí optického mikroskopu v Bürkerově komůrce. Počítány byly T lymfocyty a nádorové buňky, které se na rozdíl od nádorové tkáně v periferní krvi téměř nenachází. Buňky byly rozděleny po 0,4 milionu do stejné 96ti jamkové destičky pro následné barvení a měření na průtokovém cytometru. Zbylé buňky byly zamrazeny do kapalného dusíku.



Obr. 5: Schéma izolace PBMC z periferní krve pomocí „Ficoll Paque“ (Fučíková, 2009).

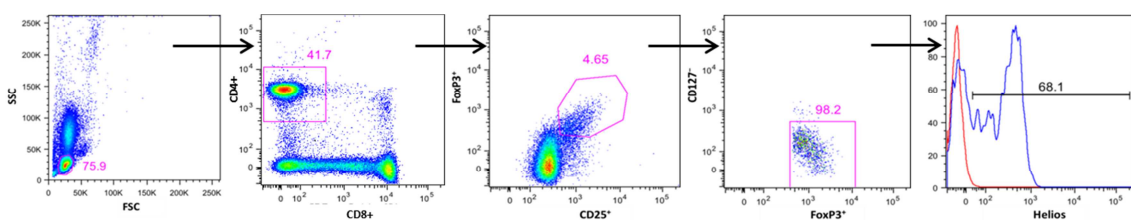
4.3.3. Analýza pomocí průtokového cytometru

Průtoková cytometrie slouží pro analýzu povrchových i intracelulárních parametrů buněčné suspenze, jako je tvar, velikost, životnost buněk a jejich granularita, produkce cytokinů, povrchové molekuly, membránový potenciál či enzymatická aktivita. Buněčná suspenze byla označena pomocí monoklonálních protilátek s navázanou fluorescenční značkou (fluorochromem). Takto připravená suspenze byla vložena do průtokového cytometru, kde je pomocí přtlaku vstříkována skrz trysku do tenkého proudu kapaliny, ve které jsou buňky uspořádány za sebou. Proud kapaliny obsahující buňky je postupně snímán laserovým paprskem, který se podle parametrů dané buňky částečně odráží a rozptyluje. Na buňkách s navázaným flourochromem dochází při ozařování k excitaci atomů do vyšších energetických hladin, které při zpětném přechodu do základního stavu vyzáří excitované (fluorescenční) světlo, které je opět detekováno (Bartůňková *et al.*, 2005). V této práci byla metoda průtokové cytometrie použita k měření zvolených povrchových a intracelulárních markerů.

Destička s buňkami byla centrifugována při 450 x g po dobu 5 min a 4°C. Pelet byl resuspendován v 50 µl barvícího roztoku pro povrchové značení Treg obsahujícího monoklonální protilátky proti CD4, CD25, CD28, CD127 a vzorky byly následně inkubovány 20 min ve 4°C. K buňkám bylo přidáno 150 µl PBS s následnou centrifugací při 450 x g po dobu 5 min a 4°C. Vzorky byly resuspendovány ve 100 µl fixačního pufru (1 díl zásobního roztoku fixačního roztoku + 3 díly zásobního roztoku Diluent na jednu jamku) a inkubovány 30 min ve 4°C. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl

permeabilizačního pufru (1 díl zásobního permeabilizačního pufru + 9 dílů destilované vody na jednu jamku) a centrifugováno při 700 x g po dobu 2 min a 4°C. Pelet byl resuspendován ve 150 µl permeabilizačního pufru a centrifugován při 700 x g po dobu 2 min, 4°C. Buňky byly resuspendovány v 50 µl barvicího roztoku pro intracelulární značení Treg obsahujícího monoklonální protilátky proti FoxP3 a proti Helios s permeabilizačním pufrům. Následovala inkubace po dobu 30 min ve 4°C. Posléze bylo ke vzorku přidáno 150 µl permeabilizačního pufru a vzorek byl centrifugován při 700 x g po dobu 2 min, 4°C. Tento promývací krok byl zopakován ještě dvakrát, buňky již ale nebyly promyty v PBS. Vzorky byly přeneseny do zkumavek a na průtokovém cytometru BD LSR Fortessa byla měřena imunofluorescence přibližně 100 000 – 200 000 buněk podle výtěžku buněk z jednotlivých vzorků nádorové tkáně a periferní krve.

Analýza byla provedena pomocí programu FlowJo 8.5.2. K analýze jsem použila analyzační strategii zobrazenou na obrázku číslo 6 (str. 48). Z analyzované buněčné populace byla pomocí parametru měřícího velikost buňky (FSC) a granularitu (strukturu) buňky (SSC) vybrána populace T lymfocytů. Z této populace byla vybrána populace pomocných CD4+ lymfocytů. Z CD4+ lymfocytů byla dále sledována populace Treg na základě povrchové molekuly CD25+ a intracelulárně na základě transkripčního faktoru FoxP3+. Z této populace byla následně vybrána populace CD127- lymfocytů, u kterých bylo měřeno zastoupení Helios+ buněk.



Obr. 6: Strategie analýzy dat pomocí programu FlowJo 8.5.2. Pomocí parametrů FSC a SSC byla vybrána populace T lymfocytů. Z této populace byla vybrána populace pomocných CD4+ lymfocytů, ze kterých byla následně vybrána populace regulačních T lymfocytů na základě povrchového znaku CD25+, transkripčního faktoru FoxP3+ a dále na základě exprese nízké hladiny molekuly CD127. Ve vybrané populaci Treg bylo měřeno množství Helios+ buněk.

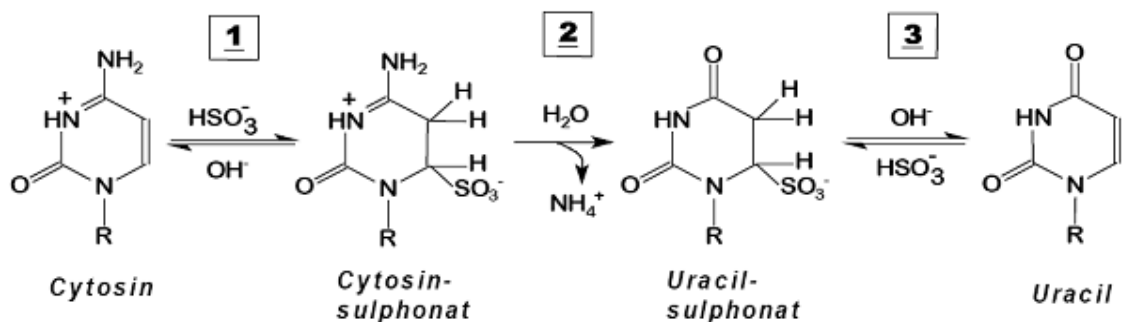
4.3.4. Analýza pomocí MS-qPCR

4.3.4.1. Izolace genomové DNA ze zamražených buněk nádorové tkáně a ze zamražených mononukleárních buněk

Buňky zamražené v tekutém dusíku byly rozmrazeny ve vodní lázni, přeneseny do nových mikrozkušavek a doplněny kompletním médiem. Buňky byly centrifugovány po dobu 10 min, 200 x g, při 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 200 µl PBS. Genomová DNA byla izolována pomocí PureLink Genomic DNA kitu: K buněčné suspenzi bylo přidáno 20 µl proteinázy K a 20 µl RNázy. Vzorky byly krátce promíchány na vortexu a inkubovány v pokojové teplotě po dobu 2 min. K buňkám bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru a vzorky byly znovu promíchány. Buněčný lyzátní roztok byl inkubován v 55°C po dobu 10 min. Poté bylo přidáno 200 µl 96 % etanolu a vzorky byly znovu promíchány. Obsah mikrozkušavek byl přenesen na kolonku, která byla centrifugována po dobu 1 min, 10 000 x g, při pokojové teplotě. Sběrací kolonka byla vyměněna za novou a do kolonky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru 1. Vzorky byly centrifugovány po dobu 1 min za stejných podmínek. Sběrací kolonka byla vyměněna za novou a do kolonky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru 2. Vzorky byly centrifugovány po dobu 3 min, 17 000 x g, při pokojové teplotě. Kolonky byly přemístěny do nových mikrozkušavek a na střed filtru bylo nanášeno 25 µl elučního pufru. Kolonky byly inkubovány po dobu 1 min při pokojové teplotě a poté byly 1 min centrifugovány. Eluční krok byl ještě jednou zopakován. Koncentrace izolované genomové DNA byla změřena spektrofotometricky. Genomová DNA byla uchována v -20°C.

4.3.4.2. Ošetření DNA bisulfitem sodným

Hydrogensířičitan sodný neboli bisulfit sodný, se používá pro stanovení metylace DNA. Bisulfitová modifikace DNA je založena na rozdílné reakci této chemické látky s cytosinem a 5-metylcytosinem, které jsou součástí CpG ostrůvků. Cytosin tvoří adukt s aniontem bisulfitu a může tak hydrolyticky deaminovat na adukt uracil-bisulfitový derivát. Alkalickou desulfonací je z tohoto derivátu odstraněn SO₃ a vzniká tak konečný uracil (Obr. 7, str. 50). 5-metylcytosin této reakci nepodléhá.



Obr. 7: Schématické znázornění konverze cytosinu na uracil účinkem bisulfitu.

DNA byla ošetřena pomocí komerčně dostupného kitu MethylCode Bisulfite Conversion Kit od firmy Invitrogen podle následujícího protokolu. Nejdříve byl připraven mix pro konverzi DNA smícháním 900 μl iH_2O , 50 μl resuspendačního pufru a 300 μl dilučního pufru s „CT Conversion Reagent“. Takto připravená směs byla míchána po dobu 10 min v pokojové teplotě pro získání zcela homogenní směsi. Ke každému vzorku 500 ng genomové DNA bylo přidáno 130 μl výše připraveného mixu, vzorky byly vloženy do PCR cycleru a byl spuštěn následující program:

- 98°C, 10 min (denaturace DNA)
- 64°C, 2,5 hod (konverze DNA)
- 4°C

Po ukončení programu byl každý vzorek přenesen do kolonky s filtrem, do které bylo již předtím přidáno 600 μl vazebného pufru. Směs byla promíchána a centrifugována po dobu 30 sec, 10 000 x g. Obsah sběrací kolonky byl odstraněn, na kolonku s filtrem bylo přidáno 100 μl promývacího pufru a vzorek byl centrifugován za stejných podmínek. Obsah sběrací kolonky byl opět odstraněn, bylo přidáno 200 μl desulfonačního pufru a kolonka byla inkubována po dobu 20 min v pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován za stejných podmínek, obsah sběrací kolonky byl odstraněn, bylo přidáno 200 μl promývacího pufru a znovu centrifugováno. Tento krok byl zopakován a kolonka s filtrem poté byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Bylo přidáno 10 μl elučního pufru, 1 min inkubováno v pokojové teplotě a poté centrifugováno. Tento krok byl ještě 1x zopakován. Celkový výtěžek 20 μl konvertované genomové DNA byl uchován v - 20°C pro následné použití.

4.3.4.3. Metyl-senzitivní kvantitativní PCR (MS-qPCR)

Při MS-qPCR dochází k amplifikaci dvou sekvenčně odlišných PCR produktů pomocí primerů, které byly specificky navrženy pro metylovanou i demetylovanou sekvenci DNA v TSDR regionu genu pro FoxP3, která byla v předešlém kroku konvertována pomocí bisulfitu.

K amplifikaci byla použita DNA polymeráza TaqMan od firmy Kapa Biosystems. Primery a sondy pro metylovanou a demetylovanou sekvenci TSDR FoxP3 byly navrženy firmou TIB MOLBIOL. Každý primer byl dodán ve dvou verzích navržených do jiného místa vybrané sekvence DNA. Nejprve byla pro tento účel namíchána PCR reakce se všemi kombinacemi primerů s kontrolní cDNA a pro další práci byly vybrány ty kombinace, se kterými docházelo k nejefektivnější amplifikaci (amplifikační křivka měla co nejoptimálnější průběh), (Tab. 4, str. 51). Poté byly připraveny PCR reakce vybraných kombinací primerů se samotnými vzorky.

Název	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	TaqMan Sonda (5'→3')
TSDR FoxP3 Met	CTCTTCTTCTCCGTAA TATATCG	GTTATTGACGTTATGGCGGT C	AAACCCGACGCATCCGAC
TSDR FoxP3 DeMet	CCCTTCTTCTCCCAT AATATCA	GATTTTTTGTATTGATGTT ATGGT	AAACCCAACACATCCAACCA

Tab. 4: sekvence primerů a sond metylovaného a demetylovaného úseku TSDR genu pro FoxP3.

