

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

PROTINÁDOROVÁ IMUNITA A VÝZNAM
MOLEKULY CTLA-4 V REGULACI
AKTIVITY IS
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Tereza Veselá

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Veselá**
Osobní číslo: **C16214**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Protinádorová imunita a význam molekuly CTLA-4
v regulaci aktivity IS**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literaturou týkající se funkce a významu IS, regulačních molekul s důrazem na molekulu CTLA-4 (struktura, funkce, význam, výroba rekombinantních molekul CTLA-4, fyziologická funkce CTLA-4, využitelnost CTLA-4 při terapii nádorů), analytické a klinické metody umožňující studovat strukturu a roli tohoto proteinu v rámci IS.
2. Vypracujte literární rešerši o proteinu CTLA-4 v členění textu do kapitol dle doporučené osnovy. Jako zdroje informací použijte odborné články z hodnotných odborných časopisů českých i zahraničních (anglický jazyk).
3. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry, jak budou tyto nové informace o funkci a významu CTLA-4 v rámci protinádorové imunity a při terapii vybraných nádorových chorob.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

dle pokynů vedoucí BP

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

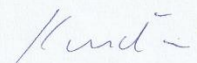
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré informace a literární prameny, které jsem ve své práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti, které vyplývají ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 7. 2019

Tereza Veselá

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady a pomoc, které mi poskytla při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala svým nejbližším za podporu a trpělivost při psaní mé bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje tématu molekuly CTLA-4 a její funkci v protinádorové imunitě. Byly prozkoumány různé informační prameny a literární zdroje, které se zabývaly studiem historie, strukturou a funkcí molekuly CTLA-4 a také současným využitím molekuly CTLA-4 při léčbě nádorových onemocnění. V literatuře jsou uváděny souvislosti molekuly CTLA-4 s autoimunitními onemocněními. Součástí práce jsou laboratorní metody, které byly použity k analýze molekuly CTLA-4.

KLÍČOVÁ SLOVA

molekula CTLA-4, imunitní systém, protinádorová imunita, T lymfocyty, ligand CD80, ligand CD86, Ipilimumab

TITLE

Antitumor Immunity And Role Of CTLA-4 in Regulation Of Immune System Activity

ANNOTATION

This thesis deals with the topic of CTLA-4 molecule and its function in antitumor immunity. Various sources of information and literature have been investigated to study the history, structure and function of the CTLA-4 molecule as well as the use of CTLA-4 in the treatment of cancer. In this work, the association of CTLA-4 molecule with autoimmune diseases is reported. The work contains also about the laboratory methods that were used to analyze CTLA-4 molecule.

KEYWORDS

CTLA-4 molecule, immune system, antitumor immunity, T lymphocytes, CD80 ligand, CD86 ligand, Ipilimumab

Obsah

Úvod.....	12
1 Transmembránový protein CTLA-4.....	14
1.1 Struktura a význam molekuly CTLA-4.....	14
1.2 Studium struktury CTLA-4.....	17
1.3 Mechanismus účinku molekuly CTLA-4.....	19
2 Popis metod používaných pro studium molekuly CTLA-4.....	21
2.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	21
2.2 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem.....	22
2.3 Molekulová vylučovací chromatografie.....	24
2.4 Nukleární magnetická rezonance.....	25
2.5 Průtoková cytometrie.....	26
3 Imunitní systém.....	27
3.1 Funkce a mechanismy imunitního systému.....	27
3.2 Buněčná složka adaptivních mechanismů imunitního systému.....	28
3.2.1 Subpopulace T lymfocytů.....	29
3.2.2 Receptory T lymfocytů.....	32
4 Funkce a význam CTLA-4 v terapii nádorového onemocnění.....	34
4.1 Protinádorová imunita.....	34
4.2 Nádorově specifické povrchové antigeny a obranné mechanismy nádorů.....	36
4.3 Molekula CTLA-4 a metastatický nebo neresekovatelný melanom.....	37
4.4 Význam molekuly CTLA-4 s nádorovým onemocněním glioblastom.....	38
5 Monoklonální protilátky proti CTLA-4.....	41
5.1 Ipilimumab.....	41
5.1.1 Klinické studie Ipilimumabu.....	42
5.1.2 Současné využití Ipilimumabu.....	43
5.1.3 Ipilimumab a časnější stádium melanomu.....	45
5.1.4 Ipilimumab v kombinaci s Nivolumameb.....	45
5.1.5 Nežádoucí účinky Ipilimumabu.....	46
6 Molekula CTLA-4 v souvislosti s jinými typy onemocněními.....	47
6.1 Autoimunitní onemocnění štítné žlázy.....	47
6.2 Revmatoidní artritida.....	49
6.3 Systémový lupus erythematoses.....	50
Závěr.....	53

Seznam literatury	54
Seznam obrázků.....	63
Seznam zkratk	64

Úvod

Na konci osmdesátých let minulého století se zjistilo, že naivní T buňky potřebují k aktivaci dva různé signály přes dva odlišné receptory. Stimulací receptorů pro antigen na T lymfocytech (TCR) T buněk s antigenními ligandy se buňky stávají anergními. Aktivaci a účinek T buněk způsobí druhý signál z B7 ligandu, který má dva transmembránové glykoproteiny CD80 a CD86, dříve označovány jako B7-1 a B7-2. Ligand B7 se nachází na antigen prezentující buňce (APC) na CD28 koreceptoru [1].

Roku 1987 ve Francii, vědci hledali molekuly cytotoxického povrchu buněk, izolovali cDNA z aktivovaných CD8⁺ T buněk. Vědci cDNA označili jako CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4). Genetické studie poskytly informace, jak souvisí struktura CTLA-4 s kostimulací T buněk. CTLA-4 s CD28 mapují stejné chromozomální sousedství a sdílejí spolu vysokou sekvenční podobnost. Účel antigenní struktury CTLA-4 byl až do poloviny 90. let neznámý [2,3].

Všechny tyto informace zaujaly Jeffereyho Ledbettera a Petera Linsleyho z Bristol-Myers Squibb výzkumného institutu v Seattlu ve Washingtonu. V té samé době se vědci věnovali výzkumu interakce CD28. Ke studiu interakcí vědci používali solubilní verze CD28, bez transmembránové a intracelulární domény. Solubilní protein CD28 měl stejný účinek jako vázaná forma na buňku na CD28. Skupina vědců objevila na radaru receptor CTLA-4, poté Linsley syntetizoval protein CTLA-4 [4].

V roce 1991 skupina vědců publikovala článek v časopise The Journal of Experiment Medicine, kde popisovala, že solubilní protein CTLA-4 váže ligandy CD80 a CD86 lépe než solubilní CD28. V té době to vypadalo, že CTLA-4 je třetí koreceptor v tom, co bylo považováno za systém se dvěma kostimulačními signály [5].

Jednou z interpretací bylo, že solubilní CTLA-4 by zvládl blokovat proliferaci. Blokace by byla provedena tak, že se zvýší interakce B7 s CD28. Protilátka CTLA-4 by mohla zvýšit proliferaci tím, že by blokovala negativní signál CTLA-4 [6].

Tato interpretace se zalíbila Jamesovi P. Allisonovi a jeho týmu z univerzity v Kalifornii. Svou práci pak publikoval v časopise The Journal of Experimental Medicine. Jeho tým studoval kombinaci mezi TCR, CD28 a CTLA-4 zesíťováním

těchto receptorů. Když se spojil TCR s CD28, a ne s CTLA-4, došlo k proliferaci T buněk. Proliferace T buněk byla snížena, když byly všechny tři receptory současně zesíťeny. To vše nasvědčuje faktu, že CTLA-4 inhibuje kostimulaci CD28 [7].

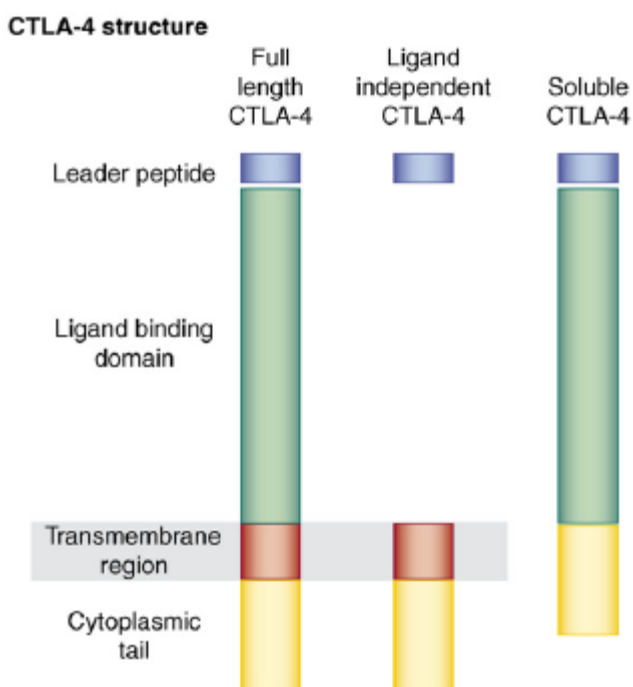
Další výzkumy molekuly CTLA-4 vedly k udělení Nobelovy ceny v roce 2018 Jamesovi P. Allisonovi z MZ Anderson Cancer Centra v USA a Tasuku Honjovi z Kyoto Univerzity v Japonsku za fyziologii a medicínu. Cena jim byla udělena za objev CTLA-4 a PD-1 proteinů nalezených na povrchu T buněk a v léčbě rakoviny inhibicí negativní imunitní regulace. Oba tyto proteiny pracují pomocí různých mechanismů a zvládnou provést podobné funkce. Od té doby je CTLA-4 uznávaným v moderní onkologii [8].

Dříve definována solubilní molekula CTLA-4 Linsleyem a Ledbetterem (1991) se dnes používá mimo jiné k léčbě Revmatoidní artritidy a dalších autoimunitních onemocnění. Konkrétně se CTLA-4 používá k vypnutí nebezpečných imunitních reakcí v imunitním systému (IS) [9].

1 Transmembránový protein CTLA-4

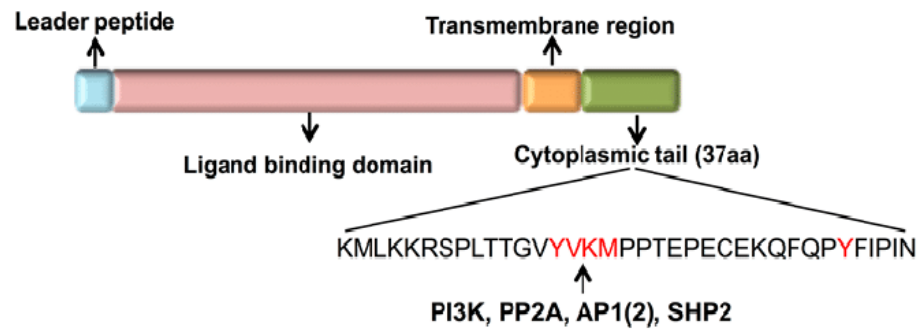
1.1 Struktura a význam molekuly CTLA-4

Molekula CTLA-4 patří mezi transmembránové proteiny prvního typu, které patří do nadřazené skupiny imunoglobulinových genů, které obsahují jednu extracelulární „V-podobnou“ doménu nebo doménu vázající ligand [2,10,11]. Molekula CTLA-4 je dále složena z 37 aminokyselin vedoucího proteinu, hydrofobní transmembránového segmentu a cytoplazmatické domény, která nese různé signální motivy (obr. č. 1, 2). Extracelulární doména se nachází v pozici 36-161 s délkou 126. Cytoplazmatická doména je v pozici 183-223 a má délku 41. Extracelulární „V- podobná“ doména vykazuje dvouvrstvou beta archu, která zahrnuje vlákna A'GFCC'C' předního archu a ABED zadního archu (obr. č. 3).



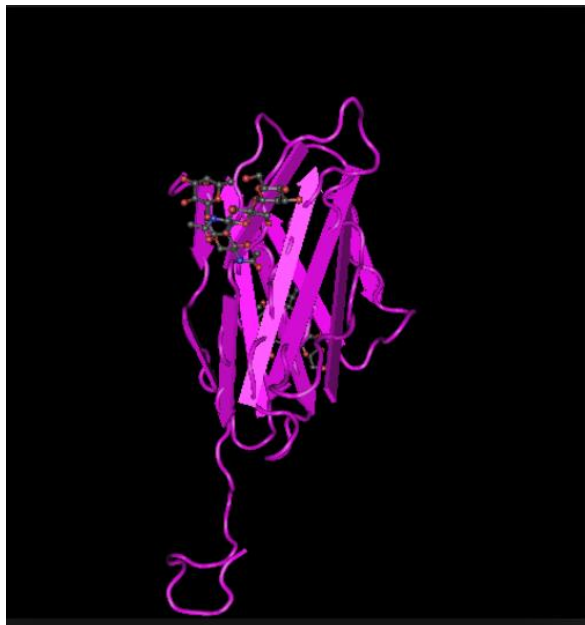
Obrázek č. 1: Sekvenční struktura CTLA-4, převzato a upraveno z [63]

A CTLA-4 structure



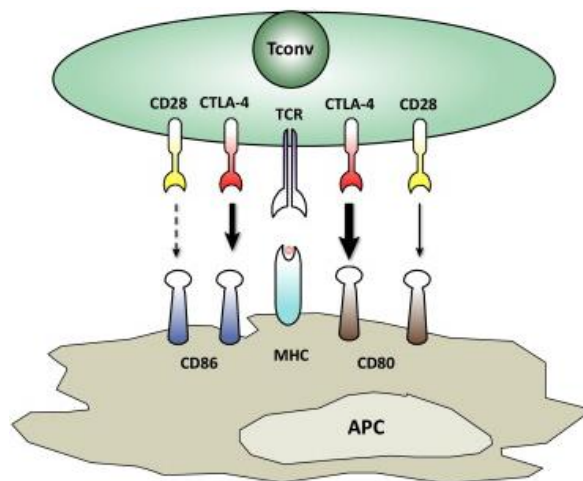
Obrázek č. 2: Struktura molekuly CTLA-4, převzato a upraveno z [16]

Molekula CTLA-4 existuje ve formě kovalentního homodimeru spojeného disulfidickým můstkem [11]. Disulfidická vazba vznikla mezi cysteiny v segmentech, které spojují extracelulární „V-podobnou“ doménu s transmembránovou doménu. Antigenní struktura CTLA-4 je glykoprotein, který je evolučně příbuzný s kostimulačním receptorem T buněk CD28. Sdílí spolu 30 % sekvenční homologie [12-15].



Obrázek č. 3: 3D struktura molekuly CTLA-4, převzato z [17]

Biochemické a strukturní údaje ukazují, že CTLA-4 s CD28 přes svoji sekvenční podobnost používají stereochemické rysy sdíleného prolinu (MYPPPY). Prolin se nachází ve smyčkách spojující F a G β řetězce, váží spolu stejné ligandy. Antigenní struktura CTLA-4 váže bivalentně ligandy CD80 a CD86 na povrchu buněk (obr. č. 4), ale po navázání ligandů nedochází ke konformační změně. Buňky, které mají na svém povrchu CD80 a CD86, prezentují antigen (Ag) a tím snižují proliferaci a aktivaci T buněk [11,15-17].