Nejprve byl namíchán PCR mix pro metylovanou a demetylovanou sekvenci DNA o finálním objemu 10 µl v jedné reakci, který obsahoval:

- 5 µl PCR mixu obsahujícího DNA polymerázu, dNTPs, qPCR pufr a MgCl₂
- 1,5 µl iH₂O
- 0,5 µl (10 µM) forward primeru
- 0,5 µl (10 µM) reverse primeru
- 0,5 µl (4µM) fluorescenční sondy
- 50 ng templátové DNA

Směs byla důkladně promíchána, centrifugována a vložena do PCR cycleru CFX96 Real-Time system. Každý vzorek byl měřen v triplikátu. Reakce probíhala podle níže uvedeného programu:

- 95°C, 3 min

- 95°C, 15 sec
- 60°C, 1 min
- poslední dvě fáze proběhly ve 49 cyklech

4.3.4.4. Analýza dat získaných pomocí metyl-senzitivní qPCR

Data pocházející z MS-qPCR byla analyzována metodou absolutní kvantifikace a celkové vyhodnocení bylo provedeno v souladu se zavedenými standardy (Bustin *et al.*, 2009). Množství metylovaných a demetylovaných úseků FoxP3 TSDR DNA bylo stanoveno z kalibrační křivky plazmidové DNA pomocí lineární regrese. Procento demetylované FoxP3 TSDR DNA bylo vypočítáno jako poměr demetylované FoxP3 TSDR DNA a součtu metylované a demetylované FoxP3 TSDR DNA (Wieczorek *et al.*, 2009).

4.3.5. Příprava cDNA pro stanovení expresního profilu nádorových linií OV-90 a SK-OV-3, primárních nádorových buněk pacientek s ovariálním karcinomem a periferní krve zdravých kontrol

4.3.5.1. Pasážování nádorových linií OV-90 a SK-OV-3

Nádorová linie zamražená v kryoprotektivním médiu byla rozmrazena na vodní lázni. Vzorek byl přenesen do 15 ml centrifugační zkumavky a doplněn kompletním médiem do 15 ml. Zkumavka byla centrifugována 10 min, 120 x g, 4°C. Supernatant byl odstraněn, pelet resuspendován v 10 ml kompletního média a centrifugován za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován v 1 ml kompletního média a přenesen do kultivačních lahví (75 cm²) spolu se 14 ml kompletního média. Buňky v lahvích byly kultivovány v termostatu o teplotě 37°C. Po dvou až třech dnech, kdy buňky pokryly přibližně 90 % dna kultivační lahve, byla linie pasážována. Z kultivační lahve bylo odsáto médium a dno lahve bylo několikrát promyto 10 ml PBS-EDTA. Poté bylo přidáno 4 ml trypsinu a inkubováno 3-4 min při 37°C. Po odsednutí adherentních buněk nádorových linií ode dna kultivační lahve byly buňky omyty a odsáty do 50 ml centrifugační zkumavky. Po přidání 10 ml kompletního média do zkumavky došlo k inaktivaci účinku trypsinu. Zkumavka byla centrifugována 10 min, 120 x g, 4°C. Supernatant byl slit a pelet resuspendován

v 1-2 ml kompletního média. 10 μ l buněčné suspenze bylo obarveno 10 μ l trypanové modři a buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Buňky byly nasazeny do lahví ke kultivaci v přibližném množství pět milionů buněk na lahev. Sklizení buněk proběhlo stejným způsobem jako pasážování, ale připravená buněčná suspenze se již nenasadila do kultivačních lahví ke kultivaci, ale buňky byly spočítány a naředěny do požadovaného objemu kompletního média.

4.3.5.2. Příprava buněčného lyzátu

Z živých buněk nádorových linií, nádorové tkáně a kontrolních PBMC byly odebrány vždy přibližně dva milióny buněk do mikrozkušavky, naředěny pomocí PBS do objemu 1,5 ml a centrifugovány po dobu 5 min, 300 x g, 4°C. Pelet byl resuspendován v 350 μ l RLT pufru s 2-merkaptotanolem, po dobu 60 sekund pomocí vortexu tak, aby došlo k lyzi a homogenizaci buněčné suspenze. Takto připravený lyzát byl zamražen v -80°C pro další použití

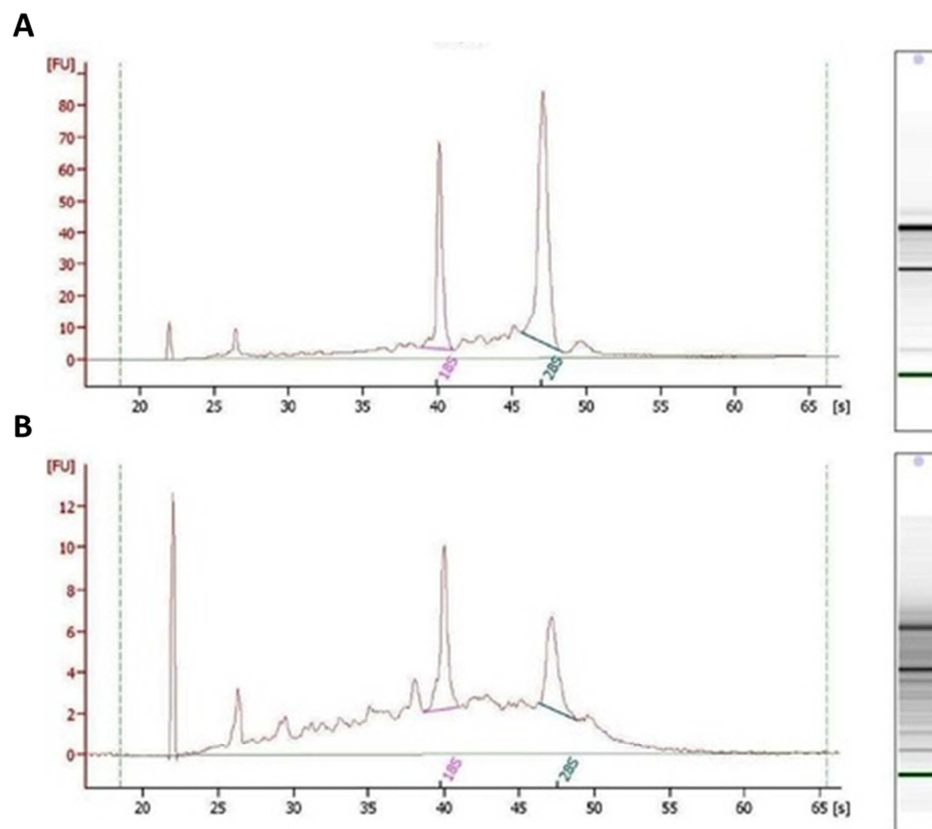
4.3.5.3. Izolace RNA z buněčného lyzátu

Celková RNA byla izolována pomocí kitu RNeasy Mini od firmy QIAGEN. Zkušavka s buněčným lyzátem byla co nejrychleji rozmrazena v termobloku ohřátém na 37°C. K lyzátu bylo přidáno 350 μ l 70 % etanolu a vzorek byl řádně promíchán. Celý objem byl přenesen na kolonku s filtrem, umístěnou ve sběrné zkušavce a centrifugován 40 sekund, 9 600 x g, 20°C. Sběrná zkušavka byla vyměněna za novou, na filtr bylo nanášeno 350 μ l pufru RW1. Následovala centrifugace po dobu 40 sekund, 9 600 x g, 20°C. Sběrná kolonka byla vyměněna za novou, na filtr bylo nanášeno 80 μ l inkubačního mixu obsahujícího DNázu I (70 μ l pufru RDD + 10 μ l DNázy I). Vzorek byl inkubován po dobu 15 min při 20°C. Na kolonku bylo nanášeno 350 μ l pufru RW1, vzorek byl centrifugován 15 sekund, 9 600 x g, 20°C. Sběrná kolonka byla vyměněna, na filtr bylo nanášeno 500 μ l pufru RPE, vzorek byl centrifugován po dobu 15 sekund, 9 600 x g, 20°C. Tento krok byl zopakován, ale centrifugace probíhala již jen 2 min. Poté byla kolonka centrifugována ještě 1 min na sucho pro odstranění zbytkového etanolu. Kolonka s filtrem byla přenesena do nové mikrozkušavky a na filtr bylo nanášeno 30 μ l injekční vody, po 1 min byla mikrozkušavka centrifugována 1 min, 9 600 x g, 20°C. Eluce byla zopakována stejným

způsobem pro získání RNA o finálním objemu 60 μ l. Vzorky byly přeneseny na led a na spektrofotometru byla změřena koncentrace RNA. Vzorek byl uložen do -80°C pro další použití.

4.3.5.4. Měření stupně integrity a koncentrace RNA

Integrita a koncentrace izolované RNA byla měřena pomocí komerčního kitu Agilent RNA 6000 Nano kit od firmy Agilent na přístroji Bioanalyzátor 2100 od stejné firmy. Tento přístroj využívá systému kapilární gelové elektroforézy, která probíhá na mikročipech. Čip na analýzu dvanácti vzorků byl připraven podle odpovídajícího protokolu. Připravený alikvot gelu a fluorescenční barva byly 30 minut před použitím inkubovány v pokojové teplotě, bez přístupu světla. Do alikvotu gelu byl přidán 1 μ l fluorescenční barvy, gel byl důkladně protřepán na vortexu a centrifugován 10 min, 13 000 x g, 20°C . Čip byl přemístěn do připravené přípravné stanice. Do označené jamky bylo nanášeno 9 μ l gelu, přípravná stanice byla uzavřena a tlakovací píst byl stlačen po dobu 30 sekund. Poté byl píst povolen a do dalších dvou příslušných jamek bylo nanášeno po 9 μ l gelu. Do všech ostatních jamek bylo nanášeno po 5 μ l markeru a do jamky pro velikostní marker byl nanášen 1 μ l tohoto markeru. Do připraveného mikročipu byl do každé z dvanácti jamek k tomu určených přidán 1 μ l analyzované RNA. Čip byl protřepán po dobu 1 min na vortexu. Po vložení čipu do bioanalyzátoru byl spuštěn příslušný program. Analýzou vzorků RNA na bioanalyzátoru byla u každého vzorku získána koncentrace a stupeň integrity (RIN), (Obr. 8, str. 55).



Obr. 8: Integrita izolované RNA. Průběh křivky kapilární gelové elektroforézy pro nedegradovanou RNA (A) a degradovanou RNA (B). Jsou zde vidět hlavní vrcholy pro 18S a 28S rRNA.

4.3.5.5. Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepisována pomocí komerční sady iScriptTM cDNA Synthesis Kit. Reakce probíhala v PCR cycleru MyCycler od firmy BioRad. Vstupní množství RNA bylo 100 ng a reverzní transkripce každého vzorku probíhala v duplikátu. Jedna reakce o celkovém objemu 20 μ l obsahovala: 100 ng RNA, 4 μ l reakčního mixu, 1 μ l reverzní transkriptázy. Pokud 100 ng RNA nedosahovalo objemu 15 μ l, byl potřebný zbytek doplněn injekční vodou. Průběh reverzní transkripce byl následující:

- 5 min 25°C
- 30 min 42°C
- 5 min 85°C
- poté zchlazeno na 4°C

Výsledná cDNA byla zamražena v -20°C.

4.3.5.6. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

K amplifikaci byla použita DNA polymeráza s PCR mixem od firmy Kapa Biosystems. Primery a sondy pro vybrané antigeny byly syntetizovány firmou TIB MOLBIOL. Každý primer byl dodán vždy ve dvou variantách. Proto byla nejprve namíchána PCR reakce se všemi kombinacemi primerů s kontrolní cDNA a pro další práci byla vybrána vždy pouze ta kombinace, která dosahovala co nejefektivnější amplifikace (Tab. 5, str. 56). Poté byly připraveny PCR reakce vybraných kombinací primerů se samotnými vzorky.

Název	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	TaqMan Sonda (5'→3')
B-actin	ATTGCCGACAGGATGCA GAA	GCTGATCCACATCTGCTGGA A	AGATCATTGCTCCTCTGAGC GCA
BIRC-5	GACCCGTTGGCAGAGGT	CCTCGGCCATCCGCTC	CCCAGCATTGCCCTGCCT
CA-125	CTCTGAGAGTGTGACCTC AAGAACAA	GTGGCAGGGGTCCAGTACC	ACCATCGGTCTGGATCTCCA CC
CEA	CAAATAATAACGGGACCT ATGCCT	CAGGAGAAGTTCAGATGCA GA	TTTGTCTCTAACTGGCTACTG GCCGC
DDX-43	GATTTTGTAGATGTGCG CCCA	GGTCTTTCAAATAAGATTGT GCGAG	CGATGAACTGAATGAGGCCA TGTAGCAC
EpCAM	GCAGGGTCTAAAAGCTG GTGT	ACCCATCTCCTTATCTCAGC CTT	TGCTGTTATTGTGGTTGTGGT GATAGCAGT
FBP	GCACCTCTACACCTGCA AGA	CTCCCACTGCGCACTTGTTA	ACAAGGGCTGGAAGTGGACT TCAGGGT
Her-2/neu	GGCGCTGGAGTCCATTCT C	TGGCCCCAAAAGTCATCAG	CCAGAGTGATGTGTGGAGTT ATGGTGTGACTG
MAGE-A3	CACTGAAGGAGAAGATC TGCCA	CTCTGCTCAAGAGGCATGAT GA	CAGGGCAACAGGCGGGAGT
MAGE-A10	GCTTGAGATCGGCTGAA GAGA	CACCCTCTGAGAGCAAGGTT CT	AGGCTCTGTGAGGAGGCAAG GGAGGT
MAGE-A12	TCCGTGAGGAGGCAAGG TT	GCTCAAGTGGCATGATGACT CT	AGACAGGCCCGGAGCAGCA C
Muc-1	CGTAGCCCCTATGAGAAG GTTTC	GCGACGTGCCCTACAAG	AGCAGCCTCTTTACACAAAC CCAGCA
Papola	GCTACGAAGACCAGTCCA TTG	TGTTGGTACAGATGCTGCT	CAGCTCTCAGGGCAGAAACA GTCCT
NY-ESO-1	AGCTGATGGAGAGCTGC AGTT	TCACTGTGTCCGGCAACATA	TGGTCTGCAGCAGTCAGTCG GATAGTC
PRAME	CGTTTGTGGGGTTCCATT C	CCAGAGGGAGGCAGGTG	TGGCTGTGTCTCCCGTCAAAG GC
TPBG	GGTACTCCTGGGCTGGGT	GTGGGCACCTCGGTGAG	CGCTGCCGGACCAGTGCC
TRT	TTTCTACCGGAAGAGTGT CTGG	GCAGCTGCACCCTTTCAA	TTGCAAAGCATTGGAATCAGA CAGCAC

Tab. 5: Sekvence primerů a sond vybraných nádorových antigenů.