Obrázek č. 4: Vazba CTLA-4 a CD28 se sdílenými ligandy CD80 a CD86, převzato z [12]

Afinita neboli síla vazby CD28 s ligandy CD80 a CD86 je nižší než afinita CTLA-4 s ligandy CD80 a CD86. Molekula CTLA-4 funguje integrovaným způsobem. Avidita CTLA-4 je čtyřiceti až sto násobně vyšší než u CD28, proto se stává druhým receptorem pro B7. Třetí ligand pro CTLA-4 byl nedávno nalezen u myši, jehož vazba také podporuje kostimulaci T lymfocytů [12,13]. CTLA-4 molekula je syntetizována inducibilně, není exprimována na buněčném povrchu naivních T buněk konstitutivně [12].

Na molekule CTLA-4 dochází k posttranslačním modifikacím, např. N- glykosylaci, která je důležitá pro dimerizaci. Také fosforylace je dalším typem posttranslační modifikace. Fosforylace v tyrosinu v poloze 201 zabraňuje vázání na komplex AP-2 adaptéru, blokuje endocytózu a vede k retenci CTLA4 na buněčném povrchu [14,18].

Receptor CD28 má pět známých N-vázaných glykosylačních míst, zatímco CTLA-4 má dvě N-vázaná glykosylační místa na asparaginových zbytcích 78 a 111. Hlavním druhem asparaginového zbytku 78 je disialylovaný biantennární jádro- fukosylovaný N-oligosacharid a hlavním druhem asparaginového zbytku 111 je monosialylovaný biantennární jádro-fukosylovaný N-oligosacharid [12].

CTLA-4 je imunitní kontrolní receptor primárně působící jako antagonist k signalizaci CD28. CD28 zprostředkovává druhý aktivační signál T buňkám. V roce 1987 Brunet a spol. [2] pojmenoval produkt exprese genu CTLA-4, a podle CD klasifikace jej nazval gen CD152. Název CTLA-4 je synonymem pro gen CD152 a převažuje v dnešní literatuře. CD152 je především exprimován na CD4⁺ a CD8⁺ T buňkách, které jsou aktivované. Jeho typická lokalizace je v cytoplazmě a na povrch buněčné membrány je rychle exprimován po stimulaci T buňkami. Maximální hladiny syntetizované CTLA-4 molekuly jsou po 48 až 72 hodinách od aktivace [12,19].

1.2 Studium struktury CTLA-4

Pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byla stanovena relativní molekulová hmotnost. Pro CTLA-4 byla molekulová hmotnost za neredukujících podmínek 40 000 a pro CD80 byla 45 000. Původně byla očekávána molekulová hmotnost pro zesíťený dimer CTLA-4 okolo 27 716. Tato odchylka byla způsobena významnými hladinami glykosylace CTLA-4 [20].

Podrobněji pak byla analyzována molekulová hmotnost CTLA-4 pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI/MS). Tato hmotnostní spektrometrie objevila 10 píku, které vyplývají už z heterogenní glykosylace *in vivo*. ESI/MS stejně jako NMR objevila, že antigenní struktura CTLA-4 má dvě N-vázaná glykosylační místa na asparaginových zbytcích 78 a 111. Díky známým strukturám oligosacharidů na antigenní struktuře CTLA-4 bylo možné přiřadit většinu píku, které byly pozorovány pomocí ESI/MS. Další heterogenita vyplynula z N-terminální aminokyseliny. N-koncový alanin chybí na obou koncích CTLA-4 řetězcích. Tento fakt byl pozorován na nejčtetnějších signálech v ESI/MS. Avšak další řada píku,

poukázala na to, že menší část CTLA-4 má jeden z N-koncových alaninových zbytků. Tato metoda však nedokáže rozlišit heterogenitu glykosylace, jak molekulové, tak náboje [20].

Molekulová hmotnost antigenní struktury CTLA-4 byla studována molekulovou vylučovací chromatografií. Relativní molekulová hmotnost CTLA-4 byla 73 800, tato hodnota téměř odpovídá hodnotě pro dimer. Molekulová hmotnost byla stanovena pomocí retenčního času. Pro srovnání bylo použito několik standardů proteinů o určité molekulové hmotnosti. Retenční čas této chromatografie je závislý na tvaru molekuly, a proto byl ovlivněn obsahem sacharidů [20].

Další metodou pro stanovení molekulové hmotnosti je sedimentační rovnovážná ultracentrifugace. O této metodě se ví ale málo, protože jsou problémy s měřením dílčích specifických objemů. Stanovit dílčí specifické objemy pyknometricky nebylo možné, protože bylo málo vzorků. Proto se použila metoda H₂O/D₂O. Tato metoda je založena na rozdílných hustotách H₂O a D₂O, proto je rozdíl ve vztlakových molekulových hmotnostech velký a poskytuje přesně stanovené dílčí specifické objemy 0,716 ml/g pro CTLA-4 a 0,711 ml/g pro CD80. Tyto dílčí objemy pomohly k výpočtu relativních molekulových hmotností pro CTLA-4 45 200 a pro CD80 61 000 [21].

Shire [22] jako první popisoval stanovení molekulové hmotnosti glykoproteinu, když neznal jeho dílčí specifický objem. Dílčí specifický objem polypeptidového řetězce byl vypočítán pomocí aminokyselinového složení. Stanovení pomocí ESI/MS ukázalo 23 %, což je o 4 % menší hodnota než u sedimentační rovnovážné ultracentrifugace. Tento rozdíl byl způsoben pozorováním malého množství agregace pro CTLA-4 [20,22].

Nukleární magnetickou rezonancí (NMR) byla studována struktura monomerní solubilní molekuly CTLA-4. Metoda pomohla určit a pochopit strukturu molekuly, která souvisí s variabilními doménami supperrodiny imunoglobulinů. Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, NMR odhalila dvě N-vázaná glykosylační místa na asparaginových zbytcích 78 a 111. Oba tyto zbytky vykazují různé stupně interakcí s CTLA-4, oba jsou ale důležité pro strukturu a stabilitu pro variabilní domény molekuly CTLA-4 [11,20].

1.3 Mechanismus účinku molekuly CTLA-4

Antigenní struktura CTLA-4 na povrchu T buněk primárně reguluje amplitudu v počátečních stádiích aktivace T buněk. Naivní T lymfocyty exprimují CTLA-4, která soutěží s molekulou CD28 o stejné ligandy, CD80 a CD86. CTLA-4 pak s nimi interaguje na povrchu antigen prezentující buňky, které podporují inhibiční kostimulačních signálních cest T buněk. Následně pak snižují reakce a aktivace T buněk. Bylo prokázáno, že ve dříve aktivovaných lidských T lymfocytech dojde k zesílení CTLA-4, zesílení indukuje apoptózu, která je možná po vazbě na ligand se odliší od CD80 a CD86 [12,23].

Prostřednictvím několika mechanismů poskytuje CTLA-4 imunitní inhibiční účinky. Pokud je přítomna na pomocných T lymfocytech CD4⁺, zvýší se signalizace CTLA-4, což vede ke snížení aktivity pomocných T buněk a následné imunosupresi. Expresice, interakce a signalizace CTLA-4 v regulačních T lymfocytech zvyšuje jejich funkci a tím zvyšuje i imunosupresivní funkci regulačních T lymfocytů (T_{reg}) [12,22]. Nedávné studie dokázaly, že interakce, které jsou zprostředkované cytoplazmatickou doménou CTLA-4 ovlivňují T_{reg} buňky. Další studie ale prokázaly, že extracelulární doména CTLA-4 stačí k vyvolání suprese. Hlavní buněčný typ, který exprimuje antigenní strukturu CTLA-4 jsou T_{reg}. Molekula CTLA-4 aktivuje dráhu, která vede k inhibici v konvenčních T buňkách [13].

Zajímavostí je, že až 90 % CTLA-4 nacházíme intracelulárně, zbylých 10 % vázaných na membráně na povrchu imunokompetentních buněk. Pravděpodobně je CTLA-4 efektivně přenášen na místo interakce mezi T buňkami a APC na povrch buněk, ale rychle zpětně endocytuje z plazmatické membrány do tzv. klathrinových váčků [12].

Ke snížení proliferace T lymfocytů a produkci interleukinu 2 (IL-2) vede zesílení molekul CTLA-4 na povrchu buněk. Na imunitní reakci hostitele má zvýšená exprese CTLA-4 inhibiční účinek. Molekula CTLA-4 je klíčovým bodem při kontrole samovolně reaktivních T buněk [24-27]. Ukázalo se, že CTLA-4 je důležitý pro prevenci rozvoje autoimunitního onemocnění u citlivých osob [28,29].

Transendocytóza

Mechanismus, který je závislý na buňkách, se nazývá transendocytóza. Transendocytóza je také závislá na ligandu CD28. Kritéria lze snadno dosáhnout díky tomu, že transendocytóza CTLA-4 má schopnost potlačit kostimulaci APC nutnou pro aktivaci T buněk. Důležité je, aby funkce CTLA-4 ovlivňovala CD28 a aby měla vliv na jeho ligandy. Příkladem může být molekula CTLA-4, která spouští produkci indolamindioxygenázy (IDO). U myši s fenokopy CTLA-4 vyřazením IDO-1 a IDO-2 přišli na to, že aktivita IDO nebyla zodpovědná za aktivitu CTLA-4 *in vivo*. Fenokopy jsou variací ve fenotypu, které jsou způsobeny enviromentálními podmínkami (během vývoje organismu), tak že fenotyp organismu se u jedinců z různého prostředí liší. Nejedná se o typ mutace, není dědičný. Z experimentu vyplývá, že zbytky IDO jsou součástí imunitní regulační cesty, která je důležitá [12]. Obrázek č. 5 znázorňuje expresi CD86 na dendritických buňkách odvozených od lidských monocytů kultivovaných v nepřítomnosti T buněk. Dendritické buňky byly kultivovány po dobu 72 hodin s anti-CD3-aktivovanými CD4⁺ a CD25⁻ T buňkami, obarvenými anti-CD86 a anti-CTLA-4. Kvantifikace exprese povrchového CD80 a CD86 na povrchu dendritických buněk po kokultivaci s T buňkami v přítomnosti nebo nepřítomnosti anti-CTLA-4 stanovené průtokovou cytometrií.



Obrázek č. 5. Transendocytóza CTLA-4 s CD86, převzato a upraveno z [30]

2 Popis metod používaných pro studium molekuly CTLA-4

Jak bylo uvedeno v předchozí podkapitole pro studium struktury a funkce molekuly CTLA-4, vědci používají velké množství laboratorních metod, z nichž každá poskytuje dílčí konkrétní parametry a údaje o molekule CTLA-4. Vzhledem k vysokému počtu těchto metod se v následující kapitole budu věnovat pouze některým z nich.

2.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza je separační laboratorní metoda založena na rozdělení proteinů. Bílkoviny se dělí na základě rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli, pohyblivost je odlišná díky povrchovému náboji. Pohyb částic závisí na velikosti molekuly a jejího náboje. Vše probíhá, když je přítomen dobrý nosič, který by měl mít co nejmenší absorpční vlastnosti a musí být hydrofilní a pufr. Dnes se využívá agaróza, což je polymer disacharidu agarobiózy s nízkou endosmózou, dále se používá polyakrylamidový gel. V tomto případě byla použita agaróza [31,32].

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je jednou z nejčastěji využívaných metod. Polyakrylamidový gel má homogenní složení a je hydrofilní. Stejně jako každý nosič má malé absorpční a mechanické vlastnosti a nízkou elektroosmózu. Lze připravit i gel s gradientem hustoty, a to dle stupně zesílení a polymerace monomerních a dimerních molekul [33,34].

Aby tento druh elektroforézy byl co nejpřesnější, musí být dobře zvoleny podmínky pro stanovení, a to zejména pH. Látky, které nemají žádný elektrický náboj a jsou v izoelektrickém stavu, se v elektrickém poli nepohybují. Naopak látky, které nesou elektrický náboj, se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Gel, který má menší nebo větší póry, se zapojuje do separačního procesu [31-33].

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu umožňuje určit molekulovou hmotnost, přítomnost SS vazeb a ve spojení s izoelektrickou fokusací (2D elektroforéza) lze stanovit izoelektrický bod [31,32].

Výchozí biologický materiál, který se používá k analýze CTLA-4, je plná krev. Volný CTLA-4 (plazma) je stanoven v séru nebo v plazmě, k identifikaci vázané formy CTLA-4 nebo cytoplazmové formy se používají imunokompetentní buňky. Membránově vázaný CTLA-4 se prokazuje až po dezintegraci membrány [31-33].

2.2 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

Hmotnostní spektrometrie je analytickou metodou, která umožňuje převést anorganické či organické molekuly na ionty. Rozdělení iontů probíhá na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému zaznamenání relativních intenzit jednotlivých iontů. MS využívá ke svému měření velmi malé množství vzorku a je metodou univerzální, selektivní a citlivou. Nevýhodou MS je vysoká pořizovací cena a provozní náklady, a navíc je metodou destruktivní. MS patří mezi spektrální techniky, protože využívá podobnou techniku a má formální podobnost se zaznamenáním dat (hmotnostní spektra) jako spektrální techniky. Tato metoda má široké využití jak v kvalitativní (určení strukturálních informací a molekulové hmotnosti), tak v kvantitativní analýze (její odpověď je závislá na koncentraci) [34-36].

Základní zařízení, které využívá MS, je hmotnostní spektrometr. Hmotnostní spektrometr je iontově-optický přístroj, který detekuje a separuje ionty podle m/z . Hmotnostní spektrometr má několik základních částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor iontů. Další části spektrometru jsou systém pro zavádění vzorku do přístroje, vakuový systém, iontová optika a počítač [35,36].

Iontový zdroj pomocí ionizace převádí neutrální molekuly stanovovaného analytu na ionty (nabité částice). Hmotnostní analyzátor dělí nabité částice v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru m/z . Detektor je část hmotnostního spektrometru, která detekuje ionty dle jejich rozdělení podle m/z a určuje četnost

neboli intenzitu jednotlivých iontů. Systém pro zavádění vzorku do přístroje se používá přímý nebo z jiného přístroje. Iontová optika hmotnostního spektrometru slouží k urychlení a fokusaci iontů a počítač, který ovládá a doladuje přístroj, ukládá a vyhodnocuje naměřené hodnoty. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum, což je graf, který vyjadřuje závislost intenzity signálů iontů (relativní či absolutní) na jejich poměru m/z [35,36].

Ionizaci (tvorbu iontů) ve hmotnostním spektrometru má na starost iontový zdroj. Pro správné převedení molekul na ionty se používají různé ionizační techniky, protože neexistuje jedna univerzální technika pro všechny typy látek či molekul. Tyto techniky jsou ovlivňovány mnoha faktory jsou to např. tepelná stabilita, těkavost, záporné ionty, prostorové uspořádání biomolekul, výzkum nekovalentních interakcí nebo molekulová hmotnost. Ionizační techniky se dělí na lehké a těžké, ionizace dle povahy vyšetřovaného analytu či dle separační techniky nebo ionizace za sníženého tlaku nebo za atmosférického tlaku. Lehké ionizační techniky jsou takové, kdy ionizovaná molekula získá malé množství vnitřní energie a ve hmotnostních spektrech se dá pozorovat malé množství fragmentovaných iontů a (de)protonované molekuly. Do tohoto typu metod patří ionizace elektrosprejem nebo ionizace laserem za účasti matrice [34-36].