Nejprve byl namíchán PCR mix o finálním objemu 10 μ l v jedné reakci, který obsahoval:

- 5 μ l PCR mixu obsahujícího DNA polymerázu, dNTPs, qPCR pufr a $MgCl_2$
- 1,5 μ l H_2O
- 0,5 μ l (10 μ M) forward primeru
- 0,5 μ l (10 μ M) reverse primeru
- 0,5 μ l (4 μ M) fluorescenční sondy
- 2 μ l templátové cDNA (cca 10 ng)

Směs byla důkladně promíchána, centrifugována a vložena do PCR cycleru CFX96 Real-Time system. Každý vzorek byl měřen v triplicátu. Reakce probíhala podle níže uvedeného programu:

- 95°C, 3 min
- 95°C, 15 sec
- 60°C, 1 min
- poslední dvě fáze probíhaly ve 49 cyklech

K vyhodnocení dat a získání expresního profilu jednotlivých antigenů byl použit software GenEx Professional. Geny, jejichž exprese nebyla detekována u více než 50 % vzorků, byly vyloučeny z analýzy. Expese jednotlivých genů byla normalizována k expresi referenčních genů β -actin a GAPDH. K samotné statistické analýze dat byl použit Studentův t-test. Data jsou prezentována jako průměr relativní exprese (\pm SEM). Veškeré experimenty s qPCR byly provedeny v souladu s obecně platnými a používanými pravidly (Bustin *et al.*, 2009).

5. Výsledky

U řady nádorových onemocnění dochází k akumulaci regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni a podle některých prací i v periferní krvi pacientů, což má za následek postupně narůstající imunosupresi, která nedovolí imunitnímu systému zahájit účinnou a včasnou protinádorovou odpověď. Rozdíly v publikovaných pracích mohou být vysvětleny odlišnou metodikou použitou pro detekci Treg. Zavedení spolehlivé a citlivé metody pro detekci těchto buněk by tedy mohlo umožnit snadnou analýzu této buněčné populace v nádorové tkáni a výhledově i nastavení terapeutické strategie podle zjištěného nálezu.

Pro účel této diplomové práce byla získána buněčná suspenze obsahující nádorové buňky společně s imunitními buňkami infiltrujícími nádor a periferní mononukleární buňky z periferní krve od skupiny pacientek s ovariálním karcinomem ($n = 27$). Tato buněčná suspenze byla poté podrobena kvantitativní analýze pomocí průtokové cytometrie a MS-qPCR stanovující zastoupení Treg v nádorové tkáni a periferní krvi. Výsledky byly poté porovnány s hladinou Treg v periferní krvi zdravých dárců. Na buňkách nádorové tkáně pacientek byla dále stanovena exprese vybrané skupiny nádorových antigenů. Exprese na primárních nádorových buňkách byla porovnána s profilem antigenů exprimovaných na často používaných ovariálních nádorových liniích OV-90 a SK-OV-3.

Pacientka	Histologický nález	Stádium	Vzorek	Počet izolovaných buněk (M)
1	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	1,6
			PBMC	3,8
2	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	30
			PBMC	-
3	Serozní adenokarcinom ovaria s metastázemi	III C	Nádor	18,7
			PBMC	5,3
4	Papilární serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	26
			PBMC	4
5	Serozní karcinom ovaria s metastázemi	III C	Nádor	65
			PBMC	5
6	Serozní cytopapilární karcinom ovaria s metastázemi	III C	Nádor	21
			PBMC	2,3
7	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	35
			PBMC	25
8	Serozní karcinom ovaria	I C	Nádor	21,5
			PBMC	4
9	Serozní adenokarcinom ovaria	III C	Nádor	21
			PBMC	6,5
10	Serozní karcinom ovaria s metastázemi	III C	Nádor	110
			PBMC	2,7
11	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	84
			PBMC	-
12	Serozní adenokarcinom ovaria	III C	Nádor	7,4
			PBMC	7
13	Papilární karcinom ovaria	III C	Nádor	85
			PBMC	5
14	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	50
			PBMC	3
15	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	155
			PBMC	4
16	Serozní karcinom ovaria s metastázemi	III C	Nádor	45
			PBMC	6
17	Serozní karcinom ovaria s metastázemi	I C	Nádor	165
			PBMC	0,8
18	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	12,4
			PBMC	5
19	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	40
			PBMC	3,5
20	Světlobuněčný adenokarcinom ovaria s metastázemi	III C	Nádor	54
			PBMC	9
21	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	0,7
			PBMC	12
22	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	245
			PBMC	12
23	Serozní karcinom ovaria	III C	Nádor	6
			PBMC	5,8
24	Prmimární karcinom peritonea	III C	Nádor	105
			PBMC	2,5
25	Serozní adenokarcinom ovaria	III C	Nádor	136
			PBMC	-
26	Serozní karcinom ovaria	I C	Nádor	3,5
			PBMC	4
27	Serozní karcinom ovaria	I C	Nádor	2
			PBMC	-

Tab. 6: Seznam vzorků od pacientek s ovariálním karcinomem. Celkem bylo získáno 27 vzorků nádorové tkáně a 23 vzorků periferní krve. Tabulka obsahuje údaje o histologických nálezech a stádiích jednotlivých pacientek a počet izolovaných buněk z jednotlivých vzorků.

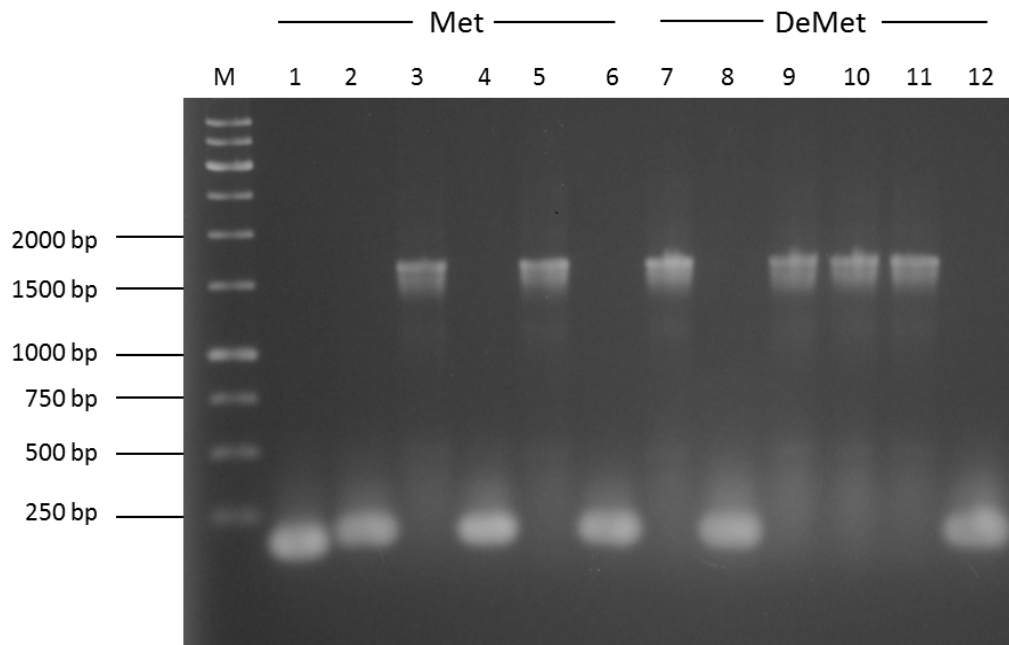
5.1. Příprava standardu pro kvantitativní analýzu Treg pomocí MS-qPCR

Za účelem kvantitativní analýzy demetylovaných TSDR sekvencí v genu pro FoxP3 byla připravena ředící řada plazmidového standardu s vloženým metylovaným či demetylovaným inzertem.

Úseky regionu TSDR pro metylovanou a demetylovanou sekvenci o délce 80 párů bazí byly připraveny pomocí primerů s kohezními konci, navrženými pro restriční endonukleázy *HindIII* a *EcoRI*. Takto připravené sekvence DNA byly komplementárně spojeny za vzniku dsDNA odpovídající zkoumanému úseku DNA. Inzerty byly ligovány do předem připraveného plazmidu pUC18 štěpeného pomocí *HindIII* a *EcoRI*. Kompetentní buňky *E. coli*, kmen TOP10 byly transformovány připravenými plazmidovými konstrukty. Vybrané rekombinantní kmeny byly testovány pomocí koloniové PCR na přítomnost vloženého konstruktu v plazmidu.

5.1.1. Ověření jednotlivých klonů pro úspěšnost transformace

Metodou koloniové PCR byly otestovány vybrané rekombinantní klony na přítomnost hledaného konstruktu v plazmidu pUC18. PCR produkty byly následně ověřeny na 1 % horizontální gelové elektroforéze (Obr. 9, str. 61)

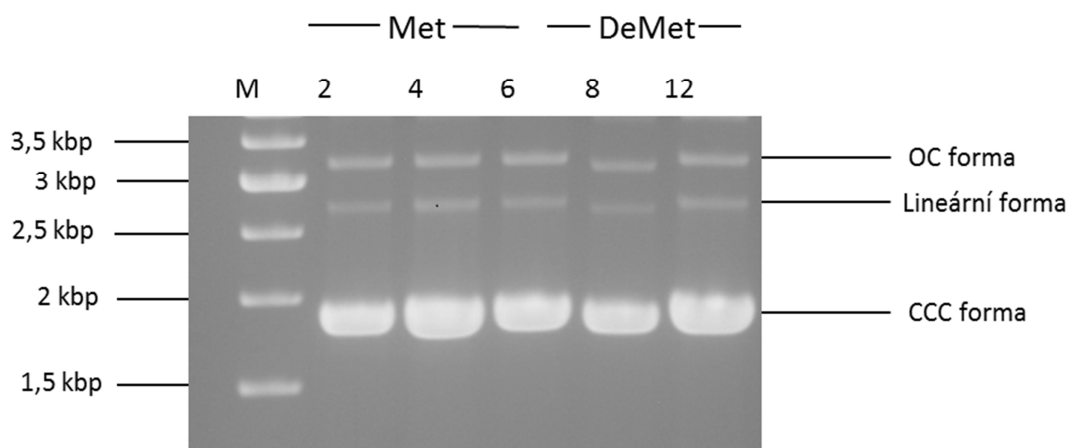


Obr. 9: Horizontální gelová elektroforéza pro ověření úspěšné transformace metylovaných a demetylovaných inzertů. Velikost PCR produktu s vloženým inzertem je 247 bp. Velikost PCR produktu bez inzertu je 167 bp. M – Marker. Met – metylovaná sekvence. DeMet – demetylovaná sekvence.

Na základě výsledku z koloniové PCR lze předpokládat, že v případě metylovaného konstruktů transformace proběhla úspěšně u kolonií č. 2, 4 a 6 a v případě demetylovaného konstruktů u kolonií č. 8 a 12.

5.1.2. Ověření kvality izolované plazmidové DNA

Z pozitivních bakteriálních klonů byla vyizolována plazmidová DNA pomocí komerčně dostupného kitu QIAprep Spin Minipreps. Čistota a kvalita izolované plazmidové DNA byla ověřena pomocí 1 % horizontální gelové elektroforézy (Obr. 10, str. 62)



Obr. 10: 1 % horizontální gelová elektroforéza izolovaných plazmidů. M – marker. Met – plazmid s metylovaným inzertem. DeMet – plazmid s demetylovaným inzertem. OC forma – otevřená kružnicová forma plazmidu. CCC forma – kovalentně uzavřená kružnicová forma plazmidu.