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem využívá snížený atmosférický tlak a používá se především při spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Ionizace vzorku se provádí v kapalném prostředí (směs vody a pufru a směs vody a organické kyseliny), po ionizaci vzorku vznikají ionty, které mají sudý počet elektronů [34-36].

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem má své klady i zápory. Mezi výhody patří, že ESI/MS je šetrná ionizační technika, je možné ji použít i k analýze vysokomolekulárních látek nebo k analýze nekovalentně vázaných komplexů biomolekul. ESI/MS má jednoduché propojení s kapalinovou chromatografií a ionizace probíhá přímo v roztoku, takže je možné detekovat anionty i kationty iontových sloučenin. Nevýhodou ESI/MS je, že se dá využít na ionizaci pouze určitých typů látek, především se jedná o látky dusíkaté povahy nebo kyseliny a je náročná na čistotu vzorku. Také ESI/MS má složitější interpretaci spekter

a dochází při ní ke vzniku mnohonásobně nabitých iontů, otázkou zůstává, jestli tento fakt lze brát jako nevýhodu nebo výhodu [34].

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem je technika, která umožňuje studovat primární sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci a přítomnost posttranslačních modifikací spolu s jejich lokalizací. K analýze CTLA-4 lze použít tělní tekutiny nebo CTLA-4 uvolněný z buněk dezintegrací. Vzhledem k jeho molekulové hmotnosti musí být molekula CTLA-4 před vlastní ionizací naštěpena na menší peptidy [34,35].

2.3 Molekulová vylučovací chromatografie

Molekulová vylučovací chromatografie patří do vícestupňových separačních metod. Látky jsou rozděleny mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze je tvořena kapalinou nebo plynem. Stacionární fázi je kapalina nanesená na gel nebo pevná látka [37].

Molekulová vylučovací chromatografie rozděluje jednotlivé molekuly dle fyzikálně-chemických vlastností molekul, dle velikosti a tvaru, tzv. molekulově síťový efekt. Tato technika se používá v separačním tak i v analytickém uspořádání. Podle použitého typu mobilní fáze dělíme chromatografii na gelovou filtraci, která využívá vodnou mobilní fázi a byla využita ke studiu struktury CTLA-4, a gelovou permeační chromatografii, zde je mobilní fází organické rozpouštědlo. Stacionární fázi v této chromatografii tvoří nerozpustný inertní gel, ten ve své struktuře má póry, které jsou vyplněné kapalinou. Gel v tomto případě byl hydrofilní (agarázový) [38].

Vzorek se nanáší na chromatografickou kolonu, která je naplněna separačním gelem. Aby se mohly molekuly rozdělit podle tvaru a velikosti, musí docházet k opakovanému vyměňování molekul mezi rozpouštědlem v nepohyblivé fázi a rozpouštědlem v mobilní fázi. Malé molekuly pronikají do všech pórů gelu a jejich pohyb je zpomalován oproti velkým molekulám. Velké molekuly nepronikají přes póry, migrují kolonou mezi částicemi a jsou eluovány vylučovacím objemem

a mobilní fáze je unáší dál. Molekuly CTLA-4 se rozdělují podle velikosti mezi vylučovacím objemem a celkovým permeačním objemem [37,38].

Pro studium struktury molekuly CTLA-4 byla použita nízkotlaká kolona (skleněná). Chromatografická kolona byla uvedena do rovnováhy s fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem a byla prováděna při průtoku 0,5 ml/min ve stejném pufru. Na jeden konec kolony je připevněna dávkovací smyčka nebo průtokový adaptér, obě tato zařízení slouží k nástřiku vzorku do kolony. Na druhém konci se nachází detektor [37].

Tento typ techniky se používá ke stanovení molekulové hmotnosti molekuly CTLA-4, případně se používá k odsolování nabohacených frakcí CTLA-4 v průběhu izolace [38].

2.4 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance je analytická metoda, která se používá ke stanovení molekulární struktury např. molekuly CTLA-4 při fyziologických podmínkách. NMR dokáže zkoumat interakce mezi sekundárními a terciálními biopolymery [39].

Principem NMR je, že jádra mají spin a jsou elektricky nabitá. Pokud je použito vnější magnetické pole, dochází k přenosu energie mezi základní a vyšší energetickou hladinou. Přenos energie probíhá na vlnové délce, když se spin vrátí na svůj základní stupeň, dochází k eliminaci energie na stejné frekvenci. Signál je pak měřen a zpracováván, aby mohlo být získáno NMR spektrum jádra [39,40].

Nukleární magnetická rezonance využívá spektrometry jejichž magnetické pole je tvořeno supravodivými cívkami s tisíci závitů. Do kapalného helia se ponoří cívka a protéká ní proud o velikosti 100 A, magnetické pole má intenzitu 4-18 T [40].

NMR může určit strukturu molekuly CTLA-4 pomocí teplotních závislostí (výměny jader s rozpouštědlem), vlivu rozpouštědla a pH nebo pomocí pohyblivosti částí molekuly a vzájemné vzdálenosti atomů (studium relaxačních procesů) [39,40].

2.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která pomáhá identifikovat a kvantifikovat povrchové struktury i intracelulární molekuly v buňce. Průtoková cytometrie patří mezi molekulárně biologické metody. Jedná se o univerzální metodu, která je závislá na typu monoklonální protilátky (mAb). Nosná kapalina se používá k převádění buněk do suspenze buněk. Suspenze se smíchá s monoklonální protilátkou značenou fluorochromem. V tomto případě byla jako mAb použita anti-CD152 PE. Je možné vyšetřovat několik různých antigenů najednou v jedné buňce při použití různých mAb a fluorochromů [31,41,42].

Měření probíhá při průchodu laserovým paprskem o určité vlnové délce. Principem průtokové cytometrie je detekce fluorescenčního signálu. Do průtokového cytometru se pokládá suspenze buněk, které jsou označené. Tryska vstřikuje suspenzi, tím dochází k vytvoření tenkého proudu suspenze, ve kterém se buňky pohybují za sebou. Laserový paprsek prochází skrz tenký proud suspenze a vytváří lom a rozptyl světla. Dle úhlu a směru lomu světla se rozptyl světla dělí na boční a přímý rozptyl. Boční rozptyl má úhel 90° , úhel přímého rozptylu je malý okolo $2-13^\circ$ a je úměrný velikosti buňky. Fluorescenční (excitované) světlo je vyzářeno, mají-li na sobě molekuly navázané fluorochromy, které mají stejné absorpční spektrum, ale emisní spektrum je jiné [41,42].

Světelným zdrojem u průtokových cytometrů je argonový laser, jehož vlnová délka je 488 nm. Průtokové cytometry jsou složeny z fluidního, optického a elektrického systému. Každý systém má jinou funkci [31,41].

Mnohorozměrný graf je výsledkem cytometrického měření. V grafu jsou zaznamenány intenzity každého sledovaného znaku. Jednotlivé molekuly se dělí do skupin podle intenzity jednotlivých znaků, to vše je uzpůsobeno statistickou analýzou. Populace a jejich zastoupení ve vzorku se určují pomocí skupin [41].

3 Imunitní systém

3.1 Funkce a mechanismy imunitního systému

Imunitní systém byl zkoumán jako obranný mechanismus proti mikroorganismům, které jsou patogenní v rámci mikrobiologie. Až později byl oddělen od mikrobiologie, protože bylo dokázáno, že funguje jako strážce jednotlivých biologických druhů a jedinců. Poté se rozvinul jako samostatný vědní obor imunologie [43].

Imunitní systém je regulační mechanismus lidského organismu. Zabezpečuje celistvost homeostázy [31]. Základní funkcí imunitního systému je rozpoznávat cizí od vlastního, tzn. buňky a molekuly organismu vlastních od cizorodých látek jako jsou viry, bakterie, neživé částice nebo plísňe [31,44]. Cizorodé látky jsou rozpoznány jako škodlivé a jsou zlikvidovány, vlastní struktury nejsou poškozovány, tzn. že jsou tolerovány [31,32]. Výše zmíněné funkce se projevují jako autotolerance, obranyschopnost a imunitní dohled. Autotoleranci můžeme vysvětlit jako schopnost IS rozeznat vlastní tkáň organismu a být vůči nim tolerantní. Obranyschopnost je vlastnost, kterou IS rozpozná vnější škodlivé látky. Také dokáže chránit organismus proti patogenům a popřípadě i proti jejich toxickým látkám. Imunitní odpověď nastává v případě, když se v organismu objeví škodlivé látky, poškozené, staré, odumřelé či změněné buňky nebo molekuly, které průběžně odstraňuje [13,31,44].

Další vlastností imunitního systému je učení a paměť. Paměť pomáhá zapamatovat si antigen, s kterým už někdy přišel do kontaktu, a při dalším setkání na něj IS reaguje rychlejší a intenzivnější reakcí [31,43]. Antigen je látka bílkovinné povahy, dále může být glykoproteinem, lipidem, lipoproteinem či polysacharidem. IS ho rozpozná jako cizí a reaguje na něj [13,31]. Antigeny jsou děleny na exoantigeny, tzn. antigeny z vnějšího prostředí, a autoantigeny, tzn. antigeny, které nejsou cizorodými, protože pocházejí z vlastního organismu. Autoantigen způsobuje autoimunitní onemocnění [13,43,44]. Imunitní receptory dokážou rozeznat epitop nebo také antigenní determinantu. Tato malá molekula pak vyvolá imunitní odpověď [13].

Funkce IS je zajišťována pomocí antigenně specifických a nespecifických mechanismů. Antigenně specifickým mechanismům se také říká adaptivní. Nespecifické mechanismy IS jsou známy spíše pod pojmem vrozené nebo přirozené. Do obou mechanismů patří humorální a buněčné složky [13,31].

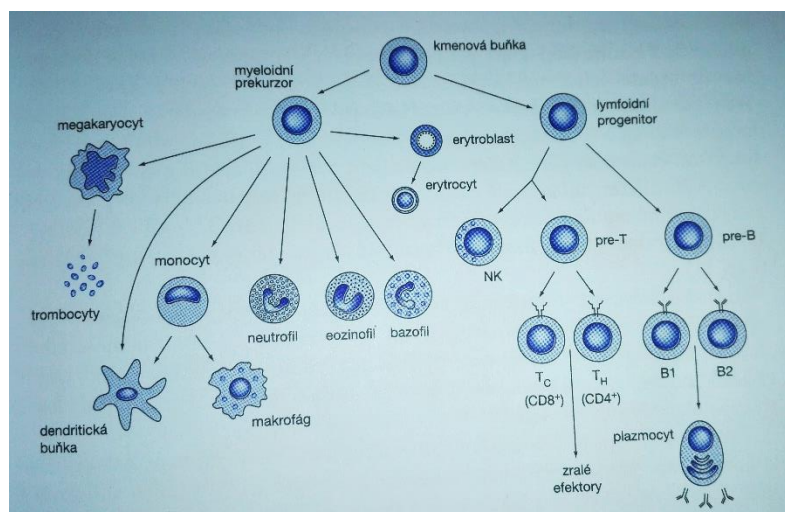
Adaptivní mechanismy jsou antigenně specifické a evolučně mladší mechanismy než vrozené mechanismy. Imunitní odpověď může být zajištěna buněčnými (T a B lymfocyty s povrchovými specifickými receptory) nebo humorálními složkami IS (např. protilátkami). Tyto mechanismy se aktivují až po kontaktu s antigenem, pro jejich iniciaci je důležité, aby došlo nejprve ke spuštění vrozené imunitní odpovědi. Imunitní reakce adaptivních mechanismů se rozvíjí pár dnů až několik týdnů. Během těchto reakcí dochází ke vzniku imunologické paměti [13].

Vrozené mechanismy nalézáme u všech mnohobuněčných organismů. Jsou evolučně starší a založeny na buňkách a molekulách. Tyto látky jsou v organismu předem připraveny a dokážou zaútočit na různé patogeny. Látky reagují na patogeny pomocí reakce na strukturní a funkční rysy, které mají společné. Do buněčných mechanismů patří polymorfonukleáry, dendritické buňky, monocyty, makrofágy a také NK buňky neboli natural killers. Humorální část obsahuje interferony, složky komplementu, lektiny a bílkoviny akutní fáze. Na rozdíl od imunitní reakce adaptivních mechanismů trvá imunitní reakce přirozených mechanismů několik minut [13,31].

3.2 Buněčná složka adaptivních mechanismů imunitního systému

Do této skupiny patří T lymfocyty, které jsou součástí bílých krvinek. Vznikají v kostní dřeni z pluripotentní kmenové buňky, která je výchozí buňkou pro všechny buňky, které vznikají v kostní dřeni (obr. č. 6). T a B lymfocyty se diferencují z lymfoidní linie, dále pak z přirozené lymfoidní buňky. Kostní dřev spolu s thymem, ve kterém dozrávají T lymfocyty, náleží k primárním lymfatickým orgánům. Zdá se, že mimo brzlík dozrávají některé subpopulace T lymfocytů [13,31]. Dozrávání

T lymfocytů je ovlivněno cytokiny a thymickými hormony. Cytokiny kontrolují prekurzorové buňky v jednotlivých stádiích vývoje T lymfocytů [44].



Obrázek č. 6: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky, převzato z [13]

T lymfocyty hrají důležitou roli v ochraně organismu proti infekcím, zejména však proti nádorovým buňkám a virům. Také jsou zodpovědné za odmítnutí transplantátu. Netvoří protilátky, ale ve chvíli, kdy dojde k jejich setkání s antigenem se začínají dělit a diferencovat v efektorové buňky. Tyto buňky se účastní odpovědi imunitního systému [44]. Část T lymfocytů se po aktivaci antigenem diferencuje na paměťové buňky. Jejich hlavní funkcí je imunologická paměť [13].

Shrnutí funkcí T lymfocytů je následující. Je to především aktivace makrofágů, aktivace B lymfocytů, potlačení specifické odpovědi T a B lymfocytů, buněčná cytotoxicita a aktivované T lymfocyty exprimující molekulu CTLA-4 [44].

3.2.1 Subpopulace T lymfocytů

První subpopulací jsou pomocné T lymfocyty, které mají na svém povrchu receptory CD3 a CD4. Označují se T_h , písmeno h pochází z anglického slova „helper“. Díky receptoru CD4 jsou jejich funkce pomocné a regulační. Tvoří 75 % všech T lymfocytů a zasahují téměř do všech imunitních funkcí tím, že je ovlivňují či usměrňují [31,43,44].

Antigen je rozpoznán lymfocyty $CD4^+$. $CD4^+$ jim ukazuje buňku, která prezentuje antigen, a molekuly, které jsou součástí histokompatibilního komplexu (HLA) II. třídy. Pro tyto molekuly je receptor $CD4$, který je pod vlivem nespecifických a specifických složek imunity a jejich produktů. Po setkání s antigenem dochází k jejich diferenciaci do různých podtypů, které mají různé funkce, jsou to T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} . Každá funkční podskupina tvoří jiný druh cytokinů (interleukinů). Cytokiny jsou secernované peptidové mediátory, které nedokážou rozeznat specifický antigen. Tento antigen dokáže vyvolat jejich produkci, nereagují s ním, ale jsou velice důležité pro další imunitní reakce a jejich průběh [31,44].

Významnou subpopulací jsou T_{reg} neboli regulační T lymfocyty. Jak už vyplývá z jejich názvu, jedná se o regulační buňky. Aktivita ostatních efektorových buněk je inhibována právě těmito buňkami, potlačující aktivitu APC [13,31,43]. Imunosupresivní funkce T_{reg} je zvyšována zvýšenou expresí CTLA-4 na povrchu buněk [12,23]. Interakce CTLA-4 s $CD80$ má na tyto buňky vliv, konkrétně tlumí jejich proliferaci nebo aktivaci. T_{reg} exprimují CTLA-4 ve zvýšené míře.

Tvorba T lymfocytů probíhá v kostní dřeni, poté vycestovávají do thymu, kde probíhá další fáze diferenciaci a proliferace. Tyto procesy jsou závislé na přítomnosti IL-2. Nezralé formy T lymfocytů, jež nesou „autoreaktivní“ TCR, ale současně nenapadají buňky těla vlastní mají schopnost kontrolovat vznik autoimunitní reakce [13,31]. Produkují tlumivé cytokiny (IL-10, IL-35, transformující růstový faktor β (TGF- β)), pracují na mechanismu přímého kontaktu s cílovou. Povrchový protein T_{reg} CTLA-4 je zde důležitý, protože buňky T_{reg} brání CTLA-4 v přístupu ke kostimulačním signálům. Interakce CTLA-4 s ligandy $CD80$ a $CD86$ vede ke snižování T_{reg} na povrchu APC. V dendritických buňkách (bb.) dokáže tato interakce spustit signální dráhu, která vede k expresi indolamindioxygenázy [13].

Periferní regulační T lymfocyty (iT_{reg}) vznikají v periferních tkáních při specifických reakcích. Do subpopulace iT_{reg} patří T_{h3} [13]. T_{h3} produkují TGF- β . Jsou důležité pro slizniční IS [31,43].

Po prvním setkání s antigenem vznikají paměťové T lymfocyty T_m (m ze slova „memory“). Po dalším kontaktu s antigenem reagují rychleji a efektivněji díky tomu, že jsou po určitou dobu v cirkulaci. Paměťové lymfocyty nesou znak $CD45RO$ [13,31,43].

Cytotoxické T lymfocyty jsou poslední subpopulací T lymfocytů, nesou fenotyp CD3 a CD8⁺. Jedná se o efektorové buňky, které rozpoznají antigen na povrchu buněk, které reagují na kombinaci antigenu s molekulou HLA I. třídy. Jejich hlavní funkcí je rozpoznání buněk, které jsou napadené virem nebo intracelulárními parazity, a jejich zničení. Zničeny jsou pomocí kontaktu mezi T_c (cytotoxické T lymfocyty) a buňkou, která je napadena, nebo pomocí extracelulárně uvolněných toxinů. V tomto případě je obrana radikální a riskantní, protože T_c buňky dokážou poškodit tkáň více, než ji poškodil samotný vir. HLA antigeny jsou rozpoznány asi 5–10 % T_c buněk, současně dokážou zničit cizí tkáň a jsou hlavní příčinou odmítnutí transplantátu [13,43,44].

Imunitní odpověď je zahájena na povrchu APC, ta musí mít adhezivní molekuly a kostimulační signály (CD80 a CD86). V tomto případě je APC makrofág nebo dendritická buňka. Vznik zralých cytotoxických buněk nastává po prvním kontaktu s antigenem. Když T_{h1} produkují IL-2, který je důležitý pro proliferaci T_c, krevním oběhem k tkáním, ke kterým jsou posílány efektorové T lymfocyty, které působí pomocí 3 mechanismů [13,43]. Cytotoxický lymfocyt je poté prostřednictvím specifických receptorů aktivován, a to přímým kontaktem s např. virem infikovanou buňkou.

První způsob působení efektorových T lymfocytů potřebuje určité množství T_c buněk, ty pak používají k usmrcení lymfotoxin (TBF-β), který indukuje apoptózu. Tento cytokin je vylučován i T_{h1} lymfocyty [43].

Druhým způsobem je FAS ligand protein, který se objevuje u T lymfocytů na jejich povrchu. Ten se naváže na CD95 (FAS). Signály, které vedou přes receptor FAS, způsobí apoptózu cílové buňky. K apoptóze dojde během několika minut [13,43].

Posledním způsobem jsou cytotoxická granula, která se nachází v cytoplazmě zralých T buněk, obsahují v sobě perforin a granzymy (proteázy). Po rozpoznání antigenu cytotoxická granula putují k plazmatické membráně a dochází k degranulaci. Kaspázy vznikají štěpením proteáz v cytoplazmě, působí na další cytoplazmatické proteiny a způsobují apoptózu cílové buňky [13].

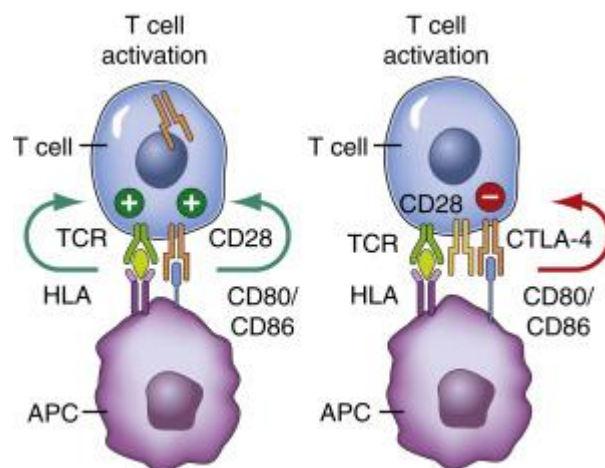
3.2.2 Receptory T lymfocytů

Výše zmíněné funkce T lymfocytů mají na starosti 3 různé subpopulace T lymfocytů. Specifická funkce jednotlivých subpopulací je dána už v době, kdy se vyvíjejí v thymu a spočívá v expresi membránových receptorů [44]. Díky receptorům nebo také jindy nazývaným membránovým znakům je můžeme dělit do podskupin. Tyto membránové znaky jsou označovány jako TCR neboli T receptory. TCR rozpoznají ve většině případů jen komplexy MHC proteinů s peptidovými fragmenty antigenů [13,31]. Jednotlivé receptory u každého klonu T lymfocytů se liší jednotlivými strukturami svých vazebných míst pro antigen. Můžeme nalézt tisíce zcela identických kopií těchto receptorů na povrchu každého T lymfocytu [13].

CD jsou také membránové znaky. CD3 molekula je v TCR receptoru, je to asociovaný komplex několika proteinů a je důležitá pro přenos signálu. CD3 komplex obsahuje řetězce (γ , δ , ϵ , ζ), které jsou transmembránové proteiny a mají intracelulární části. Tyto části jsou fosforylovány proteintyrosinkinázami skupiny Src [13].

TCR receptor také obsahuje modul, který rozeznává antigen. Část TCR, která dokáže navázat antigen, se svou strukturou podobá imunoglobulinům. Tato část je složena z α a β transmembránových řetězců. U T lymfocytů, které jsou menší, jsou to řetězce γ a δ . Tyto řetězce mají N-terminální části, které jsou variabilní, a dokážou rozpoznat antigen a vytvořit pro něj vazebné místo. T lymfocyty také obsahují nevariabilní proteinové CD-koreceptory, se kterými TCR spolupracují při rozpoznání antigenu. Rozlišujeme CD4 a CD8 koreceptory a jsou odlišné pro T_h , T_c buňky [13,30,43]. CD4 váží komplexy, které obsahují MHC glykoproteiny druhé třídy, CD8 mají MHC glykoproteiny první třídy [13].

Antigen prezentující buňka má na svém povrchu antigen (komplex MHC glykoprotein), který je rozeznán T lymfocyty. APC je aktivována T lymfocylem pomocí adhezivních molekul a poté dochází ke kontaktu mezi TCR a antigenem. CD28 neboli receptor kostimulačního signálu je důležitý pro T lymfocyt, aby dostal dostatečný aktivační signál, který pak vede k buněčnému dělení. CD28 rozeznává kostimulační molekuly CD80 a CD86 na povrchu APC, což je zmíněno v předchozí kapitole. CTLA-4 váže stejné ligandy jako CD28 akorát s větší afinitou (obr. č. 7) [13].



Obrázek č. 7: Vazba ligandů CD80 a CD86 na CD28 a CTLA-4, převzato a upraveno z [12]

4 Funkce a význam CTLA-4 v terapii nádorového onemocnění

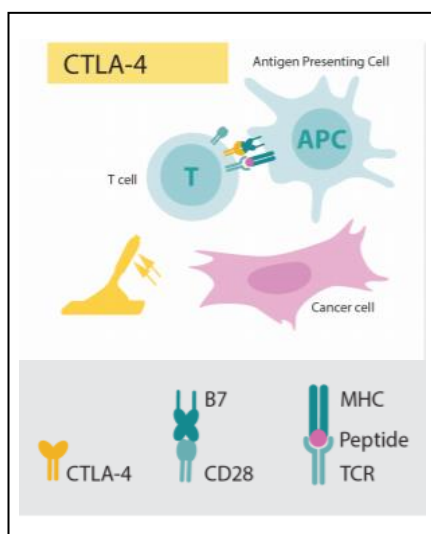
4.1 Protinádorová imunita

Selhávání mechanismů regulace buněčného dělení a regulace sociálního chování buněk jsou způsoby, které vedou ke vzniku maligních malformací. Při těchto způsobech dochází k mutacím v onkogenech a anti-onkogenech. Onkogeny a anti-onkogeny kódují např. proteinkinázy, proteiny, které regulují buněčnou apoptózu a adhezivitu nebo transkripční faktory. To vše geny dělají jen v případě, pokud jsou nemutagenní. Pokud jsou onkogeny a anti-onkogeny mutagenní, mají abnormálně konstitutivně sníženou nebo zvýšenou aktivitu. Jestliže jde o abnormálně konstitutivně sníženou aktivitu, v tom případě mluvíme o produktech anti-onkogenů, jedná-li se naopak o abnormálně konstitutivně zvýšenou aktivitu, jde o produkty onkogenů. Tyto aktivity vedou k úniku z tkání, k disimilaci do jiných orgánů, agresivnímu růstu v těchto orgánech nebo ke vzniku nekontrolovatelného dělení [13].

Maligní nádorové bb. se mohou podobat (ale nemusí) buňkám, ze kterých vznikly. IS by měl tyto nádorové buňky rozpoznat a eliminovat. IS je ale nerozpozná, protože rozdíly jsou od normálních buněk příliš malé nebo nádorové bb. využívají mechanismy, které dokážou zničit některé mechanismy IS [13,45].

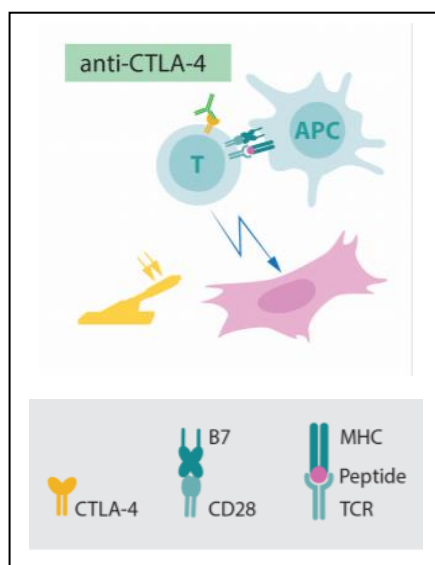
Molekula CTLA-4 v protinádorové imunitě

Základní vlastností IS je tzv. autotolerance. T lymfocyty jsou hlavními buňkami, které se do autotolerance IS zapojují. Aby mohlo dojít k aktivaci T lymfocytů, musí se receptor, který je na povrchu T buňky, navázat na cizorodou strukturu (obr. č. 8). Pro aktivaci T buněk je také důležitý protein, který funguje jako urychlovač. Molekula CTLA-4 funguje jako „brzda“ na T buňkách a brání funkci akceleratoru [8].



Obrázek č. 8: CTLA-4 jako brzda aktivace T buněk, převzato a upraveno z [8]

Kolem roku 1990 J. P. Allison v laboratoři na univerzitě v Kalifornii, studoval molekulu CTLA-4. Byl jeden z prvních, který zjistil, že molekula CTLA-4 funguje jako „brzda“ T buněk. Jak již bylo výše zmíněno, v rané fázi aktivace T lymfocytů při jejich aktivaci APC (přednostně v lymfatických uzlinách) se jako negativní regulátor imunity uplatňuje molekula CTLA-4. Tento mechanismus je v protinádorové imunitě nevýhodný a nádorové buňky ho umí využít. J. P. Allison studoval, zda by blokáce CTLA-4 mohla uvolnit „brzdu“ T buněk a stimulovat IS, aby napadal rakovinotvorné buňky. Pokusil se blokovat negativní účinky indukované CTLA-4, čímž došlo k uvolnění imunitní reakce. První experiment byl proveden v roce 1994 u myši, kterým byly transplantovány nádory. Myši byly vyléčeny protilátkami, které inhibovaly „brzdu“ a odemkly protinádorovou aktivitu T buněk (obr. č. 9). Tyto protilátky jsou imunomodulační monoklonální protilátky, které blokují kontrolní bod imunitní reakce CTLA-4. Tento způsob dokáže lépe stimulovat protinádorovou imunitní reakci. Tyto protilátky jsou dnes označovány jako inhibitory imunitního kontrolního bodu. V roce 2010 klinická studie přinesla pozitivní výsledky u pacientů s pokročilým melanomem. U některých pacientů došlo k úplnému vymizení rakovinných buněk [8].



Obr. č. 9: Blokáda CTLA-4 a aktivace T buněk s následným zničením nádorových buněk, převzato a upraveno z [8]

4.2 Nádorově specifické povrchové antigeny a obranné mechanismy nádorů

Nádory mají na svém povrchu antigeny, kterými se liší od normálních buněk. Tyto antigeny dokážou vyvolat humorální i buněčnou odpověď IS [45].

IS reaguje s nádorovými buňkami díky nádorově specifickým povrchovým antigenům, které IS rozpoznává. Dělí se do dvou skupin: antigeny asociované s nádory (TAA) a antigeny asociované pro nádory (TSA) [13,45].

TAA nemají specifitu pro nádorové buňky, protože se objevují i na normálních bb., které se nacházejí v konkrétním stupni diferenciaci. Liší se ve kvantitě exprese nebo v místní či abnormálně časové expresi. V periferní krvi se dají stanovit (detekovat) solubilní formy těchto genů. Detekce slouží jako pomocná diagnostika markerů. Mezi antigeny asociované s nádory patří onkofentální antigeny (karcinoembrionální antigen, α -fetoprotein), antigen HER2/neu, diferenciální antigeny

leukemických bb. (CALLA), prostatický specifický antigen a některé melanomové antigeny. TSA jsou antigeny specifické pro nádory. Do této skupiny patří bílkoviny, které se nenachází na normálních buňkách, jsou to např. abnormální formy glykoproteinů, komplexy MHC gp s fragmenty proteinů onkogenních virů, komplexy MHC gp I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů a idiotypy lymfomů a myelomů [13].