Sekvence plazmidové DNA byla ověřena v sekvenační reakci v sekvenačním servisu na Ústavu mikrobiologie, Akademie věd ČR. Poté byl vybrán jeden pozitivní klon *E. coli* s ověřenou metylovanou sekvencí a jeden s demetylovanou sekvencí. U obou vybraných klonů byla zjištěna stoprocentní shoda se sekvencí dostupnou v databázi (Obr. 11, str. 62)

Sekvence metylovaného inzertu	5' AACGACGGCCAGTGCCA*AGCTTCCCTCTTCTCTTCCTCCGTA ATATCGATAAAACCCGACGCATCCGACCGCCATAACGTCAAT AACGAAAAAATCG*AATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCC3'
Sekvence demetylovaného inzertu	5' AACGACGGCCAGTGCCA*AGCTTCCCTCTTCTCTTCCTCCATA ATATCAATAAAACCCAACACATCCAACCAACATAACATCAAT AACAAAAAATCG*AATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCC3'

Obr. 11: Výsledek sekvenační reakce obou plazmidových konstruktů. Sekvence 5' → 3' vlákna inzertu vloženého do mnohočetného klonovacího místa (MCS) plazmidu pUC18 se znázorněnými přesahy do plazmidové DNA. Šedě je zvýrazněna sekvence inzertu, podtržena je specifická sekvence pro restriční endonukleázy *EcoRI* a *HindIII*, hvězdičkou je znázorněno restriční místo, červeně jsou označeny nukleotidy odlišující metylovanou sekvenci od demetylované.

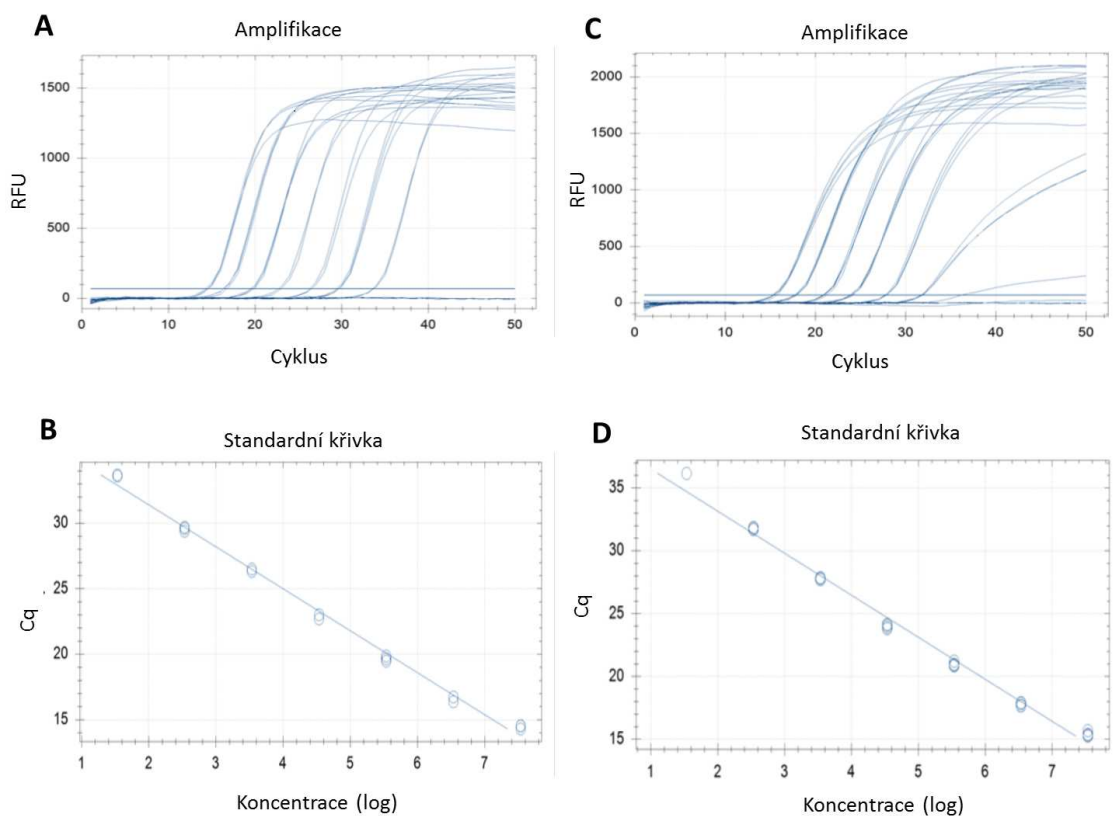
Požadované množství plazmidové DNA bylo izolováno pomocí kitu na izolaci plazmidové DNA Wizard Plus Midipreps.

Výše popsaným způsobem byl připraven jak metylovaný, tak demetylovaný plazmidový konstrukt potřebný pro stanovení hladiny Treg pomocí MS-qPCR. Oba

plazmidové konstrukty byly v této metodě využity jako standardy potřebné pro vyhodnocení dat metodou absolutní kvantifikace.

5.1.3. Ředící řada a standardní křivka metylovaného a demetylovaného plazmidu

Funkčnost obou připravených plazmidových konstruktů byla ověřena pomocí qPCR. Z obou plazmidových standardů byly připraveny odpovídající ředící řady, které byly použity jako templát v qPCR. Ředící řada metylovaného plazmidového standardu byla funkční v celém rozsahu. U demetylované ředící řady už nedocházelo u nejnižší koncentrace (nejvyššího ředění) plazmidové DNA k tak efektivní účinnosti amplifikace, a hodnoty relativní fluorescence tak byly nižší, jak je vidět na obrázku 12, panel C (strana 63) Tento fakt nicméně neměl vliv na kvalitu samotného měření. Pomocí standardních křivek, získaných z qPCR metylovaného a demetylovaného standardu, byla stanovena samotná hladina nTreg v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek s ovariálním karcinomem (Obr. 12, str. 63).

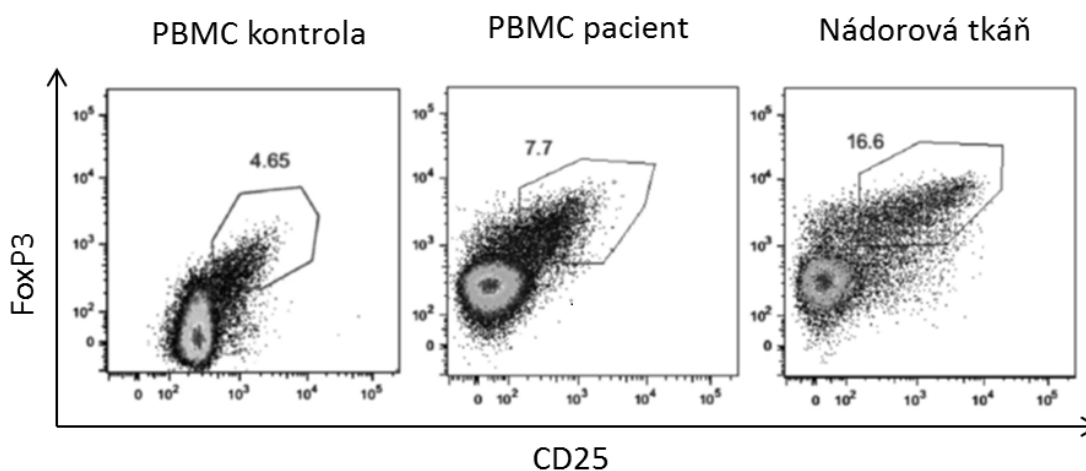


Obr. 12: Systém MS-qPCR pro detekci a kvantifikaci metylovaných úseků TSDR v genu pro FoxP3. A) Amplifikační křivky ředící řady plazmidového standardu s metylovaným inzertem. B) Standardní křivka pro ředící řadu plazmidů s metylacemi. C) Amplifikační křivky ředící řady plazmidového standardu s demetylovaným inzertem. D) Standardní křivka pro ředící řadu plazmidů s demetylacemi. RFU – relativní fluorescence, Cq – cyklus kvantifikace.

Vzhledem k možné zrychlené degradaci plazmidové DNA v nízkých koncentracích byly plazmidové standardy uchovány v -20°C v zásobní koncentraci. Ředící řada plazmidových standardů byla připravena vždy nově pro každou sérii vzorků.

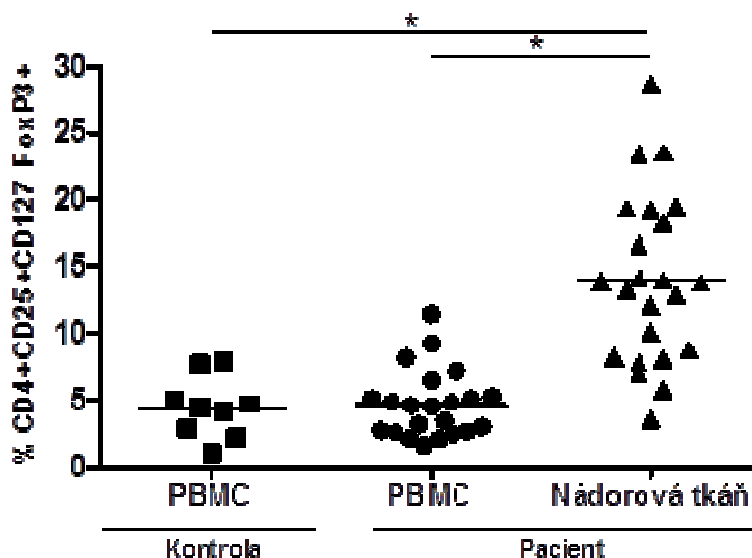
5.2. Kvantitativní analýza Treg pomocí průtokové cytometrie

Za účelem potvrzení faktu, že v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek s ovariálním karcinomem dochází k akumulaci Treg, bylo stanoveno zastoupení populace $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{CD127}^- \text{FoxP3}^+$ regulačních T lymfocytů pomocí intracelulárního a povrchového značení monoklonálními protilátkami s následnou analýzou na průtokovém cytometru. Jako kontrola byla použita periferní krev zdravých dárců. Buněčná suspenze byla připravena, jak je uvedeno v kapitole 4.3.2. Hodnoty naměřené na průtokovém cytometru byly analyzovány pomocí software FlowJo 8.5.2 (Obr. 13, str. 64).



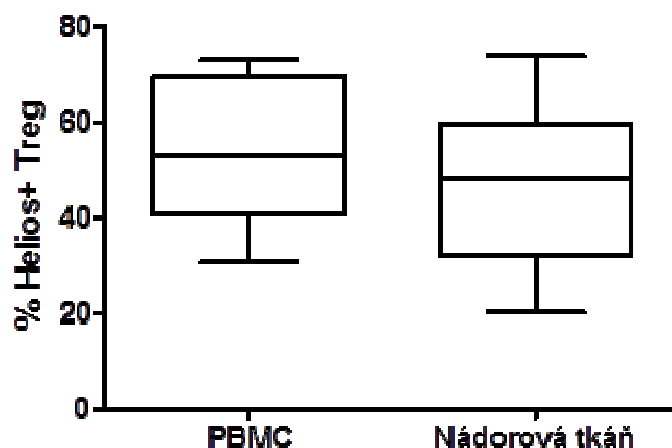
Obr. 13: Procentuální zastoupení Treg. Zastoupení $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{CD127}^- \text{FoxP3}^+$ Treg v nádorové tkáni a periferní krvi pacientky s ovariálním karcinomem a v periferní krvi zdravého dárce. PBMC – periferní mononukleární buňky.

V nádorové tkáni bylo detekováno signifikantně vyšší zastoupení regulačních T lymfocytů (průměrně 14 %) v porovnání s periferní krví pacientek (průměrně 5 %). Frekvence Treg v periferní krvi pacientek se nelišila od frekvence těchto buněk v periferní krvi zdravých dárců, kde bylo také naměřeno průměrně 5 %. (Obr. 14, str. 65). Toto množství odpovídá referenční fyziologické hodnotě Treg v periferní krvi zdravých lidí.



Obr. 14: Procentuální zastoupení Treg. Zastoupení CD4+ CD25+ CD127- FoxP3+ Treg z populace CD4+ buněk v nádorové tkáni a periferní krvi souboru pacientek s ovariálním karcinomem a v periferní krvi zdravých dárců. PBMC – periferní mononukleární buňky.

Na základě analýzy transkripčního faktoru Helios, jako markeru aktivace Treg, byla stanovena populace Helios + buněk z CD4+ CD25+ CD127- FoxP3+ regulačních T lymfocytů v periferní krvi a nádorové tkáni pacientek s ovariálním karcinomem. Průměrná hladina Helios + Treg v periferní krvi byla 53 %, v nádorové tkáni 47 % (Obr. 15, str. 66)



Obr. 15: Hladina Helios+ Treg. Zastoupení Helios+ Treg z populace CD4+ buněk v periferní krvi a nádorové tkáni pacientek s ovariálním karcinomem. PBMC – periferní mononukleární buňky.