Nádorové buňky se brání imunitnímu systému různými mechanismy. Způsoby jsou většinou analogické spolu s únikovými způsoby patogenních organismů. Tvorbou tolerogenního a imunosupresivního prostředí dochází k aktivaci tolerančních mechanismů nádorových buněk. Je známo velké množství tolerančních mechanismů. IS nerozpozná nádorové antigeny, protože mohou mít nízkou hustotu. Některé nádory jsou chráněny T_{reg} buňkami, ty je brání před autoimunitními mechanismy stejně, jako brání zdravé tkáni. Nádory se také mohou bránit nedostatečnou produkcí molekul, které jsou uvolněny z poškozených buněk (DAMPs), tyto mechanismy vedou k neaktivování dendritických buněk. Nejdůležitějším mechanismem, kterým se nádory vyhýbají detekci, je aberantní signalizace imunitního kontrolního bodu. Posledním mechanismem zmíněným v této bakalářské práci je ten, že nádorové buňky nemají funkci APC. Nádorovým buňkám na jejich povrchu chybí kostimulační molekuly CD80 a CD86, proto nedochází k rozpoznání nádorových antigenů pomocí prekurzorů T_c a T_h lymfocytů, u kterých dochází k utlumení [13,45].

4.3 Molekula CTLA-4 a metastatický nebo neresekovatelný melanom

Metastatický melanom je onkologické onemocnění, které postihuje lidi ve věku od 15 do 34 let života. Metastatický melanom kůže byl až do nedávna označován jako onemocnění s fatálním koncem s minimální možností léčby. Pacienti s touto onkologickou diagnózou měli krátkou dobu přežití, konkrétně osm až deset měsíců s velmi špatnou prognózou [46,47].

Metastatický melanom je z pohledu genetiky komplexní onemocnění, které má velice široké spektrum mutací signálních drah. Kombinací různých mutací různých genů dochází k maligním transformacím, většinou se jedná o germinální mutace CDKN2A genu, melanokortin-1receptoru. Mutace mohou být ale i tumor supresorických genů PTEN, CCDN1, nebo mutace somatické protoonkogenů NRAS, KIT [47].

S rozvojem imunoterapie, která blokuje imunitní kontrolní body a biologické léčby došlo v roce 2011 k významným změnám v léčbě melanomu. Kontrolní imunitní body aktivují nebo negativně regulují T lymfocyty. Molekulu CTLA-4 exprimují T lymfocyty a snižuje aktivitu T lymfocytů. Zablokováním CTLA-4 dochází k aktivaci a proliferaci T buněk a zvýší se protinádorová imunitní odpověď. Molekula CTLA-4 se dá zablokovat monoklonálními protilátkami Ipilimumabem nebo Tremelimumabem [47,48].

4.4 Význam molekuly CTLA-4 s nádorovým onemocněním glioblastom

70 % zhoubných primárních nádorů mozku u dospělých způsobují difúzní gliomy. Glioblastom (GBM) patří stále mezi nejběžnější smrtelný podtyp gliomů. Navzdory agresivnímu přístupu multimodality, který je založen na chirurgické resekci, radioterapii a Temozolomidu, méně než 10 % nově diagnostikovaných pacientů přežívá 5 let. Antiangiogenní terapie, intenzifikace chemoterapie, cílení na dysregulované buněčné signalizace drah nedokázaly v náhodných klinických studiích zlepšit přežití pacientů [49].

V poslední době se rakovinná imunoterapie, která využívá vlastní koncepci posilování nádorově specifické adaptivní imunity, ukázala jako základní kámen moderní onkologie. Imunitní kontrolní body jsou stimulační a inhibiční dráhy, které fyziologicky optimalizují imunitní reakce, snaží se zmírnit škodlivé účinky imunitní reakce na normální tkáň a udržují autotoleranci. Za posledních pár let monoklonální

protilátky naprogramované proti PD1 nebo PD-L1 a CTLA-4 změnilly léčebné postupy zhoubných nádorů [50].

Hlavní překážkou v imunoterapii nádoru mozku je místo, kde se nádor nachází, protože centrální nervový systém (CNS) byl až do nedávna považován za tzv. imunoprivilegovaný orgán. významné místo imunity. Teorie, omezeného kontaktu mozkové tkáně s imunitním systémem blokovanou krevně mozkovou bariéru, byla nedávno vyvrácena. V durálních sinusech byly objeveny funkční lymfatické cévy, které jsou za možnost IS tkáň CNS kontrolovat a v případě nutnosti zasáhnout. Tyto cévy umožňují odtok antigenů mimo mozek a splavování leukocytů mezi cerebospinální tekutinou a hlubokými cervikálními lymfatickými uzlinami [51,52]

Další překážkou imunoterapie tohoto onemocnění jsou významné imunosupresivní mechanismy, které jsou vykazovány maligními gliomy [51,52].

Nejvíce popisovány v souvislosti s gliomem jsou dvě molekuly imunitního kontrolního bodu, PD1 a CTLA-4. U 24 pacientů s GBM, kteří byli léčeni DC vakcinací na Kalifornské univerzitě v Los Angeles, dynamická exprese molekuly CTLA-4 v T buňkách v periferní krvi a změny ve frakci T_{reg} měly významný vztah s výsledky terapie pacientů. Downregulace CTLA-4 na $CD4^+$ a $CD8^+$ T buňkách byla silně spojena s delším přežíváním a každý jednotlivý vzestup poměru T_{reg} buněk byl asociován se zvýšeným rizikem úmrtí. Fecci a kol. [54] pozorovali snížený absolutní počet $CD4^+$ T buněk v periferní krvi u pacientů s GBM ve srovnání se zdravými pacienty, ale frakce $T_{reg} CD4^+$ byla u pacientů s GBM 2,63× vyšší než u zdravých pacientů. Odstraněním T_{reg} a upregulací produkce dvou T pomocných cytokinů se vrací rozdíly v citlivosti pozorované mezi $CD4^+$ T buňkami izolovanými od pacientů a dobrovolníků [53,54].

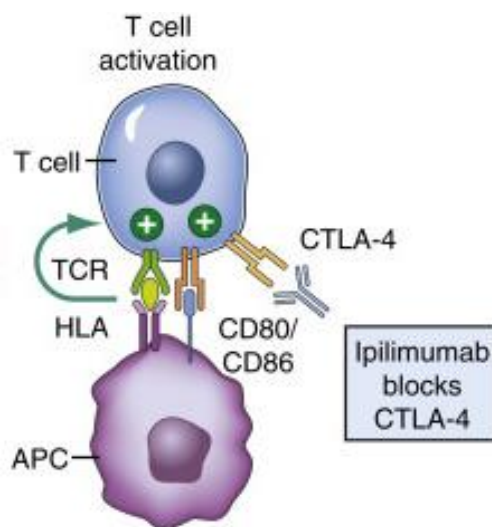
Modulace drah kontrolního bodu byla zkoumána mj. i u myších modelů ortotopického gliomu, který vykazoval významné a dlouhodobé remise. U slabě imunogenních myší s gliomem poskytla systémová CTLA-4 blokáda dlouhodobé přežití asi u 80 % léčených myší bez indukce experimentální alergické encefalomyelitidy. Inhibice CTLA-4 zvrátila defekty $CD4^+$ vyvolané nádory a obnovila normální počet $CD4^+$ T buněk a proliferační kapacitu. Během toho inhibice CTLA-4 indukovala rezistenci na T_{reg} , aniž by přímo ovlivňovala jejich supresivní funkci. Souběžné cílení více kontrolních bodů může být vhodnou imunoterapií pro

GBM. Současná blokáda tří klíčových drah imunitního kontrolního bodu (CTLA-4, PD1, IDO), které jsou zapojeny do imunosuprese GBM, vyvolala 100% přežití. Po trojitě terapii byla v mikroprostředí gliomu zjištěna redukce nádorových hladin T_{reg} [55].

5 Monoklonální protilátka proti CTLA-4

5.1 Ipilimumab

Anti-CTLA-4 protilátka je humánní monoklonální protilátka třídy IgG1, která působí proti molekule CTLA-4 nazvána Ipilimumab. Jako první lék v celé historii onkologických onemocnění dokázal statisticky významně prodloužit život pacientům s metastatickým melanomem. Na molekulu CTLA-4 se Ipilimumab váže selektivně (obr. č. 10). Molekula CTLA-4 má funkci zpomalovat až úplně zastavit imunitní reakci organismu. Jak už bylo v předchozí podkapitole zmíněno, zablokováním molekuly CTLA-4 dojde ke spuštění protinádorové odpovědi IS. Následně dochází k silnější a podstatně delší aktivaci T buněk a v nejlepším případě může dojít i k napadení a poté i destrukci nádorové buňky [56].



Obr. č. 10: Vazba Ipilimumabu na molekulu CTLA-4, převzato a upraveno z [12]

Vědci pozorovali rozšířenou regresi transplantabilních tumorů v preklinických výzkumech na zvířecích modelech při blokaci molekuly CTLA-4. Regrese transplantabilních tumorů vedla k tomu, že inhibice molekuly CTLA-4 se zařadila mezi možné léčebné postupy při terapii onkologických onemocnění. Ipilimumab dokáže působit na imunitní odpověď organismu jako celku na rozdíl od cílené léčby, která ovlivňuje konkrétní strukturu nádorové buňky [57].

5.1.1 Klinické studie Ipilimumabu

Na základě mezinárodní klinické studie fáze III byl lék Ipilimumab poprvé registrován. Výsledky této studie byly poprvé zveřejněny v časopise *New England Journal of Medicine* v srpnu roku 2010. Tato studie byla multicentrická, randomizovaná a dvojitě zaslepená MDX010-20. Studie se zúčastnilo 676 pacientů, kteří trpěli metastatickým melanomem a u kterých selhal minimálně jeden terapeutický systém léčby. Pacienti byli rozděleni do tří skupin v poměru 3:1:1. První skupina pacientů měla předepsáno dostávat 3 mg/kg Ipilimumabu spolu s gp100 vakcínou. Druhá skupina testovaných pacientů dostávala Ipilimumab v monoterapii a poslední skupina nemocných měla předepsáno pouze vakcínu gp100. U pacientů v prvních dvou skupinách bylo pozorováno přežití 10,1 měsíců a v kontrolní skupině pouze 6,4 měsíců. Po jednom roce trvání studie bylo ve skupině, která byla léčena Ipilimumabem v monoterapii, 46 % nemocných a v kontrolní skupině s vakcínou žilo 25 % nemocných. Po dvou letech studie byl poměr mezi skupinou léčenou Ipilimumabem v monoterapii a kontrolní skupinou 24 % ku 14 % nemocných [57].

Léčba Ipilimumabem v kombinaci s vakcínou gp100 měla výsledky horší než monoterapie Ipilimumabu, jinak k žádným větším rozdílům nedošlo. Dnes se ale spíše preferuje léčba Ipilimumabem v monoterapii. Reindukční léčba byla poskytnuta pacientům, u kterých došlo po 12 týdnech od ukončení léčby Ipilimumabem ke stabilnímu onemocnění nebo částečné či kompletní regresi, a nakonec až k progresi onemocnění. 31 pacientů se zúčastnilo reindukční léčby a u 21 z nich se objevila léčebná odpověď. Dnes už se k reindukční léčbě ale nepřistupuje [56,57].

Ipilimumab byl podáván v první linii léčby při studii CA 184-024. Pacienti, kteří trpěli metastazujícím melanomem nebo neresekovatelným melanomem ve třetím stádiu, byli randomizovaně rozděleni do dvou skupin. První skupina pacientů byla léčena Ipilimumabem a Dakarbazinem a druhá skupina dostávala placebo a Dakarbazin. První skupina testovaných pacientů dostávala dávku 10 mg/kg Ipilimumabu ve čtyřech infuzích s třítydenními intervaly. Následně byl u těchto pacientů udržován režim po dobu 12 týdnů od progresu onemocnění. Obě skupiny pacientů dostávali také Dakarbazin v dávce 850 mg/kg v osmi cyklech v intervalu tří týdnů. Vědce z této studie zajímalo primární přežití pacientů. Pacienti, kteří byli

lčeni Ipilimumabem i Dakarbazinem měli dobu přežití 11,2 měsíce, zatímco skupina pacientů, která byla léčena pouze Dakarbazinem měla dobu přežití 9,1 měsíce. Po roce léčby Ipilimumabem bylo ve skupině 47,3 % pacientů oproti druhé skupině, ve které bylo 36,3 % pacientů. Po dvou letech trvání léčby byl poměr 28,5 %:17,9 % a po třech letech byl poměr 20,8 %:12,2 % [57].

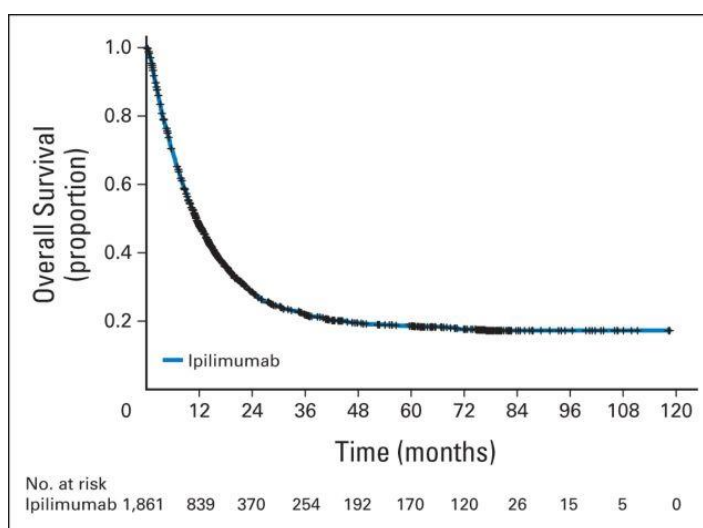
5.1.2 Současné využití Ipilimumabu

V dnešní době se onkologicky nemocným pacientům nabízí dvě terapeutické možnosti, a to cílená terapie nebo imunoterapie. Do dnešního dne ale není přesně stanoveno, který terapeutický postup je ten nejlepší. Při podávání Ipilimumabu jsou léčebné odpovědi asi 15 %. Na rozdíl od chemoterapie nebo cílené léčby jsou výsledky imunoterapie pomalejší. Imunoterapie funguje tak, že narušuje nádorové buňky, aniž by však výrazně narušila okolní tkáň, které přiléhají k nádoru. Asi u 20 % pacientů dochází během léčby k dlouhodobé stabilizaci onemocnění [56,59].

Imunoterapie byla použita jako druhá možnost u pacientů, kteří měli pokročilé stádium generalizovaného onemocnění a už někdy prodělali chemoterapii. Vědci z různých studií se domnívají, že by imunoterapie měla být použita i u pacientů, kteří se nachází ve stádiu minimální reziduální nemoci (např. po chirurgickém výkonu). Kdyby se pacienti nacházeli v tomto stádiu, mohli by dostat všechny čtyři dávky Ipilimumabu. Souvztažnost mezi podávaným počtem dávek Ipilimumabu a celkovým přežitím nemocných ukázala velmi pozitivní výsledky. Pacienti, kteří dostali čtyři dávky Ipilimumabu po 3 mg/kg, měli dobu přežití třináct měsíců. Ale těm, kterým byl aplikován Ipilimumab po 3 mg/kg po méně než čtyřech dávkách, byla doba přežití dva měsíce. Cílená léčba na rozdíl od imunoterapie má vysoké procento léčebných odpovědí, které se objevují velmi brzy po zahájení léčby. Tyto léčebné odpovědi jsou nacházeny i u pacientů, kteří se nachází v pokročilém stádiu, a nárůst nádorů je veliký. Cílená léčba má však své nevýhody, protože u pacientů se objevují rezistence k terapii mezi 6-12 měsícem od jejího zahájení. Kombinace obou možností terapií by mohla mít maximální úspěch. Když by imunoterapie byla dána před cílenou léčbu, mohla by zlepšit celkové přežití pacientů a účinek cílené léčby by mohl stimulovat odpověď IS. Toto jsou pouze spekulace, které jsou předmětem studií [59].

Ipilimumab v dávce 3 mg/kg po čtyřech dávkách v intervalu trvajícím tři týdny, se v současnosti používá k léčbě neresektovaných a metastazujících melanomů. Evropská agentura EMA v listopadu roku 2013 schválila Ipilimumab pro použití v první linii. V České republice je dávkování povoleno pouze předléčeným pacientům ve třech dermatoonkologických centrech a v komplexních onkologických centrech, která se nacházejí v režimu inovativních léčivých přípravků [58].

Ipilimumab má dlouhou dobu trvání léčebných odpovědí. Data o 1861 pacientech, kteří se zúčastnili retrospektivních a prospektivních studií, dal dohromady prof. Schandendorf a jeho tým [60]. Cílem prof. Schandendorfa bylo upřesnit výsledky o dlouhodobém přežívání pacientů, kteří byli léčeni Ipilimumabem. Spolu se svým týmem prof. Schandendorf analyzoval data 2985 pacientů, u kterých léčba Ipilimumabem probíhala ve specifickém léčebném programu. Ze všech zúčastněných pak prof. Schandendorf vytvořil statistiku. Tato statistika ukázala, že v první skupině pacientů byla celková doba přežití 11,4 měsíce po třech letech bylo naživu 22 % pacientů Celková doba přežití u všech 4866 pacientů byla 9,5 měsíce, z toho 21 % pacientů bylo naživu další tři roky (obr. č. 11). Tato analýza má i svou nevýhodu, tou bylo že získaná data byla ze studií fáze II a III. Profesor Schandendorf a jeho tým přišel se závěrem, že léčebná odpověď na Ipilimumab se pohybuje mezi 10-15 %, ale při správném určení léčby je celková doba přežití okolo 17-25 % po dobu 3-10 let [60].



Obrázek č. 11: Grafické znázornění léčby Ipilimumbem, převzato z [60]

5.1.3 Ipilimumab a časnější stádium melanomu

Nápad posunout léčbu z metastatického stádia do časnějších stádií melanomu se objevil před pár lety. Tato myšlenka využívá nižší stádia onemocnění, když ještě není IS narušen chemoterapií a jeho potenciál je podstatně vyšší. EORTC 18071 je placebem kontrolovaná studie fáze III, která měla veliký význam. Tato studie zahrnovala 950 pacientů, kteří se nacházeli ve třetím stádiu a byli léčeni Ipilimumabem nebo infúzí s placebem. Pacienti dostávali 10 mg/kg Ipilimumabu ve čtyřech infúzích v třítydenních cyklech během tří let. Ve skupině pacientů, která byla léčena Ipilimumabem, byl návrat nemoci objeven u 234 testovaných, ale skupina léčena pouze infuzemi placebo byl zaznamenán u 294 lidí. Poměr pacientů bez recidivy onemocnění po třech letech trvání studie byl 34,8 % ku 46,5 %, prospěch byl zaznamenán u skupiny, která byla léčena Ipilimumabem. Pozitivní výsledky byly vidět i u pacientů s makrometastázemi i mikrometastázemi v lymfatických uzlinách. V tuto chvíli probíhá ve světě další studie Ipilimumabu v adjuvantním režimu, která sleduje efekt terapie Ipilimumabu, který je podáván ve dvou odlišných koncentracích ve srovnání s vysokými dávkami interferon α (INF α -2b). Efekt léčby je sledován v období bez příznaků u pacientů se stádiem onemocnění IIIB, IIIC, IV, kteří prodělali chirurgické odstranění nádorových buněk [56,61].

5.1.4 Ipilimumab v kombinaci s Nivolumabem

Checkmate 143 byl první klinickou studií blokády PD-1 v souvislosti s maligním gliomem. Tato studie byla navržena jako vícebarevná studie fáze I. Studie hodnotila bezpečnost, imunologické účinky a snášenlivost Nivolumabu (mAb anti- PD-1) v monoterapii nebo v kombinaci s Ipilimumabem. Dávkování bylo provedeno ve dvou různých režimech u pacientů s rekurentní formou GBM (kohorty 1, 1b) a u skupiny pacientů s neléčeným nebo nově diagnostikovaným GBM, kteří byli léčeni radioterapií s Temozolidem nebo bez něj (kohorty 1c, 1d). Dvacet pacientů v kohortě 1 bylo náhodným způsobem přidáno k léčbě Nivolumabem 3 mg/kg každé dva týdny nebo k léčbě Nivolumabem 1 mg/kg a Ipilimumabem 3 mg/kg [NIVO1 + IPI3] každé tři týdny dostávali čtyři dávky, následovaných Nivolumabem 3 mg/kg. U použití monoterapie Nivolumabem nebyly zaznamenány nežádoucí účinky.

Ve skupině NIVO1 + IPI3 bylo 9 pacientů. V této skupině byly nejčastějšími nežádoucími účinky zvýšená hladina alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotrasferázy (AST), kolitida, průjem, únava a zvýšená hladina lipázy. Celkově byla léčba Nivolumabem jako samostatným činidlem lépe snášena než léčba Nivolumabu s Ipilimumabem, i když obě léčby měly srovnatelné účinky. U třech pacientů, kteří dosáhli částečné odpovědi, a u osmi pacientů se stabilním onemocněním, byly pozorovány signály protinádorové aktivity [62].

U kohort 1c a 1d bylo prokázáno, že léčba Nivolumabem v kombinaci s radioterapií s Temozolomidem nebo bez něj je nebezpečná [62].

5.1.5 Nežádoucí účinky Ipilimumabu

Jako každý lék i Ipilimumab má své nežádoucí účinky. Molekula CTLA-4 ovlivňuje protinádorovou imunitní odpověď a brání vzniku autoimunitních reakcí. Z toho logicky vyplývá, že lék Ipilimumab svojí blokací molekuly CTLA-4 dokáže ovlivnit vznik autoimunitních chorob. Nežádoucí účinky 3. a 4. stupně se objevily ve studii MDX010-20 až u 15 % nemocných. Kolitidy s průjmy, gastrointestinální toxicity včetně autoimunitní hepatitidy nebo vzácně se objevující střevní perforace patří mezi nejčastější nežádoucí účinky. U gastrointestinálních toxicit se systémově podávají kortikoidy v dávce 1-2 mg/kg, závisí však na závažnosti toxicity [56].

Asi u 6 % nemocných lékaři zaznamenali autoimunitně podmíněné endokrinopatie (hypofyzitida nebo tyreotitida). Tyto endokrinopatie mají většinou nespecifické příznaky (únava, bolest hlavy, nauzea až zvracení nebo dezorientace). Endokrinopatie způsobují ireverzibilní neboli nevratné změny, proto se léčí substitučními léky podávanými celý život [56].

Aby mohlo být dosaženo co možná nejmenšího procenta vzniku nežádoucích účinků, musí dojít k jejich včasnému záchytu a být určen specifický léčebný postup. Toto vše může fungovat pouze v případě, že pacienti si budou vše pečlivě zaznamenávat do svých patientských deníků. Léčba kortikoidy ani substitučními léky neovlivňuje účinek protinádorové imunity [56].

6 Molekula CTLA-4 v souvislosti s jinými typy onemocněními

6.1 Autoimunitní onemocnění štítné žlázy

90 % všech onemocnění štítné žlázy tvoří autoimunitní onemocnění štítné žlázy (AITD), včetně Graves-Basedowovy (GD) choroby nebo Hashimotovy tyreoidity (HT), obě patří mezi nejčastější AITD. GD a HT mají podobnou patogenezi a patologické znaky: symetrická hyperplazie štítné žlázy, infiltrace lymfocytů štítné žlázy, dědičnost, variabilní počet protilátek štítné žlázy detekovaných v séru pacienta. Obě onemocnění mají rozdílnou patologii, klinické projevy i výsledky [63].

AITD souvisí s humorálními i buněčnými imunitními odpověďmi. Jedná se o komplexní orgánově specifické onemocnění, které má spoustu rizikových faktorů a postihuje až 5 % světové populace. Do rizikových faktorů patří faktory prostředí, faktory genetiky nebo poruchy autoimunitní regulace. Na AITD má také vliv genetické pozadí, ozáření, kouření, infekce, stres (duševní i infekční). Některé autoprotiátky a autoprotiátky štítné žlázy mohou vyvolat další rizikové faktory. Při fyziologických podmínkách cytokiny a buňky IS regulují dynamickou rovnováhu imunitní funkce organismu. Ve chvíli, kdy dojde k imunitní nerovnováze, objevuje se autoimunitní onemocnění štítné žlázy. Dochází k abnormální expresi cytokinů, jako jsou například: HLA, CD152 nebo CD40 a jejich geny inhibují autoimunitní toleranci [64,65].

Poprvé byl popsán vztah mezi AITD a molekulou CTLA-4 v roce 1995, Yanagawou a jeho kolektivem [65]. Produkt exprese genu CTLA-4 je gen CD152. CD152 je exprimován na CD4⁺ a CD8⁺ aktivovaných T buňkách. V pozdním stádiu imunitní aktivace se zvyšuje exprese CD152 na T buňkách a soutěží s CD28 o ligand B7. Na počátku aktivace CD152 se CTLA-4 váže na intracelulární doménu a zprostředkovává negativní signalizaci, která inhibuje aktivaci T buněk. Aktivace molekuly CTLA-4 inhibuje autoimunitní onemocnění, jako je Systémový lupus

erythematoses nebo Diabetes mellitus prvního typu u různých experimentálních zvířat [66,67].

Zjistilo se, že za určitých podmínek dochází k neúplné glykosylaci CTLA-4 a ke snížení exprese CTLA-4 na T buňkách. Redukce množství molekuly CTLA-4 na T lymfocytech a variace v genu CTLA-4 vedou ke snížení exprese genu CD152. Kouki a kol. [68] ve studii u dospívajících pacientů s onemocněním HT zjistili, že exprese CD152 byla u těchto pacientů snížena na rozdíl od normální kontrolní skupiny. Z toho vyplývá, že T lymfocyty v periferní krvi obsahovaly defekty exprese CD152. Tento fakt může abnormálně aktivovat T buňky a aktivovat autoprotilátky štítné žlázy. Tyto autoprotilátky mají schopnost způsobit AITD. Bossowski [69] ve své studii objevil, že exprese CD152 na T buňkách v periferní krvi byla zvýšená u pacientů s GD. To souvisí s porušenou funkcí CD152, která je způsobena polymorfismy genu CTLA-4. Zvýšená exprese antigenní struktury CTLA-4 na T buňkách je dostatečná pro potlačení abnormální aktivity T buněk [68,69].

Po celém světě byly prováděny studie [68,69], které potvrzují určitou souvislost mezi polymorfismy molekuly CTLA-4 a GD. Záměny threoninu (Thr) a alaninu (Ala) v 17-kodovaném 49 místě A/G vedoucího exonu 1 molekuly CTLA-4 vedou k chybám při zpracování CTLA-4 molekuly v endoplazmatickém retikulu. Tyto chyby pak následně způsobují neefektivní glykosylaci a sníženou expresi CTLA-4 na povrchu T buněk. Konkrétně pacienti s 49G jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) genotypu CTLA-4 A/G vykazovali významně zvýšenou produkci autoprotilátek proti štítné žláze [70].

S orgánově specifickými autoimunitními onemocněními jsou spojeny další polymorfismy v promotoru CTLA-4. Jedním z nejčastěji korelovaných polymorfismů s autoimunitním onemocněním štítné žlázy je polymorfismus CT60. Jiné studie prokázaly, že tento polymorfismus CT60 má souvislost také s vyšším výskytem Graves-Basedowovy choroby a Hashimotovy tyreoidity [68,70].

Polymorfismus CTLA-4 byl stanoven pomocí laboratorní metody polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR produkty studovaných polymorfismů molekuly CTLA-4 byly genotypovány na základě SNP, jenž může souviset s AITD. V poslední době bylo prokázáno, že interakce gen-gen (mezi HLA-DR a CTLA-4) a heterogenní populační účinky představují klíčový mechanismus v etiologii jak GD, tak HT [72].

6.2 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) patří do orgánově nespecifických autoimunitních onemocnění. Jedná se o zánětlivé postižení kloubů, které se projevuje ranní ztuhlostí a bolestí kloubů. Toto onemocnění se nejčastěji objevuje mezi 40.-50. rokem života a postihuje více ženy než muže. RA se objevuje asi 1-2 % světové populace. V dnešní době RA se může objevit i u dětí nebo adolescentů, jde o tzv. juvenilní formy [13].

Regulační T lymfocyty jsou důležité při udržování imunitní homeostázy a omezují poškození, která způsobují patogenní T_H17 buňky. Dysfunkční T_{reg} nemají schopnost kontrolovat odpovědi T_H17 buněk a byly nalezeny u mnoha autoimunitních onemocnění (Revmatoidní artritida, Diabetes mellitus prvního typu a Roztroušená skleróza). Funkce T_{reg} u Revmatoidní artritidy je v poslední době spojována se sníženou expresí molekuly CTLA-4, která je u zdravých jedinců konstitutivně exprimována. Molekula CTLA-4 má důležitou funkci v regulaci T lymfocytů, její exprese je kontrolována transkripčním faktorem NF-AT. U zdravých jedinců byly popsány podobné diferencní dimetylační oblasti proti směru molekuly CTLA-4, což naznačuje, že exprese CTLA-4 v T_{reg} u pacientů s RA je ovlivněna metylací DNA [73,74].

Cribbs a kolektiv zkoumali mechanismus snížené exprese CTLA-4 v T_{reg} buňkách, které byly izolovány od RA pacientů. Vědci zkoumající vazbu mezi CTLA-4 a T_{reg} ukázali, že metylace NF-AT vazebného místa v promotoru molekuly CTLA-4 zabraňuje navázání NF-AT2, což vede ke snížené transkripci CTLA-4. Snížená transkripce CTLA-4 vede k selhávání aktivace enzymu IDO v APC, který degraduje tryptofan a následně dochází ke zhoršení supresivní funkce T_{reg} v RA. Cribbs se svým týmem pozorovali výrazné snížení celkové exprese CTLA-4 v populaci T_{reg} buněk u pacientů s RA, ale v populaci T_H17 buněk tuto expresi nepozorovali. Molekula CTLA-4 je konstitutivně exprimována zdravými T_{reg} buňkami a její exprese se stimulací zvyšuje. Cribbs se svým týmem také sledoval, zda se exprese molekuly CTLA-4 po stimulaci na T_{reg} buňkách u pacientů s RA změní. Bylo zjištěno, že exprese CTLA-4 se snížila u pacientů s RA během 24 a 48 hodin po stimulaci. Jejich objev potvrzuje fakt, že existuje vnitřní defekt v expresi molekuly CTLA-4, který není závislý na stavu aktivace [75].