5.3. Kvantitativní analýza nTreg pomocí Ms-qPCR

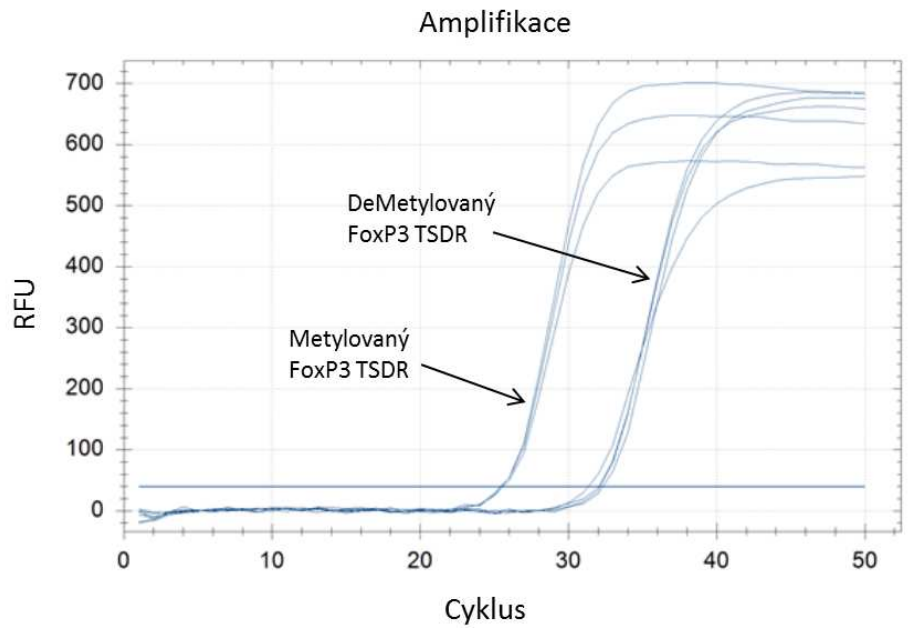
Metodou MS-qPCR byla detekována subpopulace Treg obsahující demetylovaný TSDR, které jsou právě díky této epigenetické modifikaci populací stabilních Treg zachovávajících si svůj fenotyp v různých podmínkách.

Z živých buněk nádorové tkáně (0,5 – 50 milionů) a periferní krve (1,5 – 10 milionů), zamražených v kryoprotektivním médiu, byla izolována genomová DNA (Tab. 7, str. 67). Výsledná koncentrace DNA nekoreluje s původním množstvím izolovaných buněk, protože v každém vzorku se v menší či větší míře nachází další buněčné populace, jako fibroblasty, endoteliální buňky či obecně podíl mrtvých buněk. Vzhledem k použití identické koncentrace DNA pro ošetření bisulfitem tento fakt neměl vliv na naměřená data. Izolovaná DNA tak byla ošetřena bisulfitem a poté amplifikována pomocí MS-qPCR. Z naměřených dat bylo stanoveno zastoupení nTreg.

Pacientka	Počet buněk nádorové tkáň (M)	Koncentrace gDNA (ng/μl)	Počet buněk PBMC (M)	Koncentrace gDNA (ng/μl)
1	0,5	24,4	3,5	97,6
2	14	77,5	7	136,9
3	8	437,7	3	857,7
4	10	398,3	3	519,4
5	14	191	2,5	283,2
6	9	574,8	1,5	268,7
7	15	330,8	5	171,2
8	8	60,8	2	69,3
9	8	325	4	456,5
10	50	159,8	1,6	398,7
11	20	231,8	4	116,5
12	5	180,8	6	318,8
13	14	211,5	4	146,5
14	10	208,5	2	75,9
15	30	276,6	2	53,6
16	11	227,6	2	298,7
17	32	75,8	-	-
18	8,4	-	3,7	91,2
19	-	-	6	171
20	10	338,3	4	360,9
21	0,7	-	5,5	174,8
22	50	192,5	10	379,6
23	2	327,4	3,4	214,9
24	20	377,8	2	451,2

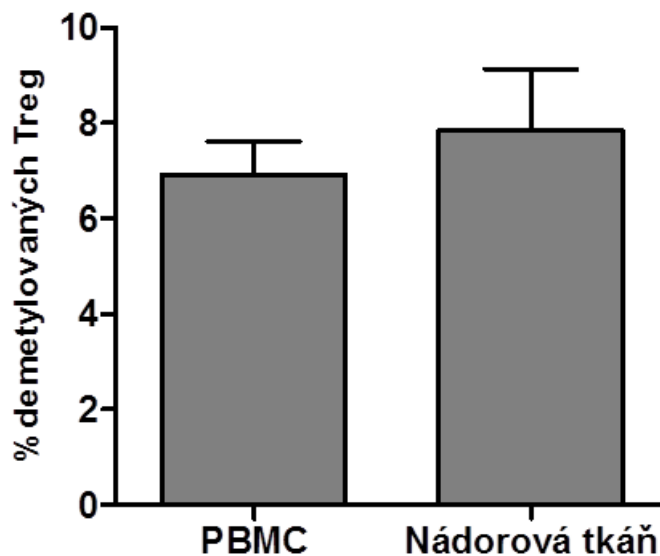
Tab. 7: Izolace genomové DNA. Výtěžky buněk (nádorových buněk a T lymfocytů) izolovaných z nádorové tkáň a periferní krve pacientek s karcinomem ovaria a koncentrace izolované DNA. gDNA – genomová DNA, M – počet buněk v milionech.

Z důvodu minoritního zastoupení Treg s demetylovaným úsekem FoxP3 TSDR DNA docházelo k amplifikaci a tak i k nárůstu relativní fluorescence výrazně později, než k amplifikaci metylovaných úseků FoxP3 TSDR DNA, jak je vidět na obrázku 16 (str. 68).



Obr. 16: Amplifikační křivka metylované a demetylované sekvence TSDR regionu genu pro FoxP3 (ukázka na příkladu vybraného patientského vzorku).

Pomocí MS-qPCR bylo kvantifikováno zastoupení subpopulace nTreg. V nádorové tkáni bylo detekováno průměrně 8 % nTreg, v periferní krvi pacientek bylo detekováno průměrně 7 % nTreg (Obr. 17, str. 68).



Obr. 17: Zastoupení nTreg v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek s ovariálním karcinomem a periferní krvi zdravých dárců. PBMC – periferní mononukleární buňky.

5.4. Sledování expresního profilu nádorových antigenů karcinomu ovaria

Pro detailní charakterizaci nádorových antigenů exprimovaných na primárních nádorových buňkách pacientek s karcinomem ovaria ($n = 21$) bylo vybráno 15 antigenů (MUC-1, EpCAM, Her-2/neu, FOLR-1, CA-125, PRAME, TPBG, NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-A10, MAGE-A12, DDX-43, TRT, BIRC-5, CEA), jejichž zvýšená exprese je v různé míře s tímto onemocněním asociována. U těchto antigenů byla stanovena relativní exprese mRNA. Výsledky byly porovnány s expresním profilem periferní krve zdravých dárců ($n = 10$). Za účelem zjistit, zda během progresu onemocnění dochází ke změně v expresi nádorových antigenů, byla porovnána exprese mRNA těchto antigenů u pacientek v časném ($n = 5$) a pokročilém stádiu ($n = 16$).

Mnoho imunoterapeutických protokolů je dnes založeno na využití znalosti antigenů, které jsou exprimovány primárními nádorovými buňkami a nádorovými liniemi a které by mohly napomoci aktivovat účinnou imunitní odpověď proti nádoru. Za účelem stanovení shody mezi antigenním profilem nádorových buněk pacientek a ovariálních nádorových linií byly otestovány linie OV-90 a SKOV-3 a porovnány s expresním profilem pacientek získaných do studie.

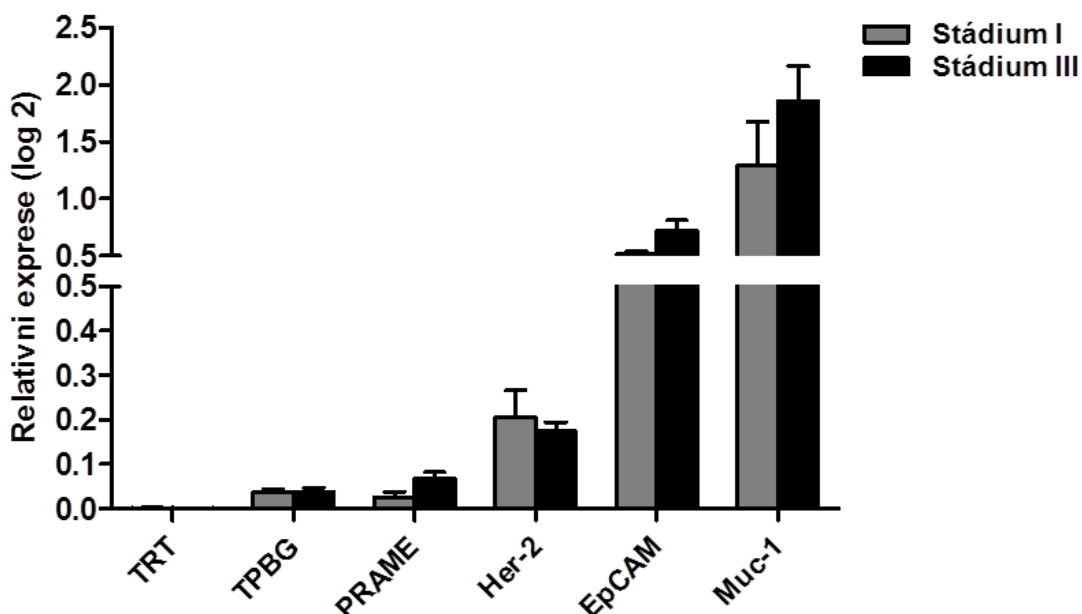
Koncentrace RNA izolované z nádorové tkáně byla měřena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2100 od firmy Thermo Scientific. Výsledná koncentrace RNA nekoreluje s původním množstvím izolovaných buněk, a to ze stejného důvodu, jako tomu bylo u izolace DNA. Stupeň integrity RNA (RIN) byl měřen metodou kapilární gelové elektroforézy na přístroji Bioanalyzer 2100 od firmy Agilent (Tab.8, str.70). U většiny analyzovaných vzorků byl zachován vysoký stupeň integrity RNA. Několik vzorků bylo částečně degradováno, nicméně pro následné měření expresního profilu byly použity všechny nasbírané vzorky. Kvalita RNA byla i tak pro přípravu cDNA a samotnou qPCR dostatečná u všech vzorků.

Pacientka	Počet buněk pro izolaci RNA (M)	Koncentrace izolované RNA (ng/μl)	Stupeň integrity RNA (RIN)
2	14	71,5	9,6
3	8	108,3	9,7
4	10	79,6	4,3
6	9	104,8	9,4
7	15	164	9,0
8	8	47,6	3,2
9	8	98,5	9,5
10	50	19,2	1,7
13	14	144,8	9,3
14	10	257,4	5,2
15	30	243,4	5,6
16	11	94,6	9,4
17	32	147,8	2,7
18	8,5	33,1	9,3
20	10	104,6	9,5
22	50	32,8	8,9
23	9	82,1	7,4
24	20	163,4	9,1
25	35	143,9	2,5
26	7	126,1	7,7
27	3	88,7	6,9

Tab. 8: Izolace RNA. Výtěžky buněk (nádorových buněk a T lymfocytů) izolovaných z nádorové tkáně a periferní krve pacientek s karcinomem ovaria, koncentrace izolované RNA a stupeň integrity RNA (stupnice 0 – 10, kde 0 je zcela degradovaná RNA). M - počet buněk v milionech.

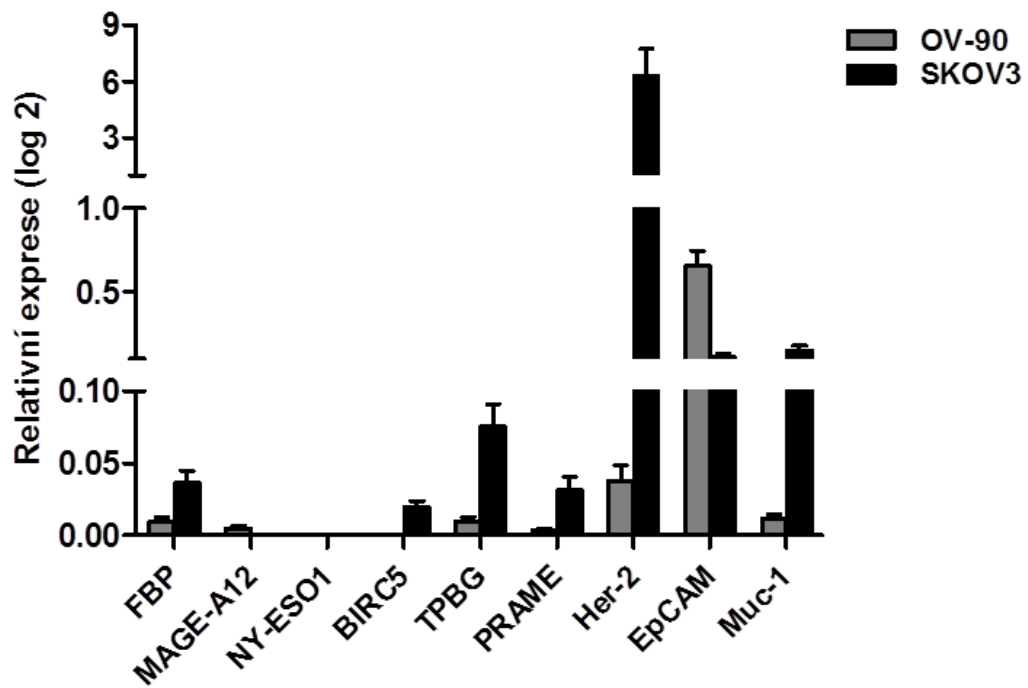
Nejprve jsem porovnávala rozdíl v relativní expresi mRNA nádorových antigenů u skupiny pacientek v porovnání se skupinou zdravých kontrol. K nejvyššímu nárůstu relativní exprese mRNA došlo u nádorového antigenu MUC-1 ($p = 0,003$) a EpCAM ($p = 0,002$). Signifikantní rozdíl v porovnání se zdravými kontrolami byl dále pozorován u antigenu Her-2/neu ($p = 0,001$), PRAME ($p = 0,05$), TPBG ($p = 0,02$). Míra exprese nádorového antigenu TRT byla ještě stále signifikantní, ale blížila se již hranici detekce ($p = 0,04$). Nádorové antigeny, jejichž exprese u patientských vzorků je zobrazena na obrázku 18 (str. 71), byla u vzorků pocházejících od zdravých dárců téměř nedetekovatelná. Výjimkou byl antigen Her-2/neu, nicméně i exprese tohoto antigenu byla v porovnání s expresí u patientských vzorků téměř zanedbatelná. V následujícím grafu proto nejsou hodnoty relativní exprese zdravých kontrol zobrazeny. Porovnáním

expresního profilu u pacientek v časném a pokročilém stádiu onemocnění nebyl pozorován signifikantní rozdíl u žádného z vybraných antigenů (Obr. 18, str. 71)



Obr. 18: Relativní exprese nádorových antigenů na primárních nádorových buňkách pacientek s ovariálním karcinomem ve stádiu I a III.