Po potvrzení, že metylace promotoru CTLA-4 snižuje transkripční rovnováhu, Cribbs a spol. hledali důsledky snížené exprese CTLA-4. T_{reg} buňky u zdravých jedinců byly schopny aktivovat expresiIDO na mediátorové RNA a zvyšovat hladinu kynureninu. To potvrzuje defektivní funkciIDO v RA, protože T_{reg} buňky od pacientů s RA to nedokázaly. Aby byl potvrzen význam molekuly CTLA-4 při regulaci expreseIDO a při zprostředkování supresivních účinků T_{reg} buněk od zdravých dárců, byla k testu přidána CTLA-4 neutralizační protilátka. Hladiny kynureninu byly sníženy a zrušila se i suprese T_{reg} díky neutralizaci CTLA-4. Naopak při přidání CTLA-4-Ig došlo ke zvýšení hladiny kynureninu a potvrdila se tím tak schopnost CTLA-4 aktivovat dráhuIDO. Díky těmto zjištěním vědci došli k závěru, že existuje selhání indukce aktivityIDO u RA, kterou způsobuje snížená exprese CTLA-4 na T_{reg} buňkách. Poprvé ukázali, že epigenetické modifikace přispívají k defektní funkci T_{reg} buněk u RA. To naznačuje, že metylační změny v promotoru genu CTLA-4 jsou zprostředkovány jedním nebo více v současné době neznámými epigenetickými faktory. Tyto faktory zahrnují dříve identifikované rizikové faktory pro rozvoj RA, jako je kouření cigaret, hormony, latentní virus infekce nebo vitamin D. Je nepravděpodobné, že by se jednalo o jeden ekologický spouštěč, s největší pravděpodobností existují jejich kombinace [75].

V souhrnu ukázali, že defektní funkce T_{reg} buněk v RA je způsobena metylací vazebného místa NF-AT v promotoru molekuly CTLA-4, což vede k selhání indukce aktivityIDO. Vědci došli k závěru, že strategie zaměřené na posílení cestyIDO způsobem specifickým pro buňku nebo tkáň, jak navrhuje Xue a kolektiv, mohou mít terapeutický potenciál u RA [75].

6.3 Systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) patří do skupiny orgánově nespecifické autoimunitní onemocnění. SLE je multiorgánové onemocnění jehož projevy jsou bolest kloubů, postižení ledvin, CNS a kůže, které postihuje častěji ženy než muže. SLE může být způsoben komplexními interakcemi mezi genetickým rizikem,

hormonálními a enviromentálními faktory. Tyto interakce vedou k dysregulaci imunitního systému a následné produkci autoprotilátek. Epidemiologické studie dokázaly, že SLE častěji postihuje Asiaty (46,7/100 000) než bělochy (20,7/100 000). Vznik této nemoci také ovlivňuje etnický původ nebo věk [13,76].

Molekula CTLA-4 je důležitým negativním regulátorem odpovědi T lymfocytů a její dysregulace dokáže ovlivnit patogenezi SLE tím, že změní aktivaci T buněk na vlastní antigeny. Antigenní struktura CTLA-4 se nachází na chromozomu 2q33, kde dochází k různým polymorfismům. Byly prozkoumány dva polymorfismy, které jsou umístěny v promotoru, kdy jeden z nich je na změně T/C v pozici -1722 a druhý se nachází na A/G na pozici -1661. První zmíněný polymorfismus může změnit vazebná místa transkripčního faktoru a druhý dokáže změnit potenciální element odpovědi pro faktor 2 zesilovače myocytů (MEF2). Alelické variace těchto dvou míst vedou k diferencální citlivosti na SLE, která vyplývá z neefektivních nebo nevyvážených odpovědí imunitního systému [77].

Polymorfismus molekuly CTLA-4 má souvislost s několika autoimunitními chorobami, jako je SLE, GD nebo Roztroušená skleróza. Asociace však nebyly vždy replikovány v různých populacích. Některé studie prokázaly, že polymorfismus molekuly CTLA-4 má určitou souvislost s SLE. Tuto souvislost popsaly studie jen u některých populací, například v Číně [78,79].

Ke studiu SLE v souvislosti s polymorfismem molekuly CTLA-4 bylo vybráno 148 pacientů (131 žen, 17 mužů), kteří trpěli touto nemocí. Jako kontroly byla použita skupina 170 zdravých dobrovolníků, u kterých anamnéza ukázala, že netrpí autoimunitním onemocněním. Vědci z této studie pozorovali, že genotypy v poloze -1722 byly silně spojeny s SLE. Frekvence alely T na -1722 SNP byla signifikantně zvýšena u pacientů s SLE, a to o 57,8 %, a u kontrolních vzorků byla zvýšena o 40,6 %. U alely C byla frekvence u kontrol signifikantně zvýšena (59,9 %) ve srovnání s pacienty, kteří trpí SLE (42,2 %). Frekvence T/T homozygoty a T/C heterozygoty byla také zvýšená u testované skupiny s SLE (28,4 %). U kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků byla frekvence C/C heterozygoty podstatně vyšší než u pacientů (35,8 % oproti 12,8 %). Vědci nepozorovali významný rozdíl u pacientů s SLE a zdravou kontrolní skupinou v distribuci alel a genotypů pro místo -1661 [80].

Genomová asociační studie (GWAS) potvrdila, že variace v molekule CTLA-4 má určitou spojitost se zvýšeným genetickým rizikem výskytu SLE. Tento typ polymorfismu CTLA-4 ještě nemá přesně stanovené prahové hodnoty. Tato asociace byla pozorována v několika studiích u odlišných etnických populací především v Asii. Existuje tedy dostatečný biologický důkaz o tom, že polymorfismus molekuly CTLA-4 může pomocí svých funkcí při aktivaci nebo regulaci T buněk způsobit SLE. V Koreji a v Japonsku vědci pomocí GWAS pozorovali pozitivní asociace polymorfismu molekuly CTLA-4, zatímco u malajské nebo tchajwanské populace ne. Liu a kolektiv proto navrhl, že tento polymorfismus může ovlivnit pouze některé specifické klinické znaky [81].

Vědci předpokládají, že významné zvýšení alely C pozorované u kontrolních vzorků má obrannou funkci proti SLE u čínské populace. Genotypy T/T a T/C polymorfismů -1722 T/C byly spojeny s vyšším rizikem vzniku SLE. Hudson a kol. [83] studovali polymorfismy molekuly CTLA-4 v polohách T/C -1722 u Korejců. Vědci došli k závěru, že alela T se častěji vyskytovala u pacientů s SLE a alela C byla v kontrolních vzorcích snížena. Proto bylo navrženo, že alela C by mohla chránit před vznikem SLE v Koreji [82].

Bohužel je známo málo studií, které by vysvětlily rozdíly v polymorfismu promotoru -1722 v SLE. Vědci se ale domnívají, že rozdíly mohou být způsobeny genetikou, rasovými či etnickými vlivy [81].

Na závěr je vhodné zmínit, že terapeutické použití solubilního fúzního proteinu (CTLA-4-Ig) zpomaluje nebo oslabuje vývoj onemocnění, což bylo potvrzeno v laboratořích na experimentálních modelech. Tyto výsledky by mohly do budoucna poskytnout nové podněty a teorie pro definování funkce a významu molekuly CTLA-4 v rozvoji patogeneze SLE [81].

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit čtenáře se strukturou molekuly CTLA-4, s jejím významem a funkcí v rámci fungování imunitního systému.

Molekula CTLA-4 byla poprvé popsána kolem roku 1980 a bylo prokázáno, že je exprimována na povrchu aktivovaných CD8⁺ T lymfocytech. Až do 90. let se nevědělo, jakou funkci v IS molekula CTLA-4 vlastně má.

O několik let později byla objevena funkce antigenní struktury CTLA-4 v imunitním systému. Molekula CTLA-4 má funkci jako negativní regulátor adaptivní odpovědi imunitního systému.

V dnešní době jsou na trhu různé preparáty, které dokážou zablockovat funkci molekuly CTLA-4. Tyto preparáty se využívají k léčbě různých onkologických onemocnění. Jedním takovým preparátem je Ipilimumab, monoklonální protilátka proti CTLA-4. Jak bylo komentováno v textu této práce, Ipilimumab jako jediný lék na trhu dokázal prodloužit dobu přežití u pacientů s rakovinou kůže (melanomem).

V současné době se objevují studie, které zkoumají, zda by se Ipilimumab mohl použít už v adjuvantním režimu, nebo zda by šel použít k léčbě i jiných onkologických onemocnění. Bohužel na tyto výsledky si musíme ještě počkat.

Zjistilo se také, že díky různým regulačním funkcím má molekula CTLA-4 potenciál být využita i v rámci terapie autoimunitních chorob. Aktivací molekuly CTLA-4 může docházet k oslabení patologických procesů vedoucích k rozvoji autoimunitní reakce a vzniku autoimunitních onemocnění, jako jsou Graves- Basedowova choroba, Systémový lupus erythematosus nebo Revmatoidní artritida.

Seznam literatury

1. CHAMBERS, C. A., et al. CTLA-4 Mediated Inhibition in Regulation of T Cells Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*. [online]. 2001, vol. 19, s. 565–594.
2. BRUNET, J. F., et al. A New Member of the Immunoglobulin Superfamily – CTLA- 4. *Nature Reviews Immunology*. [online]. 1987, vol. 328, s. 267–270.
3. DARIAVACH, P., et al. Human Ig Superfamily CTLA-4 Gene: Chromosomal Localization and Identity of Protein Sequence Between Murine and Human CTLA-4 Cytoplasmic Domains. *European Journal of Immunology*. [online]. 1988, vol. 18, s. 1901.
4. LINSLEY, P. S., et al. Binding of the B Cell Activation Antigen B7 to CD28 Costimulates T Cell Proliferation and Interleukin 2 mRNA Accumulation. *The Journal of Experimental Medicine*. [online]. 1991, vol. 173, s. 721.
5. LINSLEY, P. S., et al. CTLA-4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. *The Journal of Experimental Medicine*. [online]. 1991, vol. 174, s. 561–569.
6. LINSLEY, P. S., et al. Coexpression and Functional Cooperation of CTLA-4 and CD28 on Activated T Lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. [online]. 1992, vol. 176, s. 1595–1604.
7. KRUMMEL, M. F., ALLISON J. P. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*. [online]. 1995, vol. 182, s. 459–465.
8. NOBEL PRIZE MEDICINE. Discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation. [online].
9. LEACH D., et al. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*. [online]. 1996, vol. 271, s. 1734-1736.

10. ARUFFO A., SEED B. Molecular Cloning of a CD28 cDNA by a High Efficiency COS Cell Expression System. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1987, vol. 84, s. 8573–8577.
11. RAMAGOPAL U. A., WEIFENG L., GARRETT-THOMSON S. C., et al. Structural Basis for Cancer Immunotherapy by the First-in-Class Checkpoint Inhibitor Ipilimumab. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [online]. 2017, vol. 114 (21), s. 4223-4232.
12. DELVES, P. J., ROITT I. *Encyclopedia of Immunology*. Second Edition. London, UK: Academic Press, 1998. ISBN 978-0-12-802585-7.
13. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ J., BRDIČKA T., ŠPÍŠEK R. *Základy imunologie. 6. aktualizované vydání*. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
14. SHIRATORI T., MIYATAKE S., OHNO H. Tyrosine Phosphorylation Controls Internalization of CTLA-4 by Regulating Its Interaction with Clathrin-Associated Adaptor Complex AP-2. *Immunity*. [online]. 1997, vol. 6 (5), s. 583-589
15. DARLINGTON, Peter J. Hierarchical Regulation Of CTLA-4 Dimer-Based Lattice Formation And Its Biological Relevance For T Cell Inactivation. *The Journal of Immunology*. [online]. 2005, vol. 175 (2), s. 996-1004.
16. ZHAO Y., YANG W., HUANG Y., CUI R., LI X., LI B. Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry*.
17. METZLER W. J., BAJORATH J., FENDERSON W., SHAW S. Y., CONSTANTINE K. L., NAEMURA J., LEYTZE G., PEACH R. J., LAVOIE T. B., MUELLER L., LINSLEY P. S. Solution Structure of Human CTLA-4 and Delineation of a CD80/CD86 Binding Site Conserved in CD28. *Nature Structural & Molecular Biology*. [online]. 1997, vol. 4., s. 527-531.
18. GARDNER D., JEFFERY L.E., SANZO D.M., Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) Pathway and Its Implications for Costimulatory Blockade. *American Journal of Transplantation*. [online]. 2014, vol. 14, s. 1985-1991.
19. KOSMACZEWSKA A., CISZAK L., BOĆKO D., FRYDECKA I. Expression and Functional Significance of CTLA-4, a Negative Regulator of T Cell Activation,

Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. [online]. 2001, vol. 49 (1), s. 39-44.

20. FAIRMAN R., et al., Molecular Weights of CTLA-4 and CD80 by Sedimentation Equilibrium Ultracentrifugation. *Analytical Biochemistry*. [online]. 1999, vol. 270, s. 286-295.

21. EDELSTEIN S. J., SCHACHMAN H. K. Measurement of Partial Specific Volume by Sedimentation Equilibrium in H₂O D₂O Solutions. *Methods in Enzymology*. [online]. 1973, vol. 27, s. 82-98.

22. SHIRE S. J. Analytical Ultracentrifugation and its use in Biotechnology. *Modern Analytical Ultracentrifugation* (SHUSTER T. M., LAUE T. M.). [online]. 1994, s. 261-297. Birkhäuser, Boston.

23. SIMONELLI M., et al. Checkpoint Inhibitors as Treatment for Malignant Gliomas: “A Long Way to the Top” *Cancer Treatment Reviews*. [online]. 2018, vol. 69, s. 121-131.

24. McCOY K. D., LE GROS G., The Role of CTLA-4 in the Regulation of T Cell Immune Responses. *Immunology and Cell Biology* [online]. 1999, vol. 77, s. 1-10

25. TIVOL E. A., et al. Loss of CTLA-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4. *Immunity*. [online]. 1995, vol. 3, s. 541.

26. CHAMBERS C. A., SULLIVAN T. J., ALLISON J. P. Lymphoproliferation in CTLA-4-Deficient Mice Is Mediated by Costimulation-Dependent Activation of CD41 T Cells. *Immunity*. [online]. 1997, vol. 7, s. 885-895.

27. RUDD C. E., TAYLOR A., SCHNEIDER H. CD28 and CTLA-4 Coreceptor Expression and Signal Transduction. *Immunological Reviews*. [online]. 2009, vol. 229 (1), s. 12-26.

28. BACHMANN M. F., KÖHLER G., ECABERT B., MAK T. W., KOPF M. J. Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Autonomous in the Absence. *The Journal of Immunology*. [online]. 1999, vol. 163, s. 1128-1131.