Relativní exprese vybraných nádorových antigenů se u obou nádorových linií výrazně lišila (Obr. 19, str. 72). Velká odlišnost v expresi byla naměřena také mezi liniemi a primárními nádorovými buňkami. Buňky nádorové linie SK-OV-3 produkovaly signifikantně vyšší hladinu antigenu Muc-1 ($p = 0,001$), TPBG ($p = 0,003$), PRAME ($p = 0,006$), FBP ($p = 0,019$), BIRC5 ($p = 0,001$), MAGE-A12 ($p = 0,001$) a NY-ESO-1 ($p = 0,012$) v porovnání s linií OV-90. Expres Her-2 ($p = 0,001$) byla signifikantně vyšší u nádorové linie SK-OV-3 v porovnání s linií OV-90 a zároveň signifikantně vyšší než u primárních nádorových buněk. U těch docházelo k signifikantně vyšší expresi Muc-1, zatímco ani u jedné z linií k tak výrazné expresi Muc-1 nedocházelo. Expres CA-125 byla specifická pouze u nádorové linie SK-OV-3, zatímco k expresi MAGE-A3, CEA a DDX-43 docházelo pouze u nádorové linie OV-90.



Obr. 19: Relativní exprese nádorových antigenů na ovariálních nádorových liniích OV-90 a SK-OV-3.

6. Diskuze

Regulační T lymfocyty jsou imunosupresivní populací T buněk, které za fyziologických podmínek udržují imunitní homeostázu a potlačují riziko vzniku autoimunitních onemocnění (Sakaguchi *et al.*, 1995). Negativní roli ale hrají u většiny nádorových onemocnění, kde potlačují protinádorovou imunitní odpověď a korelují s horší prognózou pacientů (Takenaka *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2001). Z důvodu detailního porozumění vlivu těchto buněk na vznik a progresi nádorů je nutné mít k dispozici metody sloužící k jejich spolehlivé detekci a kvantifikaci jak přímo v nádorovém mikroprostředí, tak v periferní krvi pacientů. Hladina Treg může sloužit jako důležitý diagnostický a prognostický ukazatel (Ladoire *et al.*, 2011).

V první části této diplomové práce jsem se zabývala kvantitativní analýzou Treg v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek s karcinomem ovaria z hlediska fenotypového, aktivačního a funkčního aspektu. Na základě fenotypu jsem stanovila zastoupení CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ FoxP3⁺ Treg pomocí průtokového cytometru. U takto definované buněčné populace jsem navíc hodnotila aktivační stav buněk pomocí transkripčního faktoru Helios (Gottschalk *et al.*, 2012). Pro kvantifikaci nTreg jsem nejprve úspěšně zavedla metodu specifické detekce těchto buněk, tzv. MS-qPCR. Pomocí této metody jsem následně detekovala hladinu nTreg, které se od ostatních regulačních T buněk liší demethylací TSDR regionu v genu pro FoxP3. Tato epigenetická modifikace navozuje u nTreg stabilní expresi FoxP3, která udržuje funkční stav a stabilitu těchto buněk. Demetylované Treg tak nepodléhají plasticitě a udržují si svůj fenotyp (Toker *et al.*, 2013).

Abych mohla sledovat dynamiku frekvence Treg během progresu onemocnění, bylo mou snahou získat dostatečné množství vzorků jak z časných, tak i pokročilých fází nemoci. Nicméně kvůli asymptomatickým projevům v počátcích vzniku tohoto onemocnění je ve stádiích I a II diagnostikováno méně než 20 % všech případů ovariálního karcinomu (Visintin *et al.*, 2008). Většinu experimentů jsem proto prováděla na vzorcích z pokročilých stádií a velká část získaných vzorků proto také pochází z III. stadia. I přes nedostupnost čerstvé nádorové tkáně od pacientek v I. stadiu onemocnění se mi podařilo získat a posléze analyzovat pět těchto vzorků. Vzhledem k vzácnosti tohoto materiálu nadále pokračuji v nábore nových vzorků, a rozšiřuji tak skupinu pacientů především v časném stádiu onemocnění. Tato skupina je bezpochyby velmi důležitá pro úspěšné provedení dalších experimentů.

Stanovením procentuálního zastoupení hladiny Treg pomocí průtokového cytometru v nádorové tkáni skupiny pacientek s ovariálním karcinomem jsem potvrdila signifikantní nárůst těchto buněk oproti zastoupení Treg v periferní krvi pacientek i zdravých dárců. V nádorové tkáni jsem detekovala průměrně 14,3 % Treg. Naměřené hodnoty zastoupení Treg v nádorové tkáni jsou v souladu s mnoha dalšími studii, prováděnými nejen na karcinomu ovaria (Curiel *et al.*, 2004), ale i na karcinomu plic (Woo *et al.*, 2001), karcinomu prsu, karcinomu pankreatu (Liyanage *et al.*, 2002), melanomu (Viguer *et al.*, 2004) a dalších nádorových onemocněních. V některých studiích byla pozorována signifikantně vyšší hladina Treg cirkulujících v periferní krvi pacientů s nádorovým onemocněním ve srovnání s periferní krví zdravých dárců (Wolf *et al.*, 2003). Nabízí se tak otázka, zdali by stanovení hladiny Treg v periferní krvi nemohlo sloužit jako potenciální diagnostický marker. Já jsem ale tento jev během svého projektu nepozorovala. V periferní krvi pacientek jsem naměřila průměrně 4,6 % Treg a u zdravých dárců v průměru 4,4 % Treg. Mezi hladinou Treg vyskytující se v periferní krvi pacientek a zdravých dárců jsem tak nepozorovala signifikantní rozdíl. Zvýšená hladina Treg je u většiny nádorových onemocnění asociována se zhoršenou prognózou (Wolf *et al.*, 2005) a také se sníženou účinností imunoterapeutických léčebných postupů (Yao *et al.*, 2012). Částečné nebo úplné potlačení efektorové funkce Treg navozuje protinádorovou imunitní odpověď zpomalující progresi nebo dokonce preventivně zabraňuje samotnému vzniku nádorového bujení, jak potvrdily studie provedené v roce 2010 na myším modelu (Teng *et al.*, 2010). Deplecí Treg u karcinomu ovaria a dalších nádorových onemocnění bylo dále prokázáno zvýšení účinku protinádorových imunoterapeutických vakcín (de Vries *et al.*, 2011; Klages *et al.*, 2010; Vermeij *et al.*, 2012). Překvapivé zjištění ale učinili v roce 2009 Salama a kolektiv, kteří naopak pozorovali zlepšenou prognózu s rostoucí hladinou Treg u pacientů s kolorektálním karcinomem (Salama *et al.*, 2009). Tyto výsledky byly o rok později potvrzeny Freyem (Frey *et al.*, 2010). Doposud učiněná zjištění tak prohlubují důležitost úplného porozumění úlohy Treg v nádorovém mikroprostředí pro následnou optimalizaci imunoterapeutických protokolů pro každý typ nádorového onemocnění.

Ve snaze dosáhnout co nejpřesnějších výsledků s vysokou vypovídací hodnotou bylo mou snahou získat jako kontrolu vzorky ovaria zdravých dárců. Kvůli komplikované dostupnosti takové tkáně byla vybrána jako alternativní kontrola periferní krev zdravých dárců. Nicméně vzhledem k dlouhodobější perspektivě tohoto projektu

v naší laboratoři je z důvodu přesnějšího srovnání výsledků plánováno několik takových vzorků zdravého ovaria získat.

U naměřené populace Treg jsem sledovala podíl aktivovaných buněk na základě přítomnosti transkripčního faktoru Helios, jako markeru aktivace Treg (Akimova *et al.*, 2011). Přibližně polovina stanovené populace Treg v nádorové tkáni i periferní krvi byla Helios+ a tudíž v aktivovaném stavu. Transkripční faktor Helios byl dříve považován spíše za marker odlišující populaci nTreg pocházející z thymu od populace iTreg vznikající v periférii (Thornton *et al.*, 2010). Právě Akimova a její tým tuto hypotézu brzy zpochybnili. Dnes je tak jasné, že zastoupení Helios+ Treg udává míru aktivace těchto buněk (Akimova *et al.*, 2011). Z těchto zjištění lze usuzovat, že čím více se Helios+ Treg v organismu nachází, tím intenzivnější imunoprese zde pravděpodobně probíhá.

Pro kvantitativní analýzu nTreg, jako populaci stabilních regulačních T buněk, které jsou asociovány se zhoršenou prognózou pacientek s ovariálním karcinomem, jsem v naší laboratoři zavedla metodu MS-qPCR. Tato vysoce specifická a citlivá metoda byla navržena v roce 2009 Wiczorkem, který takto potvrdil zvýšenou hladinu nTreg v nádorové tkáni pacientů s karcinomem tlustého střeva, karcinomem plic a s melanomem (Wiczorek *et al.*, 2009). Pro vyhodnocení analyzovaných vzorků jsem připravila ředící řadu plazmidového standardu s vloženým inzertem obsahujícím metylovaný či demetylovaný TSDR region genu pro FoxP3. V nádorové tkáni jsem stanovila průměrně 8 % nTreg. V periferní krvi pacientek jsem naměřila v průměru 7 % nTreg. Je třeba říci, že hladina nTreg, kterou jsem naměřila na souboru nasbíraných vzorků pomocí MS-qPCR, dosahuje vyšších hodnot, než jaká byla v naší laboratoři pozorována v rámci předchozího projektu, týkajícího se sledování dynamiky frekvence tumor infiltrujících T lymfocytů během progresu ovariálního karcinomu (Fialova *et al.*, 2013). Na objasnění pozorovaných rozdílů dále pracujeme.

Další zásadní pokrok v léčbě ovariálního karcinomu by přineslo nalezení specifického biomarkeru odhalujícího již časná stadia tohoto onemocnění, na základě něhož by bylo možné stanovit diagnózu u jinak asymptomatických pacientek, zahájit včasnou léčbu a zvýšit tak celkové přežívání. Důležitým prognostickým ukazatelem by mohl být biomarker odlišující časná stadia od těch pozdních. Jednou ze zkoumaných cílových skupin pro tyto účely se staly nádorové antigeny produkované

samotnými nádorovými buňkami (Pietzner *et al.*, 2013; Spinosa a Kanduc, 2014).

Dalším možným diagnostickým nástrojem by mohla být detekce protilátek proti nádorovým antigenům v séru pacientek. Studie provedené v roce 2005 Li a kolektivem ukázaly, že cirkulující protilátky proti některým nádorovým antigenům, například proti p53, mohou být detekovány již dlouhou dobu před klinickou manifestací samotného onemocnění (Li *et al.*, 2005). Avšak experimenty provedené v naší laboratoři v rámci studie na ovariálním karcinomu potvrdily přítomnost protilátek pouze proti nádorovému antigenu NY-ESO-1 (Hromádková *et al.*, v recenzním řízení). Většina dnes známých informací o expresních profilech antigenů pochází z nádorových linií. Pouze minimum dat bylo doposud získáno na základě analýzy primárních nádorových buněk.

V druhé části této diplomové práce jsem se proto zaměřila na stanovení hladiny exprese skupiny vybraných nádorových antigenů jako potenciálních molekulárních markerů detekce časného stadia ovariálního karcinomu. Tyto antigeny mohou hrát významnou roli vedoucí k úspěšnému sledování prognózy onemocnění.

Dalším mým stanoveným cílem bylo zjistit, zda expresní profil primárních nádorových buněk reflektuje profil změřený u ovariální nádorové linie OV-90 a SK-OV-3. Analýzu exprese vybraných nádorových antigenů jsem provedla na nádorové tkáni souboru 21 pacientek s časným a pokročilým stadiem ovariálního karcinomu. K nejvíce exprimovaným antigenům primárních nádorových buněk patřil Muc-1, EpCAM a dále pak Her-2. Zvýšená exprese těchto antigenů byla pozorována v dalších studiích prováděných na ovariálním karcinomu (Bellone *et al.*, 2009; Hellstrom *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007).

Porovnáním exprese nádorových antigenů pacientek ve stadiu I a III jsem nepozorovala signifikantní rozdíl u žádného měřeného antigenu. Mohu tak usuzovat, že expresní profil se během progresu onemocnění pravděpodobně nemění.

Porovnání expresního profilu primárních nádorových buněk a nádorových linií ovariálního karcinomu je důležité pro výběr vhodné nádorové linie, která by mohla být využita jako zdroj širokého spektra nádorových antigenů v imunoterapeutických protokolech. Zajímavé je, že exprese nádorových antigenů karcinomu ovaria se mezi dvěma vybranými liniemi OV-90 a SK-OV-3 výrazně lišila a odlišný expresní profil byl pozorován i mezi nádorovými liniemi a primárními nádorovými buňkami. Tento výsledek zdůrazňuje důležitost výběru vhodného spektra nádorových antigenů pro následné navržení účinné imunoterapie. V další části projektu plánujeme posoudit

vhodnost detekovaných nádorových antigenů pro sledování minimální reziduální nemoci v periferní krvi, event. pro detekci cirkulujících nádorových buněk. Tyto metodiky by mohly přispět k identifikaci velmi časných fází relapsu onemocnění, před detekcí relapsu pomocí zobrazovacích metod, a tím k dřívějšímu zahájení terapie.

7. Závěr

V této diplomové práci jsem se zaměřila na sledování dynamiky nádorového mikroprostředí a periferní krve pacientek s karcinomem ovaria ze dvou aspektů.

Specifická detekce a kvantifikace hladiny regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni by mohla pomoci při určení prognózy tohoto onemocnění a jejich následná eliminace by mohla vést k posílení protinádorové imunitní odpovědi.

1. **Kvantitativní analýza regulačních T lymfocytů infiltrujících nádorovou tkáň a cirkulujících v periferní krvi těchto pacientek**

- Zavedla jsem vysoce specifickou metodu metyl-senzitivní kvantitativní PCR (Ms-qPCR) pro detekci regulačních T lymfocytů
- Pomocí průtokové cytometrie jsem potvrdila akumulaci aktivovaných regulačních T lymfocytů v nádorové tkáni, a zároveň jsem nepozorovala rozdíl v hladině regulačních T lymfocytů periferní krve pacientek v porovnání se zdravými kontrolami
- Pomocí MS-qPCR jsem stanovila podíl regulačních T lymfocytů, vykazujících stabilní a tudíž plně funkční fenotyp, který zajišťuje těmto buňkám schopnost efektivního potlačování protinádorové imunitní odpovědi

Velký pokrok v léčbě by dále přineslo nalezení specifického markeru, který by mohl být využit pro včasnou diagnózu tohoto onemocnění, která v současné době díky asymptomatickým projevům není možná.

2. **Analýza exprese patnácti vybraných nádorových antigenů na primárních nádorových buňkách a srovnání s expresním profilem vybraných nádorových linií**

- U šesti z patnácti analyzovaných nádorových antigenů jsem detekovala signifikantní nárůst exprese mRNA v nádorové tkáni ve srovnání se zdravými kontrolami
- U žádného měřeného nádorového antigenu jsem nepozorovala signifikantní změnu v hladině exprese mRNA během progresu onemocnění
- Expresní profil primárních nádorových buněk vykazuje velkou odlišnost v porovnání s expresním profilem vybraných ovariálních nádorových

linií a velká variabilita byla pozorována i mezi oběma nádorovými liniemi ovariálního karcinomu

Zaměření této diplomové práce mi dovolilo se částečně podílet také na dalších výzkumných projektech, které jsou součástí výzkumu protinádorových imunoterapeutických vakcín ve společnosti Sotio v Praze. Být součástí vědecké skupiny v takovém subjektu považuji za zcela jedinečnou a nepochybně důležitou zkušenost, kterou bych ráda využila pro svůj další profesní vývoj.

8. Seznam použité literatury

- Aandahl, E.M., K.M. Torgersen, and K. Tasken. 2008. CD8+ regulatory T cells-A distinct T-cell lineage or a transient T-cell phenotype? *Human immunology* 69:696-699.
- Aida, K., R. Miyakawa, K. Suzuki, K. Narumi, T. Udagawa, Y. Yamamoto, T. Chikaraishi, T. Yoshida, and K. Aoki. 2014. Suppression of Tregs by anti-glucocorticoid induced TNF receptor antibody enhances the antitumor immunity of interferon-alpha gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer science* 105:159-167.
- Akimova, T., U.H. Beier, L. Wang, M.H. Levine, and W.W. Hancock. 2011. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PloS one* 6:e24226.
- Ali-Fehmi, R., M. Chatterjee, A. Ionan, N.K. Levin, H. Arabi, S. Bandyopadhyay, J.P. Shah, C.S. Bryant, S.M. Hewitt, M.G. O'Rand, O.M. Alekseev, R. Morris, A. Munkarah, J. Abrams, and M.A. Tainsky. 2010. Analysis of the expression of human tumor antigens in ovarian cancer tissues. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 6:33-48.
- Alvaro, T., M. Lejeune, M.T. Salvado, R. Bosch, J.F. Garcia, J. Jaen, A.H. Banham, G. Roncador, C. Montalban, and M.A. Piris. 2005. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:1467-1473.
- Audia, S., A. Nicolas, D. Cathelin, N. Larmonier, C. Ferrand, P. Foucher, A. Fanton, E. Bergoin, M. Maynadie, L. Arnould, A. Bateman, B. Lorcerie, E. Solary, B. Chauffert, and B. Bonnotte. 2007. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+ CD25+ T lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 150:523-530.
- Badoual, C., S. Hans, W.H. Fridman, D. Brasnu, S. Erdman, and E. Tartour. 2009. Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:e5-6; author reply e7.
- Barnett, J.C., S.M. Bean, R.S. Whitaker, E. Kondoh, T. Baba, S. Fujii, J.R. Marks, H.K. Dressman, S.K. Murphy, and A. Berchuck. 2010. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecologic oncology* 116:556-562.
- Bartůňková, J., a M. Paulík. 2005. Vyšetřovací metody v imunologii. Grada, Praha.
- Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T.J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *European journal of immunology* 37:2378-2389.

- Basal, E., G.Z. Eghbali-Fatourehchi, K.R. Kalli, L.C. Hartmann, K.M. Goodman, E.L. Goode, B.A. Kamen, P.S. Low, and K.L. Knutson. 2009. Functional folate receptor alpha is elevated in the blood of ovarian cancer patients. *PLoS one* 4:e6292.
- Bellone, S., E.R. Siegel, E. Cocco, M. Cargnelutti, D.A. Silasi, M. Azodi, P.E. Schwartz, T.J. Rutherford, S. Pecorelli, and A.D. Santin. 2009. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule in primary, metastatic, and recurrent/chemotherapy-resistant epithelial ovarian cancer: implications for epithelial cell adhesion molecule-specific immunotherapy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 19:860-866.
- Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27:20-21.
- Bohling, S.D., and K.H. Allison. 2008. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21:1527-1532.
- Bookman, M.A. 2005. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 15 Suppl 3:212-220.
- Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, and C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55:611-622.
- Calcinotto, A., P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Milito, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso, M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone, and L. Rivoltini. 2012. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer research* 72:2746-2756.
- Coe, D., S. Begom, C. Addey, M. White, J. Dyson, and J.G. Chai. 2010. Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59:1367-1377.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10:942-949.

- Curotto de Lafaille, M.A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, and J.J. Lafaille. 2008. Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29:114-126.
- Curotto de Lafaille, M.A., and J.J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635.
- de Vries, I.J., C. Castelli, C. Huygens, J.F. Jacobs, J. Stockis, B. Schuler-Thurner, G.J. Adema, C.J. Punt, L. Rivoltini, G. Schuler, P.G. Coulie, and S. Lucas. 2011. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:841-848.
- deLeeuw, R.J., S.E. Kost, J.A. Kakal, and B.H. Nelson. 2012. The prognostic value of FoxP3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18:3022-3029.
- Disis, M.L., K.L. Knutson, K. Schiffman, K. Rinn, and D.G. McNeel. 2000. Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Breast cancer research and treatment* 62:245-252.
- du Bois, A., H.J. Luck, W. Meier, H.P. Adams, V. Mobus, S. Costa, T. Bauknecht, B. Richter, M. Warm, W. Schroder, S. Olbricht, U. Nitz, C. Jackisch, G. Emons, U. Wagner, W. Kuhn, J. Pfisterer, and G. Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie Ovarian Cancer Study. 2003. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 95:1320-1329.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology* 22:329-360.
- DuPage, M., C. Mazumdar, L.M. Schmidt, A.F. Cheung, and T. Jacks. 2012. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* 482:405-409.
- Feng, H., M. Ghazizadeh, H. Konishi, and T. Araki. 2002. Expression of MUC1 and MUC2 mucin gene products in human ovarian carcinomas. *Japanese journal of clinical oncology* 32:525-529.
- Fialova, A., S. Partlova, L. Sojka, H. Hromadkova, T. Brtnicky, J. Fucikova, P. Kocian, L. Rob, J. Bartunkova, and R. Spisek. 2013. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 132:1070-1079.
- Fransen, M.F., T.C. van der Sluis, F. Ossendorp, R. Arens, and C.J. Melief. 2013. Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8⁺ T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. *Clinical*

- cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19:5381-5389.
- Fratta, E., S. Coral, A. Covre, G. Parisi, F. Colizzi, R. Danielli, H.J. Nicolay, L. Sigalotti, and M. Maio. 2011. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular oncology* 5:164-182.
- Frey, D.M., R.A. Droezer, C.T. Viehl, I. Zlobec, A. Lugli, U. Zingg, D. Oertli, C. Kettelhack, L. Terracciano, and L. Tornillo. 2010. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126:2635-2643.
- Fučíková, J. 2009. Příprava protinádorové vakcíny pro imunoterapii karcinomu ovaria za podmínek správné výrobní praxe. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci králové
- Gasowska-Bodnar, A., L. Bodnar, A. Dabek, M. Cichowicz, M. Jerzak, S. Cierniak, W. Kozłowski, and W. Baranowski. 2014. Survivin Expression as a Prognostic Factor in Patients With Epithelial Ovarian Cancer or Primary Peritoneal Cancer Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*
- Ghiringhelli, F., C. Menard, P.E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel, and B. Chauffert. 2007. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56:641-648.
- Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison. 2012. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology* 188:976-980.
- Guo, R., L. Cheng, Y. Zhao, J. Zhang, C. Liu, H. Zhou, and L. Jia. 2013. Glycogenes mediate the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocarcinoma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45:347-358.
- Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, and S. Fujii. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:3360-3365.
- Heinzelmann-Schwarz, V.A., M. Gardiner-Garden, S.M. Henshall, J. Scurry, R.A. Scolyer, M.J. Davies, M. Heinzelmann, L.H. Kalish, A. Bali, J.G. Kench, L.S. Edwards, P.M. Vanden Bergh, N.F. Hacker, R.L. Sutherland, and P.M. O'Brien. 2004. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:4427-4436.

- Hellstrom, I., G. Goodman, J. Pullman, Y. Yang, and K.E. Hellstrom. 2001. Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas. *Cancer research* 61:2420-2423.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:5423-5434.
- Hoos, A., R. Ibrahim, A. Korman, K. Abdallah, D. Berman, V. Shahabi, K. Chin, R. Canetta, and R. Humphrey. 2010. Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Seminars in oncology* 37:533-546.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Hořejší, V., a J. Bartůňková. 2005. *Základy imunologie*. 3. vydání. Triton, Praha.
- Chambers, C.A., T.J. Sullivan, and J.P. Allison. 1997. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 7:885-895.
- Chatterjee, M., S. Mohapatra, A. Ionan, G. Bawa, R. Ali-Fehmi, X. Wang, J. Nowak, B. Ye, F.A. Nahhas, K. Lu, S.S. Witkin, D. Fishman, A. Munkarah, R. Morris, N.K. Levin, N.N. Shirley, G. Tromp, J. Abrams, S. Draghici, and M.A. Tainsky. 2006. Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer research* 66:1181-1190.
- Chen, K.J., S.Z. Lin, L. Zhou, H.Y. Xie, W.H. Zhou, A. Taki-Eldin, and S.S. Zheng. 2011. Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. *PloS one* 6:e24671.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198:1875-1886.
- Chen, Y.L., M.C. Chang, C.Y. Huang, Y.C. Chiang, H.W. Lin, C.A. Chen, C.Y. Hsieh, and W.F. Cheng. 2012. Serous ovarian carcinoma patients with high alpha-folate receptor had reducing survival and cytotoxic chemo-response. *Molecular oncology* 6:360-369.
- Chen, Y.T., M.J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A.O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh, and L.J. Old. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:1914-1918.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of immunology* 162:5317-5326.

- Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A.H. Enk. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *The Journal of experimental medicine* 196:255-260.
- Khong, H.T., and N.P. Restifo. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology* 3:999-1005.
- Klages, K., C.T. Mayer, K. Lahl, C. Loddenkemper, M.W. Teng, S.F. Ngiow, M.J. Smyth, A. Hamann, J. Huehn, and T. Sparwasser. 2010. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer research* 70:7788-7799.
- Krejsek, J., a O. Kopecký. 2004. *Klinická imunologie*. Nucleus, Hradec Králové
- Ladoire, S., F. Martin, and F. Ghiringhelli. 2011. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60:909-918.
- Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-1736.
- Lee, A.M., A.J. Clear, M. Calaminici, A.J. Davies, S. Jordan, F. MacDougall, J. Matthews, A.J. Norton, J.G. Gribben, T.A. Lister, and L.K. Goff. 2006. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:5052-5059.
- Letterio, J.J., and A.B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual review of immunology* 16:137-161.
- Li, Y., A. Karjalainen, H. Koskinen, K. Hemminki, H. Vainio, M. Shnaidman, Z. Ying, E. Pukkala, and P.W. Brandt-Rauf. 2005. p53 autoantibodies predict subsequent development of cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 114:157-160.
- Li, Y.Q., F.F. Liu, X.M. Zhang, X.J. Guo, M.J. Ren, and L. Fu. 2013. Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PloS one* 8:e76379.
- Lio, C.W., and C.S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
- Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, and D.C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology* 169:2756-2761.
- Maraei, A.A., A.Z. Hatta, M.S. Shiran, and G.C. Tan. 2012. Human telomerase reverse transcriptase expression in ovarian tumors. *Indian journal of pathology & microbiology* 55:187-191.
- Miracco, C., V. Mourmouras, M. Biagioli, P. Rubegni, S. Mannucci, I. Monciatti, E. Cosci, P. Tosi, and P. Luzzi. 2007. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+

- regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncology reports* 18:1115-1122.
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J.J. Lafaille, and M.A. Curotto de Lafaille. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation* 115:1923-1933.
- Murphy, K. 2012. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, New York.
- Nathanson. 1976. Spontaneous regression of malignant melanoma: a review of the literature on incidence, clinical features, and possible mechanisms. *National Cancer Institute monograph* 44:67-76.
- Nettenstrom, L., K. Alderson, E.E. Raschke, M.D. Evans, P.M. Sondel, S. Olek, and C.M. Seroogy. 2013. An optimized multi-parameter flow cytometry protocol for human T regulatory cell analysis on fresh and viably frozen cells, correlation with epigenetic analysis, and comparison of cord and adult blood. *Journal of immunological methods* 387:81-88.
- Nomi, T., M. Sho, T. Akahori, K. Hamada, A. Kubo, H. Kanehiro, S. Nakamura, K. Enomoto, H. Yagita, M. Azuma, and Y. Nakajima. 2007. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:2151-2157.
- Nunna, S., R. Reinhardt, S. Ragozin, and A. Jeltsch. 2014. Targeted methylation of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) promoter to silence its expression in ovarian cancer cells. *PloS one* 9:e87703.
- Nutsch, K.M., and C.S. Hsieh. 2012. T cell tolerance and immunity to commensal bacteria. *Current opinion in immunology* 24:385-391.
- Okita, R., Y. Yamaguchi, M. Ohara, K. Hironaka, M. Okawaki, I. Nagamine, T. Ikeda, A. Emi, J. Hihara, and M. Okada. 2009. Targeting of CD4+CD25high cells while preserving CD4+CD25low cells with low-dose chimeric anti-CD25 antibody in adoptive immunotherapy of cancer. *International journal of oncology* 34:563-572.
- Ozols, R.F., B.N. Bundy, B.E. Greer, J.M. Fowler, D. Clarke-Pearson, R.A. Burger, R.S. Mannel, K. DeGeest, E.M. Hartenbach, R. Baergen, and G. Gynecologic Oncology. 2003. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21:3194-3200.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* 12:252-264.
- Peggs, K.S., S.A. Quezada, C.A. Chambers, A.J. Korman, and J.P. Allison. 2009. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of experimental medicine* 206:1717-1725.

- Piconese, S., B. Valzasina, and M.P. Colombo. 2008. OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *The Journal of experimental medicine* 205:825-839.
- Pietzner, K., H. Woopen, R. Richter, T. Joens, E.I. Braicu, D. Dimitrova, H. Mellstedt, S. Darb-Esfahani, C. Denkert, H. Lindhofer, C. Fotopoulou, and J. Sehouli. 2013. Expression of epithelial cell adhesion molecule in paired tumor samples of patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 23:797-802.
- Polansky, J.K., L. Schreiber, C. Thelemann, L. Ludwig, M. Kruger, R. Baumgrass, S. Cording, S. Floess, A. Hamann, and J. Huehn. 2010. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *Journal of molecular medicine* 88:1029-1040.
- Roncador, G., P.J. Brown, L. Maestre, S. Hue, J.L. Martinez-Torrecuadrada, K.L. Ling, S. Pratap, C. Toms, B.C. Fox, V. Cerundolo, F. Powrie, and A.H. Banham. 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European journal of immunology* 35:1681-1691.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 212:28-50.
- Rosenthal, A., and I. Jacobs. 1998. Ovarian cancer screening. *Seminars in oncology* 25:315-325.
- Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 212:8-27.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 155:1151-1164.
- Salama, P., M. Phillips, F. Grieu, M. Morris, N. Zeps, D. Joseph, C. Platell, and B. Iacopetta. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:186-192.
- Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18538-18543.

- Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M.F. Bachmann, and P.S. Ohashi. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annual review of immunology* 17:829-874.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
- Shevach, E.M. 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature reviews. Immunology* 2:389-400.
- Shimizu, K., M. Nakata, Y. Hirami, T. Yukawa, A. Maeda, and K. Tanemoto. 2010. Tumor-infiltrating Foxp3⁺ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5:585-590.
- Schmetterer, K.G., A. Neunkirchner, and W.F. Pickl. 2012. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26:2253-2276.
- Singh, A.P., S. Senapati, M.P. Ponnusamy, M. Jain, S.M. Lele, J.S. Davis, S. Remmenga, and S.K. Batra. 2008. Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *The lancet oncology* 9:1076-1085.
- Spinosa, J.P., and D. Kanduc. 2014. Ovarian cancer: designing effective vaccines and specific diagnostic tools. *Immunotherapy* 6:35-41.
- Špišek, R., R. Horváth, J. Kayserová, and J. Bartůňková. 2010. Možnosti protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty. *Lékařské listy* 4:9-12.
- Špišek, R., P. Kocián, and D. Rožková. 2009. Imunitní systém a kontrola nádorového bujení: mechanismy zahájení imunitní odpovědi a role imunitního systému v obraně proti nádorům. *Postgraduální medicína* 10:186-195.
- Takahashi, K., T. Shibukawa, M. Moriyama, T. Shirai, S. Kijima, O. Iwanari, I. Matsunaga, and M. Kitao. 1986. Clinical usefulness and false-positive results of CA 125 as a tumor marker of ovarian cancer--a study on 674 patients. *The Japanese journal of surgery* 16:305-310.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192:303-310.
- Takenaka, M., N. Seki, U. Toh, S. Hattori, A. Kawahara, T. Yamaguchi, K. Koura, R. Takahashi, H. Otsuka, H. Takahashi, N. Iwakuma, S. Nakagawa, T. Fujii, T. Sasada, R. Yamaguchi, H. Yano, K. Shirouzu, and M. Kage. 2013. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Molecular and clinical oncology* 1:625-632.
- Tamm, I., Y. Wang, E. Sausville, D.A. Scudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf, and J.C. Reed. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis

- induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research* 58:5315-5320.
- Teng, M.W., S.F. Ngiow, B. von Scheidt, N. McLaughlin, T. Sparwasser, and M.J. Smyth. 2010. Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. *Cancer research* 70:7800-7809.
- Thornton, A.M., P.E. Korty, D.Q. Tran, E.A. Wohlfert, P.E. Murray, Y. Belkaid, and E.M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* 184:3433-3441.
- Toker, A., D. Engelbert, G. Garg, J.K. Polansky, S. Floess, T. Miyao, U. Baron, S. Duber, R. Geffers, P. Giehr, S. Schallenberg, K. Kretschmer, S. Olek, J. Walter, S. Weiss, S. Hori, A. Hamann, and J. Huehn. 2013. Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *Journal of immunology* 190:3180-3188.
- Tuefferd, M., J. Couturier, F. Penault-Llorca, A. Vincent-Salomon, P. Broet, J.P. Guastalla, D. Allouache, M. Combe, B. Weber, E. Pujade-Lauraine, and S. Camilleri-Broet. 2007. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PloS one* 2:e1138.
- Van Elssen, C.H., P.W. Frings, F.J. Bot, K.K. Van de Vijver, M.B. Huls, B. Meek, P. Hupperets, W.T. Germeraad, and G.M. Bos. 2010. Expression of aberrantly glycosylated Mucin-1 in ovarian cancer. *Histopathology* 57:597-606.
- Vang, K.B., J. Yang, S.A. Mahmud, M.A. Burchill, A.L. Vegoe, and M.A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *Journal of immunology* 181:3285-3290.
- Verhagen, J., and D.C. Wraith. 2010. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *Journal of immunology* 185:7129; author reply 7130.
- Vermeij, R., N. Leffers, B.N. Hoogeboom, I.L. Hamming, R. Wolf, A.K. Reyners, B.H. Molmans, H. Hollema, J. Bart, J.W. Drijfhout, J. Oostendorp, A.G. van der Zee, C.J. Melief, S.H. van der Burg, T. Daemen, and H.W. Nijman. 2012. Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 131:E670-680.
- Viguer, M., F. Lemaitre, O. Verola, M.S. Cho, G. Gorochoy, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky, and L. Ferradini. 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *Journal of immunology* 173:1444-1453.
- Visintin, I., Z. Feng, G. Longton, D.C. Ward, A.B. Alvero, Y. Lai, J. Tenthorey, A. Leiser, R. Flores-Saaib, H. Yu, M. Azori, T. Rutherford, P.E. Schwartz, and G.

- Mor. 2008. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:1065-1072.
- Walker, M.R., D.J. Kasprovicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, and S.F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *The Journal of clinical investigation* 112:1437-1443.
- Wang, E., S. Selleri, M. Sabatino, A. Monaco, Z. Pos, A. Worschech, D.F. Stroncek, and F.M. Marincola. 2008a. Spontaneous and treatment-induced cancer rejection in humans. *Expert opinion on biological therapy* 8:337-349.
- Wang, E.T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtukova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth, and C.B. Burge. 2008b. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470-476.
- Wang, L., J. Ma, F. Liu, Q. Yu, G. Chu, A.C. Perkins, and Y. Li. 2007. Expression of MUC1 in primary and metastatic human epithelial ovarian cancer and its therapeutic significance. *Gynecologic oncology* 105:695-702.
- Wang, Y., D. Wang, and M. Ren. 2014. Prognostic value of HER-2/neu expression in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35:33-38.
- Weiner, H.L. 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology today* 18:335-343.
- Wieczorek, G., A. Asemissen, F. Model, I. Turbachova, S. Floess, V. Liebenberg, U. Baron, D. Stauch, K. Kotsch, J. Pratschke, A. Hamann, C. Loddenkemper, H. Stein, H.D. Volk, U. Hoffmuller, A. Grutzkau, A. Mustea, J. Huehn, C. Scheibenbogen, and S. Olek. 2009. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer research* 69:599-608.
- Williams, T.I., K.L. Toups, D.A. Saggese, K.R. Kalli, W.A. Cliby, and D.C. Muddiman. 2007. Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers. *Journal of proteome research* 6:2936-2962.
- Winter, S.F., J.D. Minna, B.E. Johnson, T. Takahashi, A.F. Gazdar, and D.P. Carbone. 1992. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer research* 52:4168-4174.
- Wolf, A.M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9:606-612.
- Wolf, D., A.M. Wolf, H. Rumpold, H. Fiegl, A.G. Zeimet, E. Muller-Holzner, M. Deibl, G. Gastl, E. Gunsilius, and C. Marth. 2005. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:8326-8331.

- Woo, E.Y., C.S. Chu, T.J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S.C. Rubin, L.R. Kaiser, and C.H. June. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research* 61:4766-4772.
- Wrigley, E., A.T. McGown, J. Rennison, R. Swindell, D. Crowther, T. Starzynska, and P.L. Stern. 1995. 5T4 oncofetal antigen expression in ovarian carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 5:269-274.
- Yang, Z.Z. and S.M. Ansell. 2009. The Role of Treg Cells in the Cancer Immunological Response. *American Journal of Immunology* 5:17-28
- Yao, X., M. Ahmadzadeh, Y.C. Lu, D.J. Liewehr, M.E. Dudley, F. Liu, D.S. Schrumpp, S.M. Steinberg, S.A. Rosenberg, and P.F. Robbins. 2012. Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood* 119:5688-5696.
- Zhang, D., J. Gao, L. Zhu, Z. Hu, R. Hou, S. Liu, M. Tan, J. Liu, and B. Lin. 2013. Chemoresistance Is Associated with MUC1 and Lewis y Antigen Expression in Ovarian Epithelial Cancers. *International journal of molecular sciences* 14:11024-11033.
- Zou, W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature reviews. Cancer* 5:263-274.
- Zurawski, V.R., Jr., R.C. Knapp, N. Einhorn, P. Kenemans, R. Mortel, K. Ohmi, R.C. Bast, Jr., R.E. Ritts, Jr., and G. Malkasian. 1988. An initial analysis of preoperative serum CA 125 levels in patients with early stage ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology* 30:7-14.