29. ZHENG Y., et al. Acquisition of Suppressive Function by Activated Human CD4⁺ CD25⁻ T Cells Is Associated with the Expression of CTLA-4 Not FoxP3 Associated. *The Journal of Immunology*. [online]. 2008, vol. 181, s. 1683-1691.
30. QURESHI O. S., ZHENG Y., NAKAMURA K., et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science*. [online]. 2011, vol. 332, s. 600-603.
31. BARTUŇKOVÁ J., PAULÍK M. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
32. BIOCHEMIE SWEB. Elektroforéza [online].
33. ČESKÝ LÉKOPIS 1997. Fyzikální a fyzikálně chemické metody. Elektroforéza [online].
34. CENTRÁLNÍ LABORATOŘE VŠCH PRAHA. Hmotnostní spektrometrie [online].
35. PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ FAKULTY. Hmotnostní spektrometrie [online].
36. HOLČAPEK M., LÍSA M., JIRÁSKO R., ed. *12. ročník Školy hmotnostní spektrometrie: sborník, Srní, 12.9.-16.9.2011: pořádaný Katedrou analytické chemie Univerzity Pardubice a Spektroskopickou společností J.M.M.* Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-407-9.
37. WEB NATUR CUNI. Vylučovací chromatografie [online].
38. ČESKÝ LÉKOPIS 1997. Fyzikální a fyzikálně chemické metody. Vylučovací chromatografie [online].
39. STUDIUM CHEMIE. Jaderná magnetická rezonance. [online].
40. CHENG X., VEVERKA V., RADHAKRISHNAN A., et al. Structure and Interactions of the Human Programmed Cell Death 1 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. [online]. 2013, vol. 288 (17), s. 11771-11785.
41. DATOVÝ STANDARD MZČR. To Parent Directory. [online].

42. FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO. Průtoková cytometrie: princip a využití. [online].
43. FERENČÍK M. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1196-6.
44. TROJAN S. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 1994. ISBN 80-7169-036-8.
45. STITES D. P., TERR A. I. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994. ISBN 80-85605-37-6.
46. SULLIVAN R. J., FLAHERTY K. T. New Strategies in Melanoma: Entering the Era of Combinatorial Therapy. *Clinical Cancer Research*. [online]. 2015, vol. 21(11), s. 2424–2435.
47. BAIJČIOVÁ V. Maligní melanom a nové možnosti jeho léčby. *Onkologie*. [online]. 2016, vol. 10 (6), s. 256-260.
48. DUMMER R., HAUSCHILD A., LINDEBLATT N. et al. Cutaneous Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Annals of Oncology*. [online]. 2015, vol. 26 (5), s. 126–132.
49. OSTROM Q. T., GITTLEMAN H., FULOP J., LIU M., BLADA R., KROMER C., et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro-Oncology*. [online]. 2015, vol. 17, s. 1–62.
50. KHALIL D. N., SMITH E. L., BRENTJENS R. J., WOLCHOK J. D. et al. The Future of Cancer Treatment: Immunomodulation, CARs and Combination Immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. [online]. 2016, vol. 13 (5), s. 273–290.
51. CARSON M. J., DOOSE J. M., MELCHIOR B., SCHMID C. D., PLOIX C. C. CNS Immune Privilege: Hiding in Plain Sight. *Immunological Reviews*. [online]. 2006, vol. 213, s. 48–65.
52. DAVIES D. C. Blood-Brain Barrier Breakdown in Septic Encephalopathy and Brain Tumours. *Journal of Anatomy*. [online]. 2002, vol. 200 (6), s. 639–646.

53. PREUSSER M., LIM M., HAFLER D., REARDON D. A., SAMPSON J. H. Prospects of Immune Checkpoint Modulators in the Treatment of Glioblastoma. *Nature Reviews Neurology*. [online]. 2015, vol. 11, s. 504–514.
54. FECCI P. E., MITCHELL D. A., WHITESIDES J. X., XIE W., FRIEDMAN A. H. ARCHER G. E. et al. Increased Regulatory T-cell Fraction Amidst a Diminished CD4 Compartment Explains Cellular Immune Defects in Patients with Malignant Glioma. *Cancer Research*. [online]. 2006, vol. 66 (6), s. 3294–3302.
55. WAINWRINGHT D. A., CHANG A. L., DEY M., BALLYASNIKOVA I. V., KIM C. K., TOBIAS A. et al. Durable Therapeutic Efficacy Utilizing Combinatorial Blockade Against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in Mice with Brain Tumors. *Clinical Cancer Research* [online]. 2014, vol. 20, s. 5290–5301.
56. ARENBERGEROVÁ A. Ipilimumab v léčbě melanomu. *Remedia online*. [online]. 2014, vol. 5.
57. HODI F. S., O'DAY S. J., McDERMOTT D. F. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*. [online]. 2010, vol. 363, s. 711–723.
58. ROBERT C., THOMAS L., BONDARENKO I. et al. Ipilimumab Plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*. [online]. 2011. vol. 364, s. 2517–2526.
59. CHAPMAN P. B., HAUSCHILD A., ROBERT C. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *The New England Journal of Medicine*. [online]. 2011, vol. 364, s. 2507–2516.
60. SCHANDENDORF D., HODI F. S., ROBERT C. et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Metastatic or Locally Advanced, Unresectable Melanoma. *European Journal of Cancer*. [online]. 2013, vol. 49.
61. EGGERMONT A. M. et al. Ipilimumab Versus Placebo After Complete Resection of Stage III Melanoma: Initial Efficacy and Safety Results From the EORTC 18071 Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology*. [online]. 2014. vol. 32.

62. GIBNEY G. T., WEINER L. M., ATKINS M. B. Predictive Biomarkers for Checkpoint Inhibitorbased Immunotherapy. *The Lancet Oncology*. [online]. 2016, vol. 17(12), s. 542–551.
63. LI H., WANG T. The Autoimmunity in Graves’s Disease. *Frontiers in Bioscience*. [online]. 2013, vol. 18 (2), s. 782–787.
64. ROTONDI M., CHOVATO L., ROMANGNAMI S., SERIO M., ROMAGNANI P. Role of Chemokines in Endocrine Autoimmune Disease. *Endocrine Reviews*. [online]. 2007, vol. 28 (5), s. 492-520.
65. McLACHLAN S. M., RAPOPORT B. Breaking Tolerance to Thyroid Antigens: Changing Concepts in Thyroid Autoimmunity. *Endocrine Reviews*. [online]. 2014, vol. 35 (1), s 59-105.
66. YANAGAWA T., HIDAKA Y., GUIMERAES V., SOLIMAN M., DeGROOT L. J. CTLA-4 Gene Polymorphism Associated with Grave’s Disease in Caucasian Population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. [online]. 1995, vol. 80 (1), s. 41-55.
67. LEE K. M., CHUANG E., GRIFFIN M. et al. Molecular Basic of T Cell Inactivation by CTLA-4. *Science*. [online]. 1998, vol. 282 (5397), s. 2263-2266.
68. KOUKI T., SAWAI Y., GARDINE C. A., FISFALEN M. E., ALEGRE M. L., DeGROOT L. J. CTLA-4 Gene Polymorphism at Position 49 in Exon 1 Reduces the Inhibitory Function of CTLA-4 and Contributes to the Pathogenesis of Grave’s Disease. *Journal of Immunology*. [online]. 2000, vol. 165 (11), s. 6606–6611.
69. BAN Y., DAVIES T. F., GREENBERG D. A. et al. Analysis of the CTLA-4, CD28, and Inducible Costimulator (ICOS) Genes in Autoimmune Thyroid Disease. *Genes and Immunity*. [online]. 2003, vol. 4, (8), s. 586–593.
70. MÄURER M., LOSERTH S., KOLB-MÄURER A. et al. A Polymorphism in the Human Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) Gene (exon 1 +49) Alters T-Cell Activation. *Immunogenetics*. [online]. 2002, vol. 54 (1), s. 1-2.
71. KAVVOURA F. K., AKAMIZU T., AWATA et al. Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4 Gene Polymorphisms and Autoimmune Thyroid Disease: A

Meta-Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. [online]. 2007, vol. 92 (8). s. 3162-3170.

72. PASTUSZAK-LEWANDOSKA, Dorota. CTLA-4 Gene Polymorphisms and Their Influence on Predisposition to Autoimmune Thyroid Diseases (Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis). *Archives of Medical Science* [online]. 2012, vol. 3 (3), s. 415-421

73. EHRENSTEIN M. R., EVANS J. G., SINGH A., MOORE S., WARNES S., ISENBERG D. A. et al. Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy. *Journal of Experimental Medicine*. [online]. 2004, vol 200 (3), s. 277-85.

74. LAWSON C. A., BROWN A. K., BEJARANO V., DOUGLAS S. H., BURGOYNE C. H., GREEN A. S. et al. Early Rheumatoid Arthritis is Associated with a Deficit in the CD4⁺ CD25^{high} Regulatory T Cell Population in Peripheral Blood. *Rheumatology*. [online]. 2006, vol. 45, s. 1210-1216.

75. CRIBBS A. P., KENNEDY A., PENN H., JORDAN E. R., AMIADI P., GREEN P., SYED K., MANKA S. W., BRENNAN F. M., GREGORY B., WILLIAMS R. O. Treg Cell Function in Rheumatoid Arthritis Is Compromised by CTLA-4 Promoter Methylation Resulting in a Failure to Activate the Indoleamine 2,3-Dioxygenase Pathway. *Arthritis and rheumatology*. [online]. 2014, vol. 66 (9), s. 2344-2354.

76. EDBERG J. C., WU J., LANGEFELD C. D. et al. Genetic Variation in the CRP Promoter: Association with Systemic Lupus Erythematosus. *Human Molecular Genetics*. [online]. 2008, vol. 17 (8), s. 1147–1155.

77. GREGERSEN P. K., OLSSON L. M. Recent Advances in the Genetics of Autoimmune Disease. *Annual Review of Immunology*. [online]. 2009, vol. 27, s. 363–391.

78. UEDA H., HOWSON J. M. M., ESPOSITO L et al. Association of the T-cell Regulatory Gene CTLA4 with Susceptibility to Autoimmune disease. *Nature*. [online], 2003, vol. 423 (6939), s. 506–511.

79. KRISTIENSEN O. P., LARSEN Z. M., POCIOT F. CTLA-4 in Autoimmune Diseases—A General Susceptibility Gene to Autoimmunity? *Genes and Immunity*. [online]. 2000, vol. 1 (3), s. 170–184.

80. KHALAF A. T., SONG J. Q., GAO T. T., YU X. P., L. T. C. CTLA-4 Gene Polymorphism and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus in the Chinese Population. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. [online]. 2011, vol. 2011, s. 6.
81. GRAHAM D. S. C., WONG A. K., McHUGH N. J., WHITTAKER J. C., VYSE T. J. Evidence for Unique Association Signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS Locus in a Family-Based Study. *Human Molecular Genetics*. [online]. 2006, vol. 15 (21), s. 3195–3205.
82. HUDSON L. L., ROCCA K., SONG Y. W., PANDEY J. P. CTLA-4 Gene Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus: A Highly Significant Association with a Determinant in the Promoter Region. *Human Genetics*. [online]. 2002, vol. 111 (5), s. 452–453.

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: LI H., WANG T. *Frontiers in Bioscience*. [online]. 2013, vol. 18 (2), s. 782–787

Obrázek č. 2: ZHAO Y., YANG W., HUANG Y., CUI R., LI X., LI B. Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry*. [online]. 2018, vol. 47, s. 721-734.

Obrázek č. 3: METZLER W. J., BAJORATH J., FENDERSON W., SHAW S. Y., CONSTANTINE K. L., NAEMURA J., LEYTZE G., PEACH R. J., LAVOIE T. B., MUELLER L., LINSLEY P. S. *Nature Structural & Molecular Biology*. [online]. 1997, vol. 4., s. 527-531.

Obrázek č. 4: QURESHI O. S., ZHENG Y., NAKAMURA K., et al. *Science*. [online]. 2011, vol. 332, s. 600-603.

Obrázek č. 5: QURESHI O. S., ZHENG Y., NAKAMURA K., et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science*. [online]. 2011, vol. 332, s. 600-603.

Obrázek č. 6: HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ J., BRDIČKA T., ŠPÍŠEK R. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

Obrázek č. 7: DELVES, P. J., ROITT I. *Encyclopedia of Immunology*. Second Edition. London, UK: Academic Press, 1998. ISBN 978-0-12-802585-7.

Obrázek č. 8: NOBEL PRIZE MEDICINE. Discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation. [online].

Obrázek č. 9: NOBEL PRIZE MEDICINE. Discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation. [online].

Obrázek č. 10: DELVES, P. J., ROITT I. *Encyclopedia of Immunology*. Second Edition. London, UK: Academic Press, 1998. ISBN 978-0-12-802585-7.

Obrázek č. 11: SCHANDENDORF D., HODI F. S., ROBERT C. et al. *European Journal of Cancer*. [online]. 2013, vol. 49.

Seznam zkratek

Ab	protilátka (z angl. „Antibody“)
Ag	antigen
AITD	autoimunitní onemocnění štítné žlázy (z angl. „Autoimmune Thyreoid Disease“)
Ala	alanin
APC	antigen prezentující buňka (z angl. „Antigen Presenting Cell“)
bb.	buňky
CD	diferenční antigen (z angl. „Cluster of Differentiation“)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (z angl. „complementary Deoxyribonucleic Acid“)
CNS	centrální nervový systém
CTLA-4	cytotoxický T-lymfocytární antigen-4 (z angl. „Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4“)
CTLA-4-Ig	protilátka cytotoxický T-lymfocytární antigen-4 (z angl. „Cytotoxic T-Tymphocyte Antigen-4 Immunoglobulin“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic Acid“)
ESI/MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (z angl. „Electrospray Ionisation Mass Spectrometry“)
GBM	glioblastom
GD	Graves-Basedowova choroba (z angl. „Graves' Disease“)
GWAS	Genomová asociační studie (z angl. „Genome-Wide Association Study“)
HT	Hashimotova tyreoidita
IL	interleukin
INF	interferon
iT _{reg}	periferní regulační T lymfocyty (z angl. „inducible Regulatory T-Cell“)
IS	imunitní systém
mAb	monoklonální protilátky (z angl. „monoclonal Antibodies“)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass Spectrometry“)
m/z	poměr hmotnosti a náboje
NMR	nukleární magnetická rezonance

PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. „Polymerase Chain Reaction“)
PD1	receptor PD1 na povrchu buněk (z angl. „Programed Cell Death 1“)
RA	revmatoidní artritida
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. „Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis“)
SLE	Systémový lupus erythematoses
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. „Single-Nucleotide Polymorphism“)
TAA	antigeny asociované s nádory (z angl. „Tumor Associated Antigen“)
T _c	cytotoxický T lymfocyt (z angl. „Cytotoxic T Lymphocyte“)
TCR	receptor pro T lymfocyty (z angl. „T-Cell Receptor“)
TGF	transformující růstový faktor (z angl. „Transforming Growth Factor“)
TGAb	protilátku proti thyreoglobulinu (z angl. „Thyroglobulin Antibody“)
T _h	pomocné T lymfocyty (z angl. „Helper T-Cell“)
Thr	threonin
T _{reg}	regulační T lymfocyty (z angl. „Regulatory T-cell“)
TPOAb	protilátka proti peroxidáze (z angl. „Thyroid Peroxidase Antibody“)
TSA	antigeny asociované pro nádory (z angl. „Tumor Specific Antigen“)